

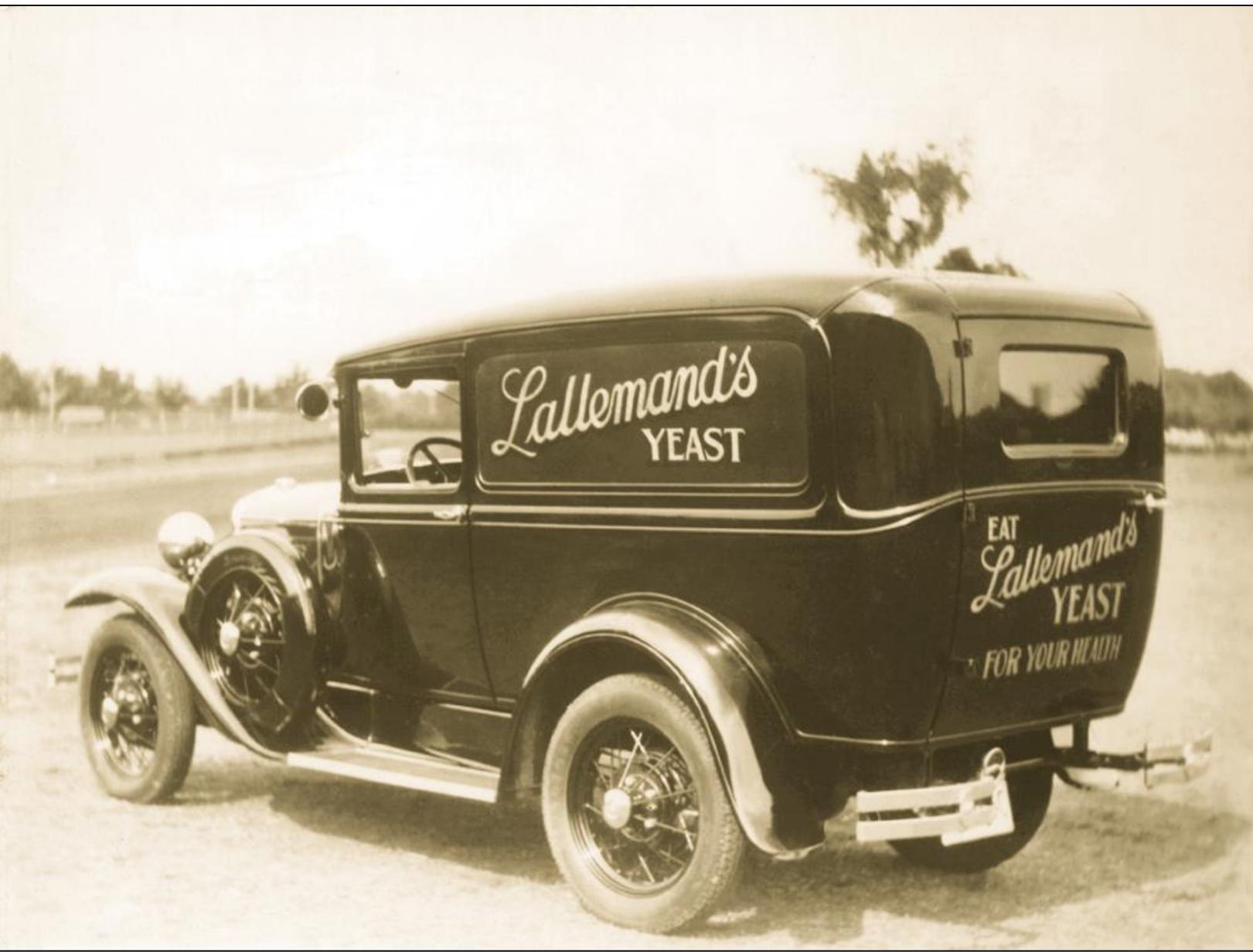
# Cidres, Vins et Alcools

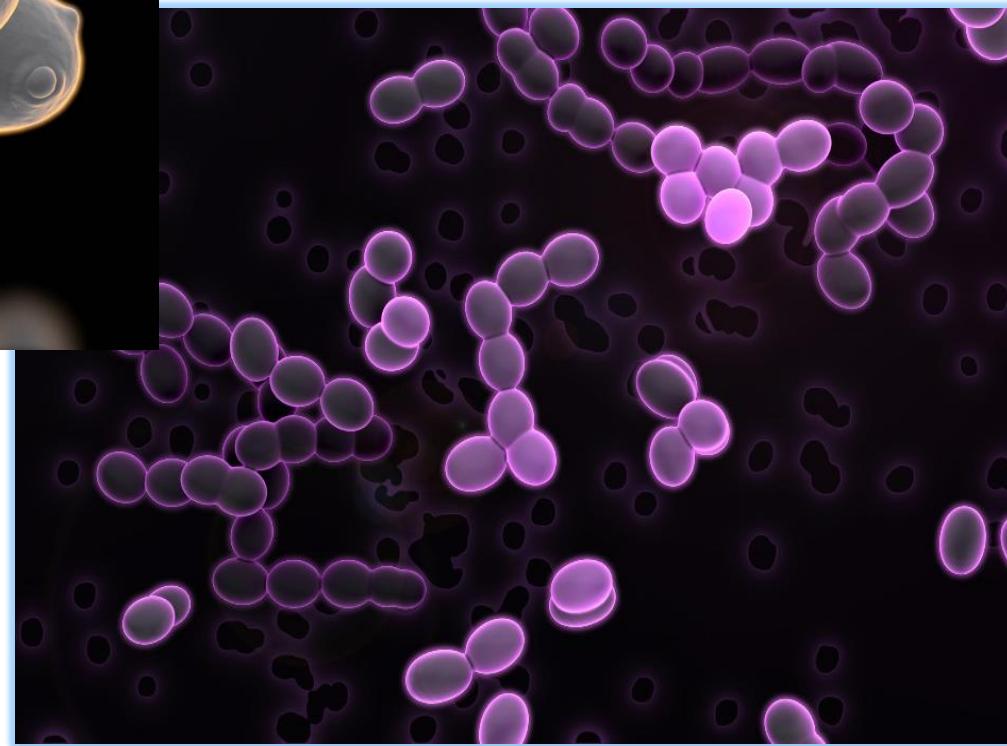
## reconnaître et éviter les défauts dans le cidre



St-Hyacinthe, Québec

Sigrid Gertsen-Schibbye

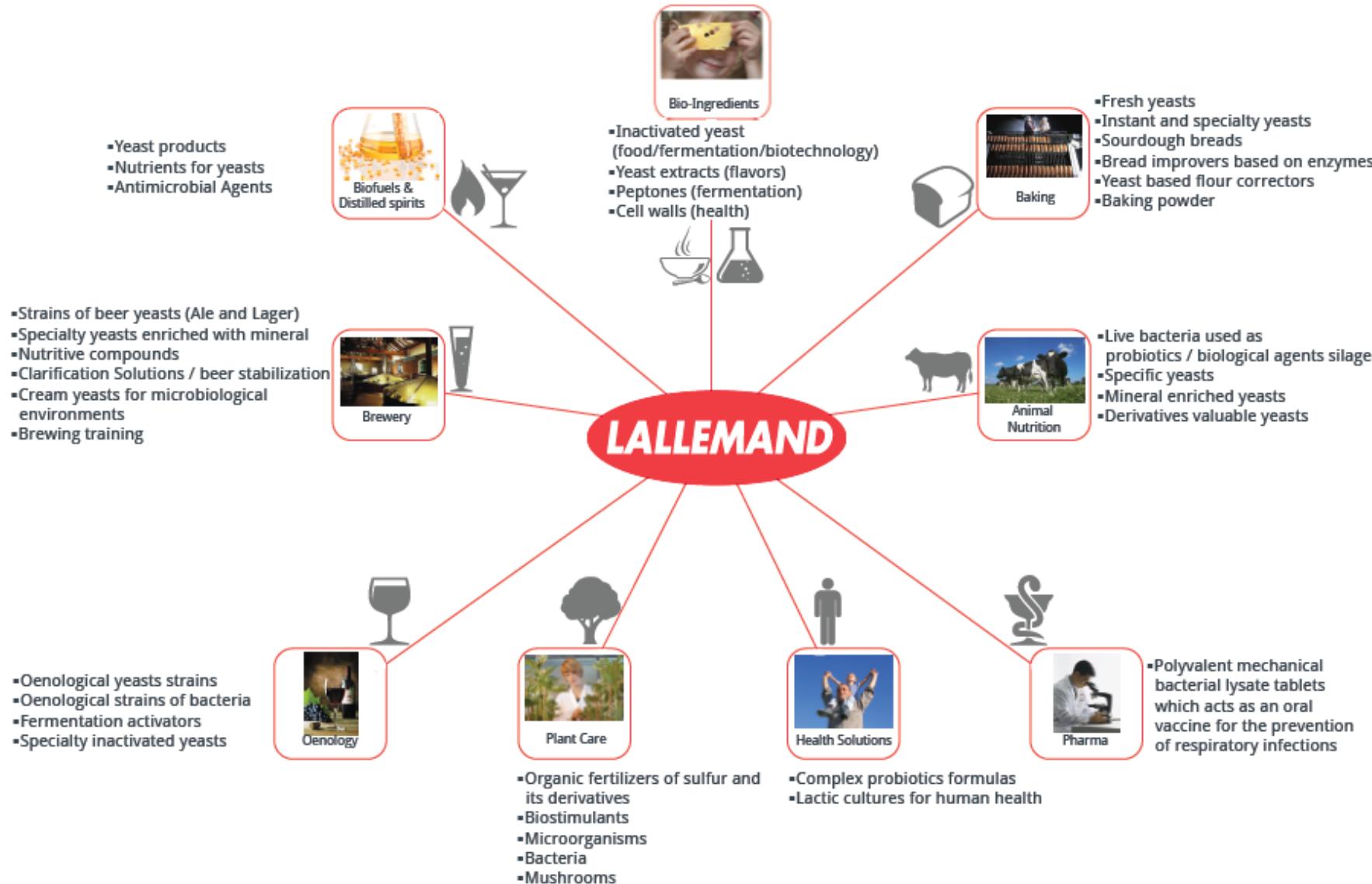




nd

# Un monde de levures et bactéries

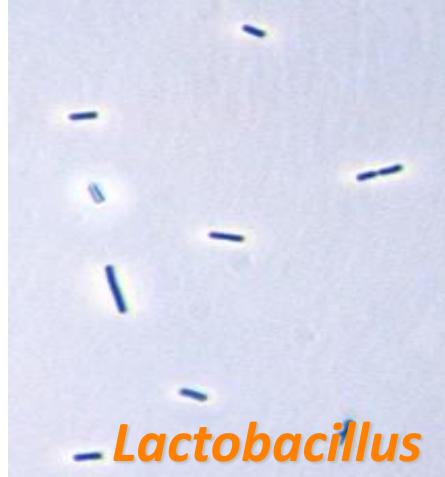
## Applications of Yeast and Bacteria



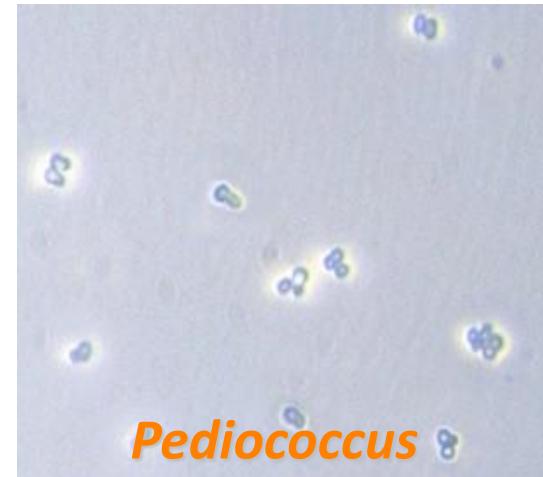
# Une microflore indigène du moût et du cidre est très complexe



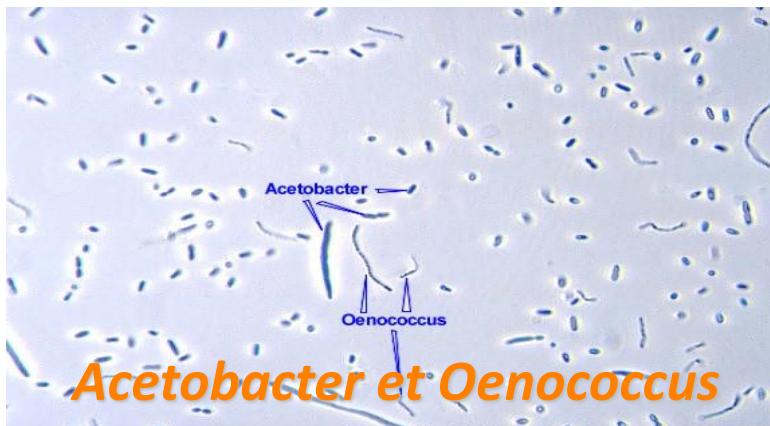
*Brettanomyces*



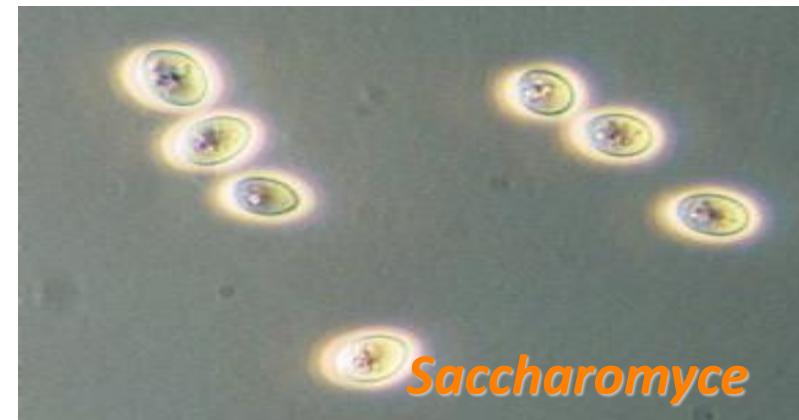
*Lactobacillus*



*Pediococcus*



*Acetobacter et Oenococcus*



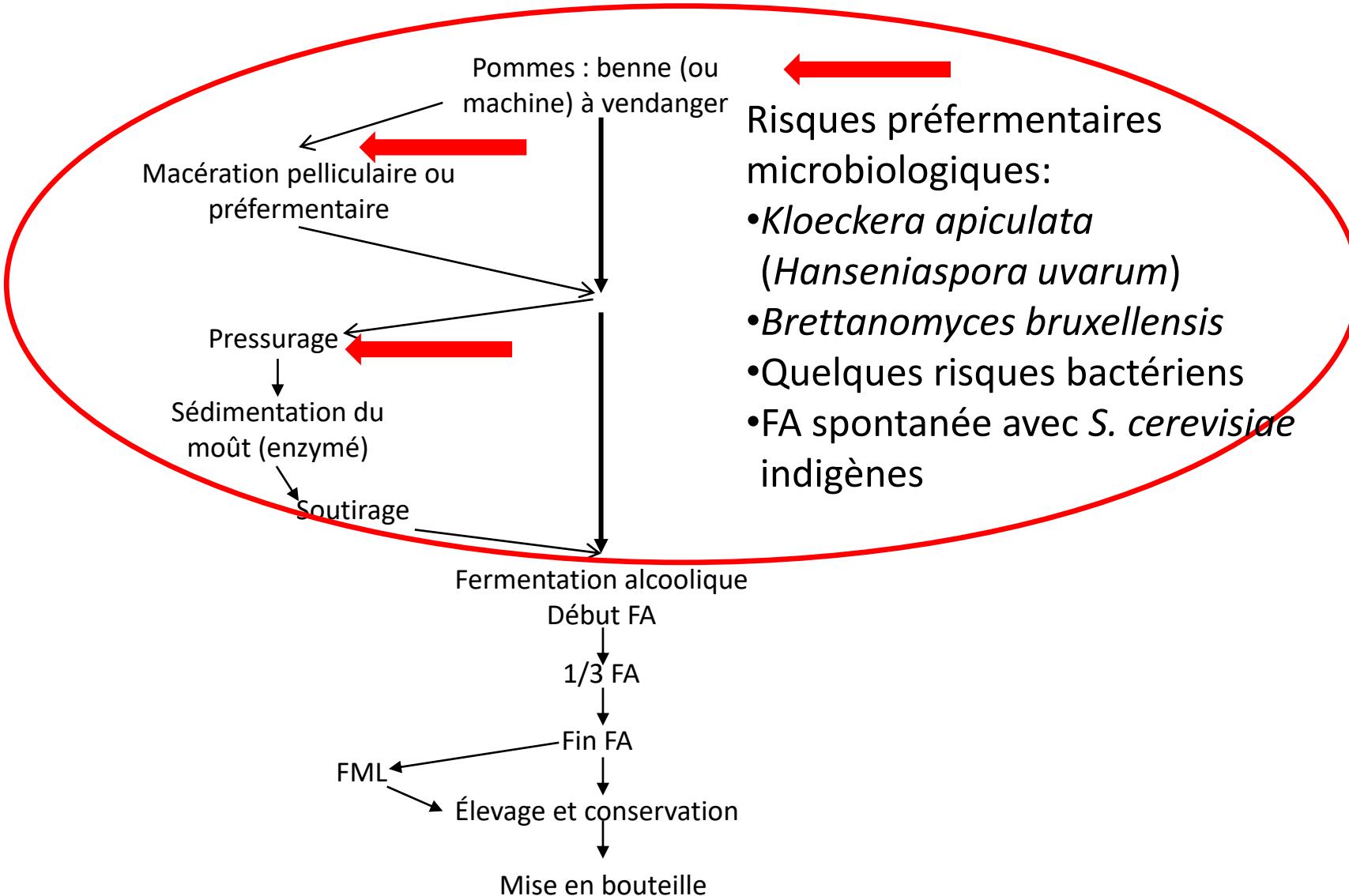
*s*

*Saccharomyce*

# Prévenir les défauts d'origine microbiologique

- Maîtrise de l'acidité volatile
  - Bioprotection dans les phases préfermentaires
  - Respect des bonnes pratiques de fermentation alcoolique
  - Stabilisation rapide et gestion de la FML
- Maîtrise des défauts liés aux composés soufrés
  - Le rôle de la levure
  - L'importance des équilibres nutritionnels de la levure
- Maîtrise des défauts phénolés
  - Biocontrôle des Brettanomyces
  - L'intérêt du chitosane
- Maîtrise des défauts liés aux amines biogènes

# Risques microbiologiques dans les phases préfermentaires

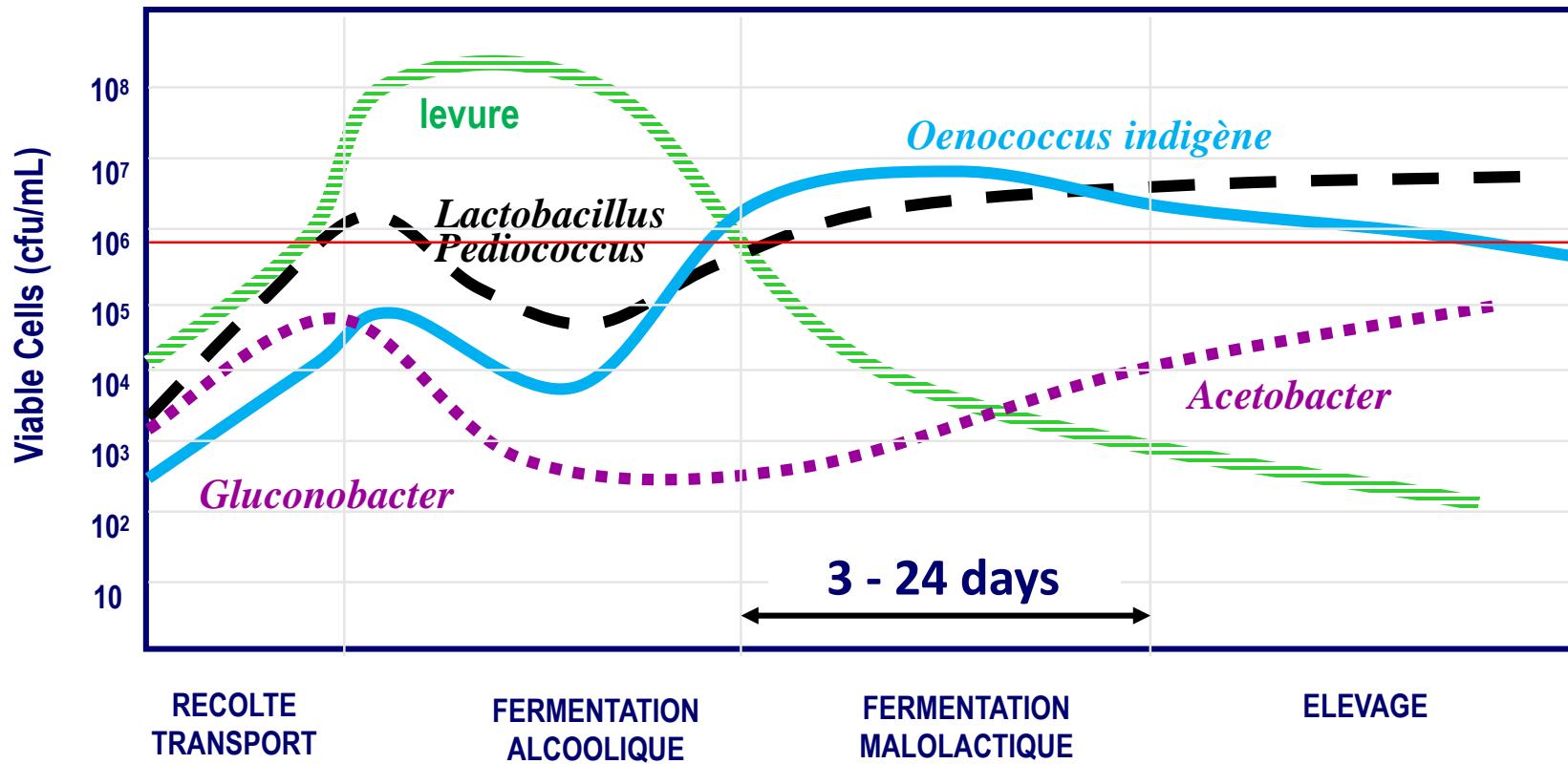


# Maîtriser la flore indésirable, et éviter les effets « masques »

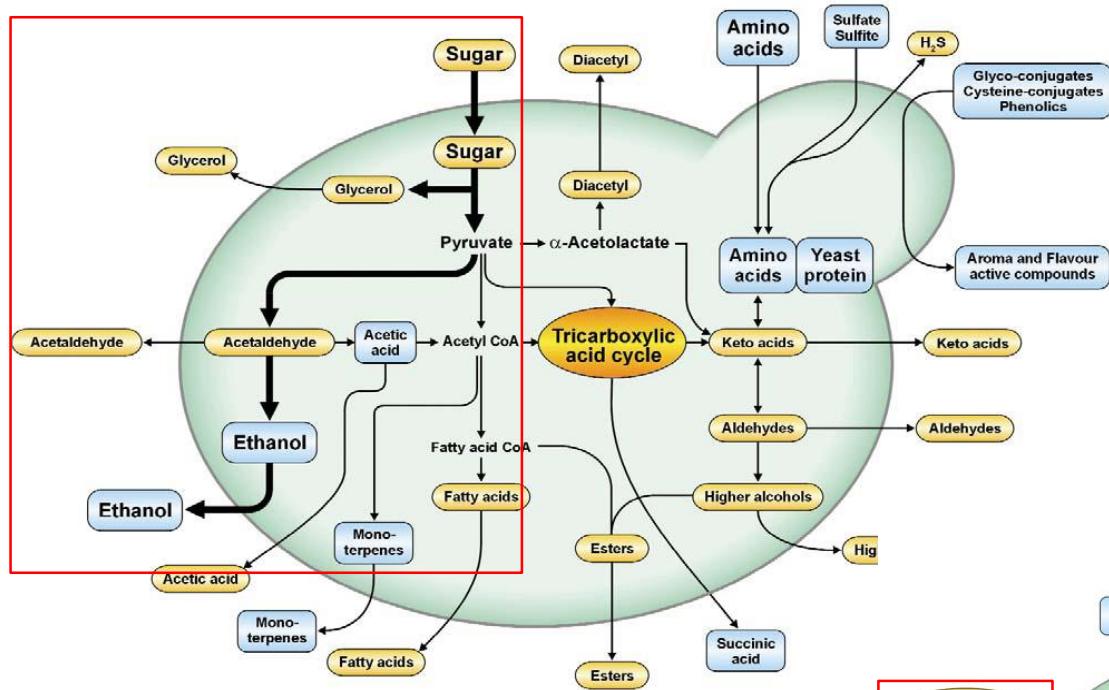


# Evolution de la flore indigène - *Conditions de pH > 3,5*

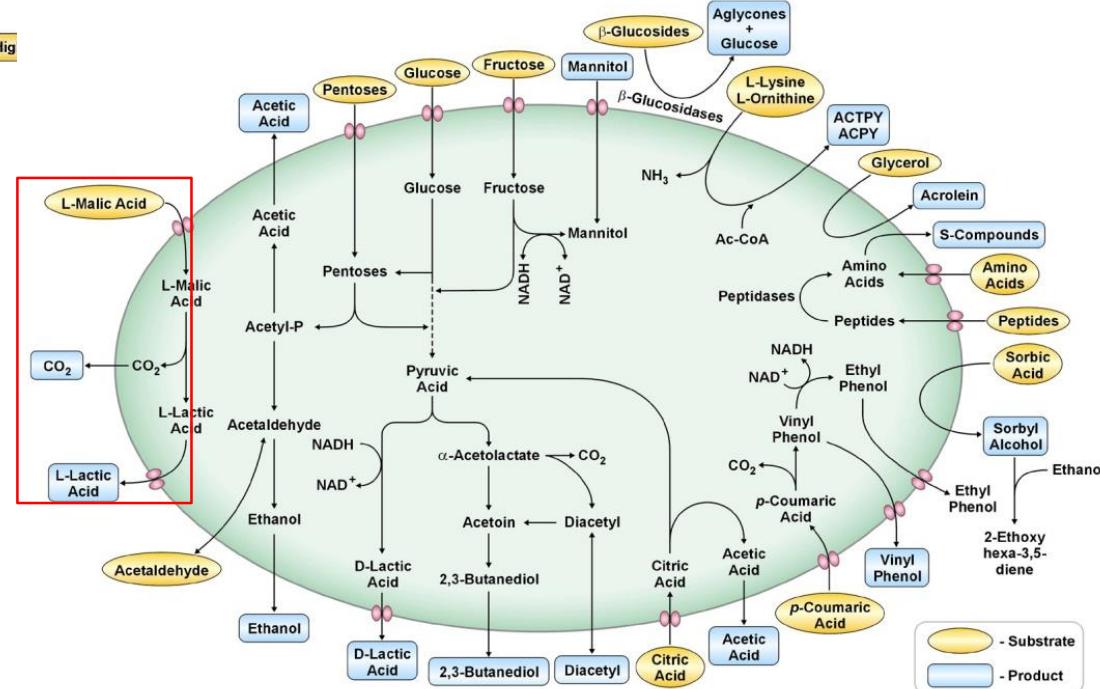
*Les bactéries indigènes se multiplient vite  
et sont actives à partir d'une population > 10<sup>6</sup>cellules/ml*



# Métabolisme des levures et des bactéries



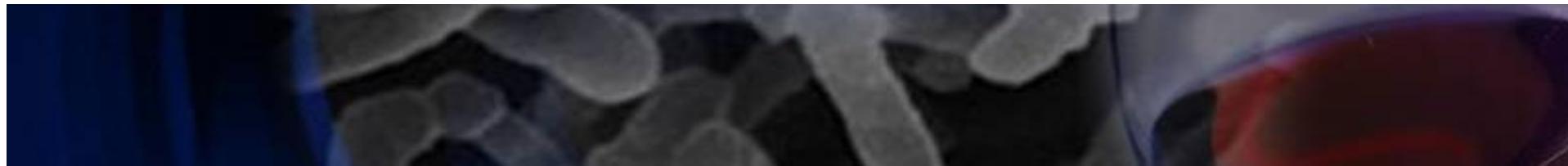
Swiegers, Bartowsky, Henschke & Pretorius, 2005



Eveline Bartowski, AWRI, 2009



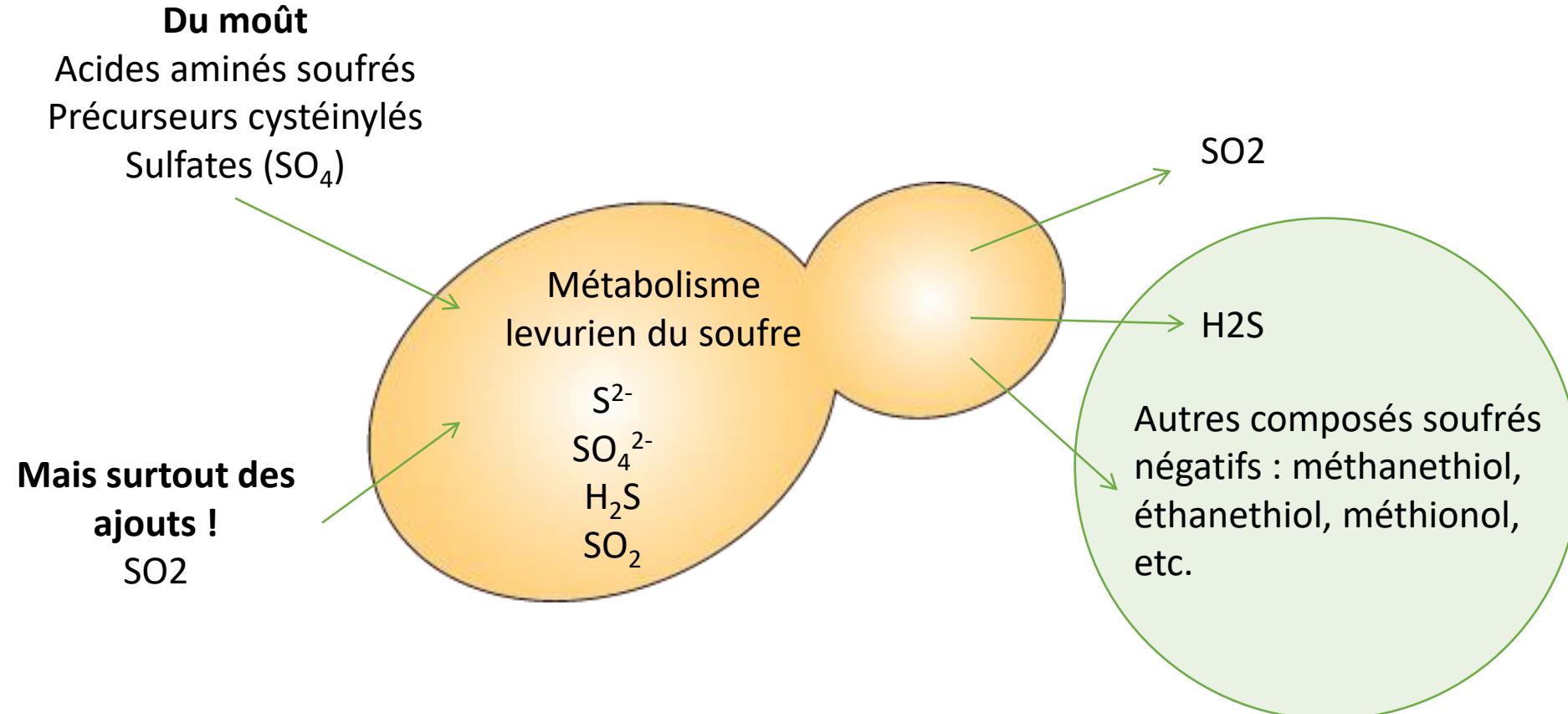
LALLEMAND



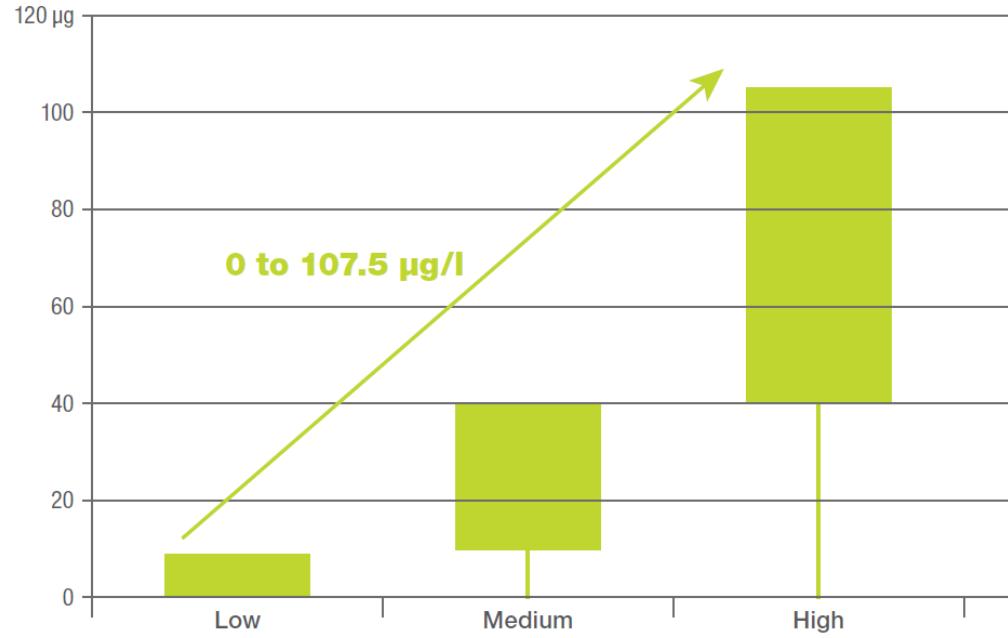
***COMPOSÉS SOUFRÉS***



# Le rôle de la levure dans les défauts de type composés soufrés



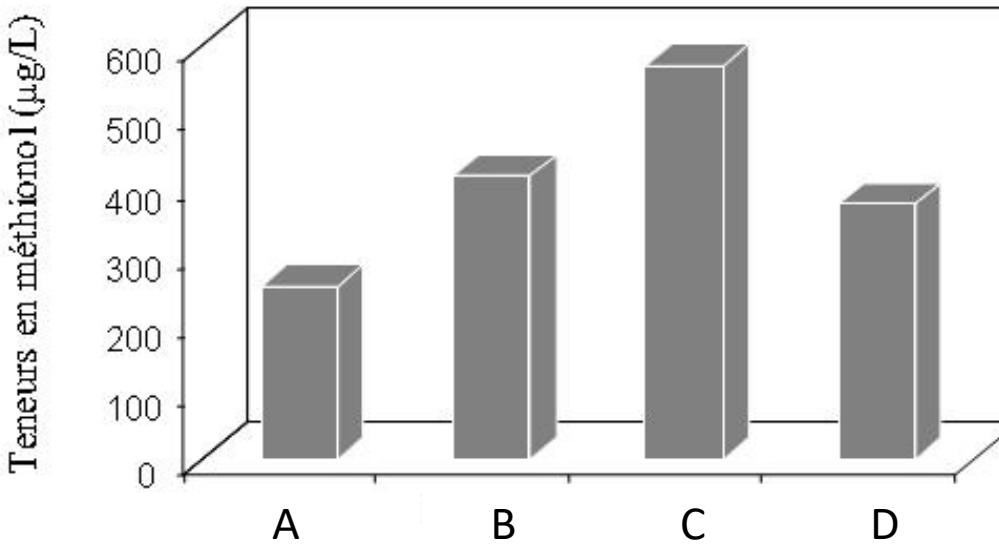
# Une grande variabilité de production des composés soufrés chez les levures



Etude sur 50 souches de levures menant à un classement en 3 groupes en fonction de leur capacité à produire du H<sub>2</sub>S.

(S. Park, UC Davis, 2004/2005)

# Une grande variabilité de production des composés soufrés chez les levures

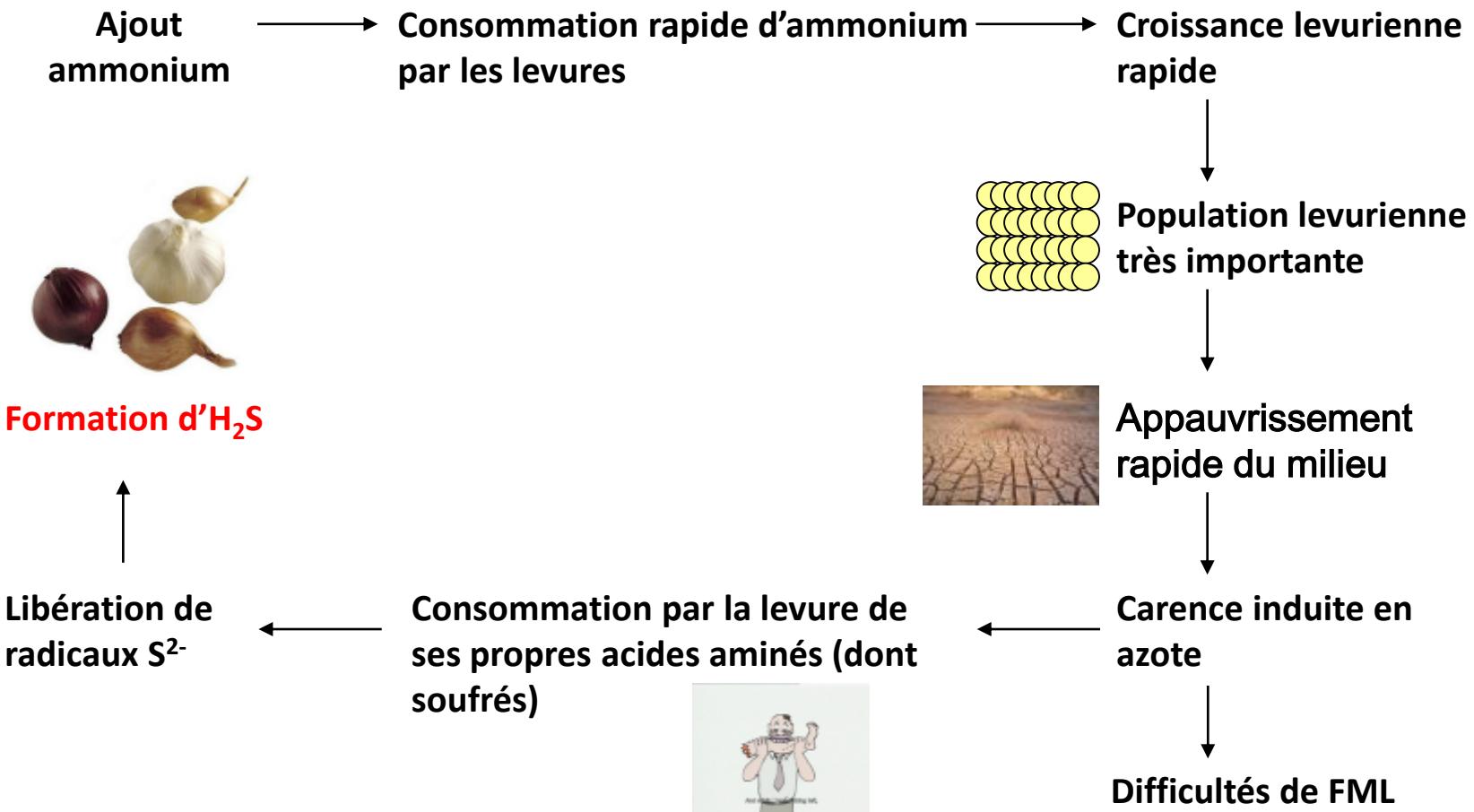


**Figure 5:** Incidence de la souche de levure sur la formation du méthionol dans les vins.

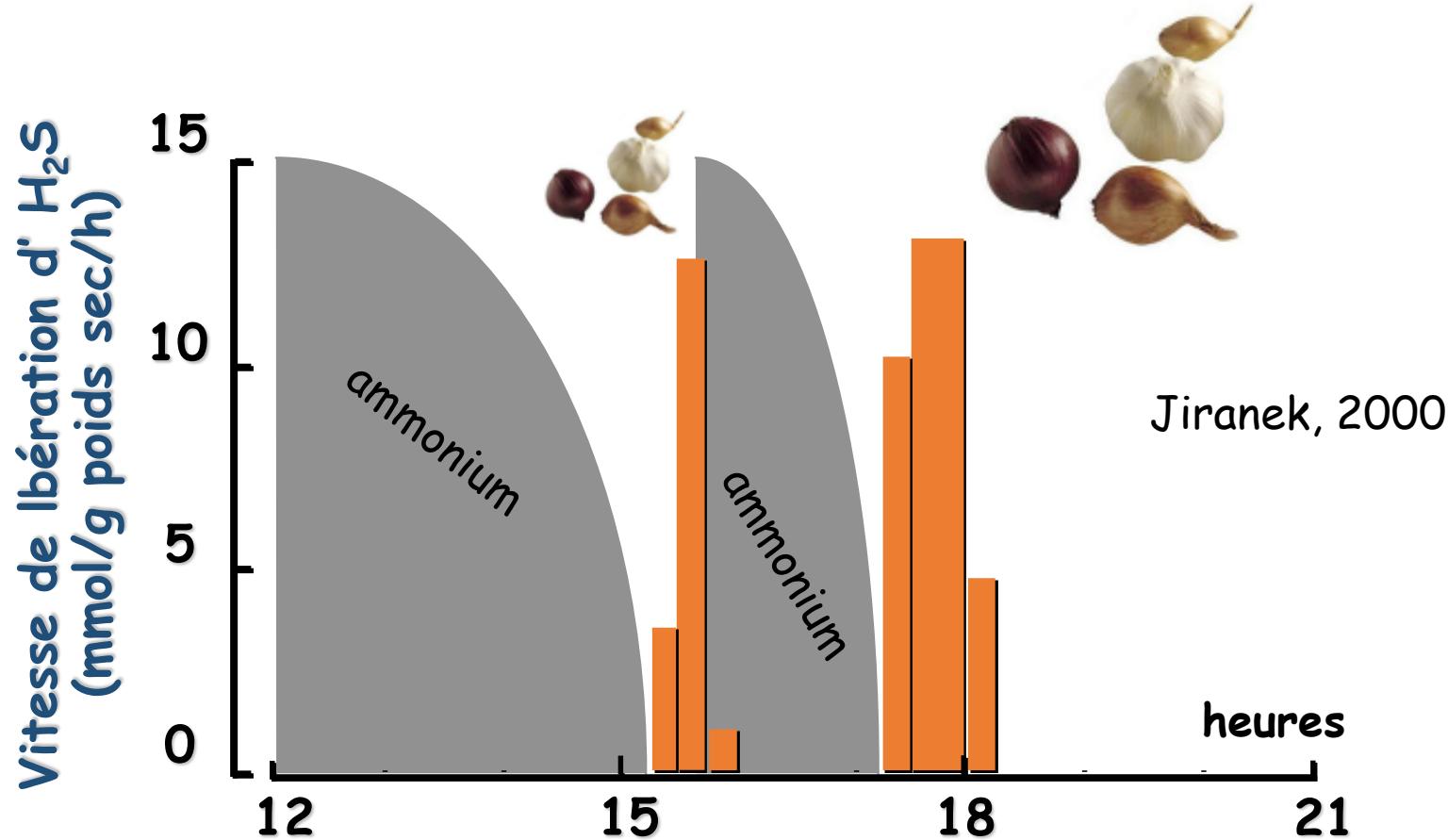
Teneurs en méthionol en fonction de la levure utilisée.  
(V. Lavigne Cruège, Seguin Moreau, ISVV Bordeaux, 2009)

# Impact de la source azotée sur la production de H<sub>2</sub>S

Azote: auto-consommation des acides aminés de la levure et conséquences

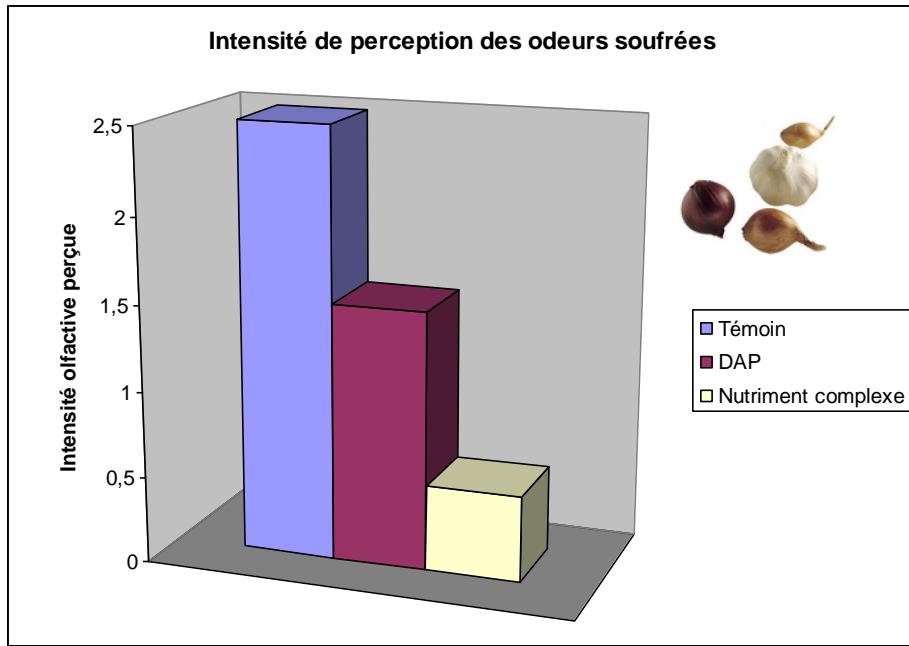


# Impact de la source azotée sur la production de H<sub>2</sub>S



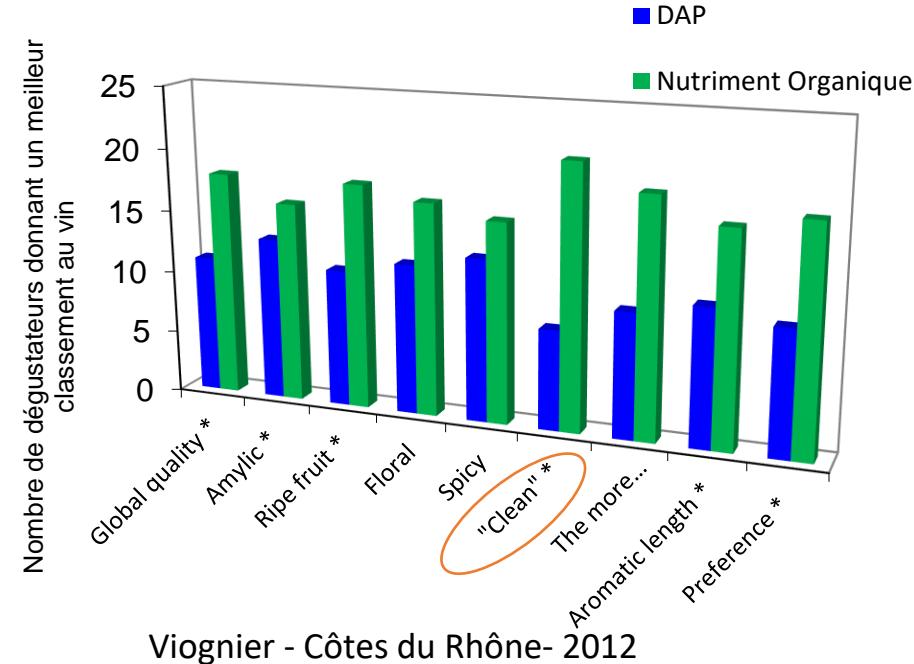
L'ajout de DAP entraîne plus de biomasse, qui est ensuite en carence, autoconsomme ses AA, libère des radicaux S<sup>2-</sup> et produit encore plus d'H<sub>2</sub>S

# Impact de la source azotée sur la production de H<sub>2</sub>S



Moût de Chardonnay (NFA : 140 mg/l) complété  
avec  
20 g/hl de « nutriment complexe » ou  
7.5 g/hl de DAP

Departement R&D ICV

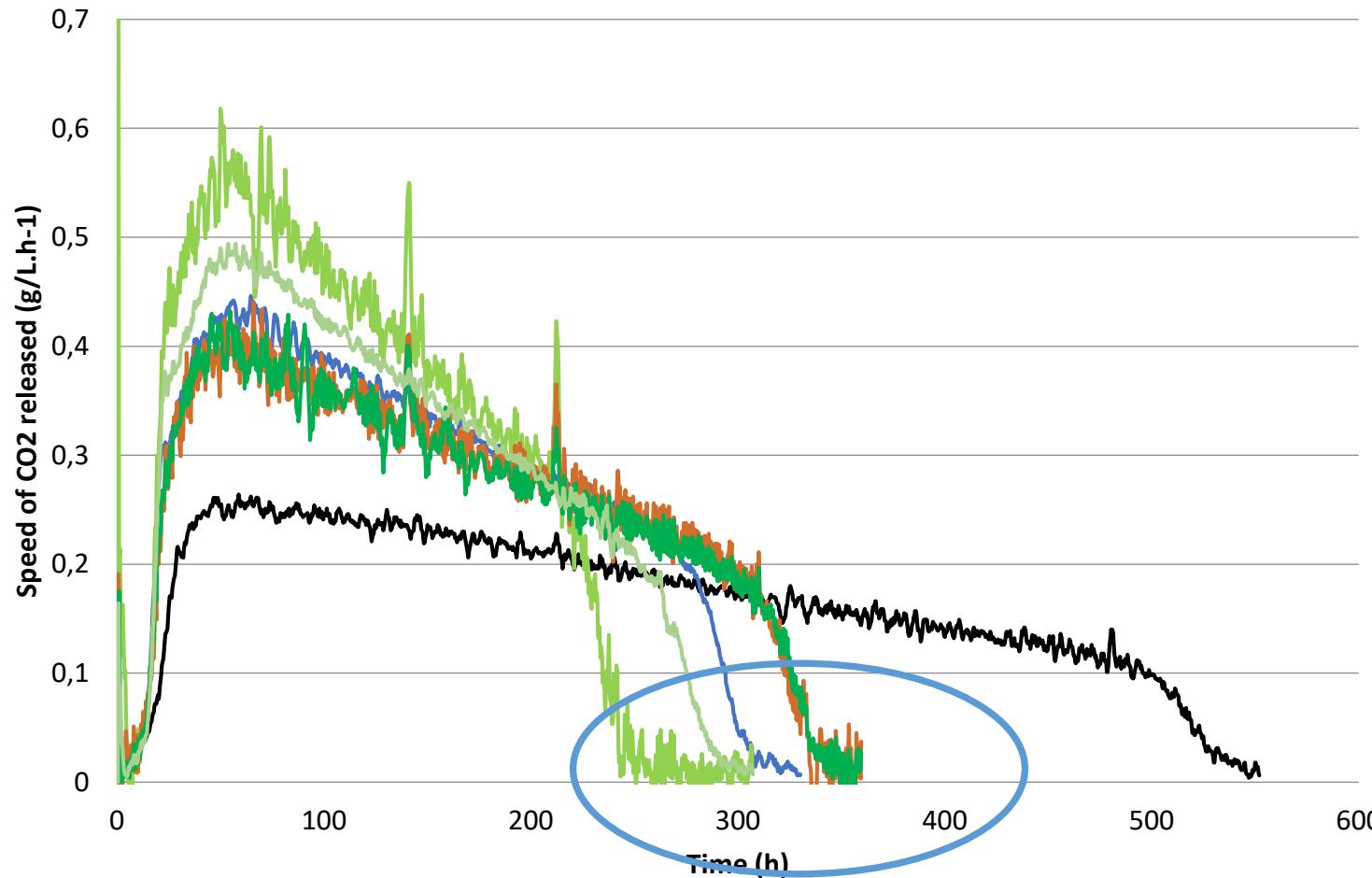


**Concentrate of apple juice 41% + glucose 59%: 200g/L**

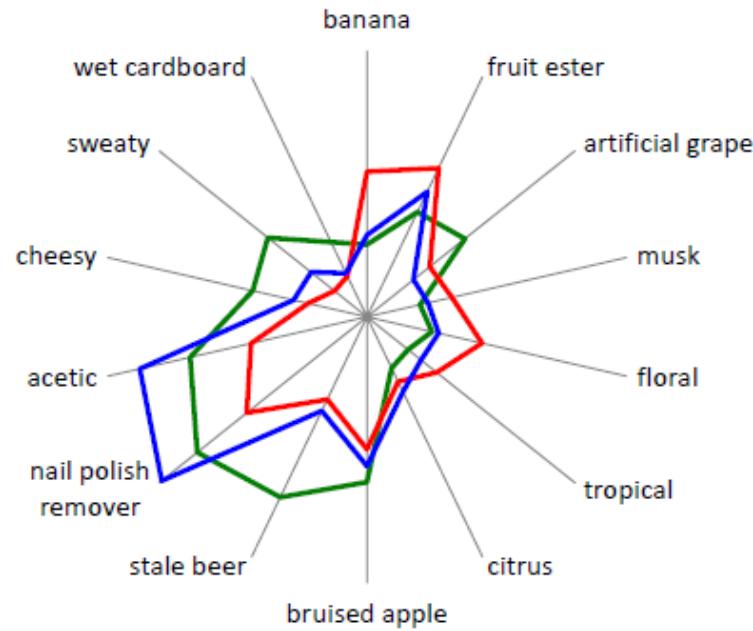
Dextrose 133g/L ; Fructose: 46g/l ; Sucrose 21g/L

YAN: 30mg/L ; PAN: 26mg/L +NH3: 4mg/L

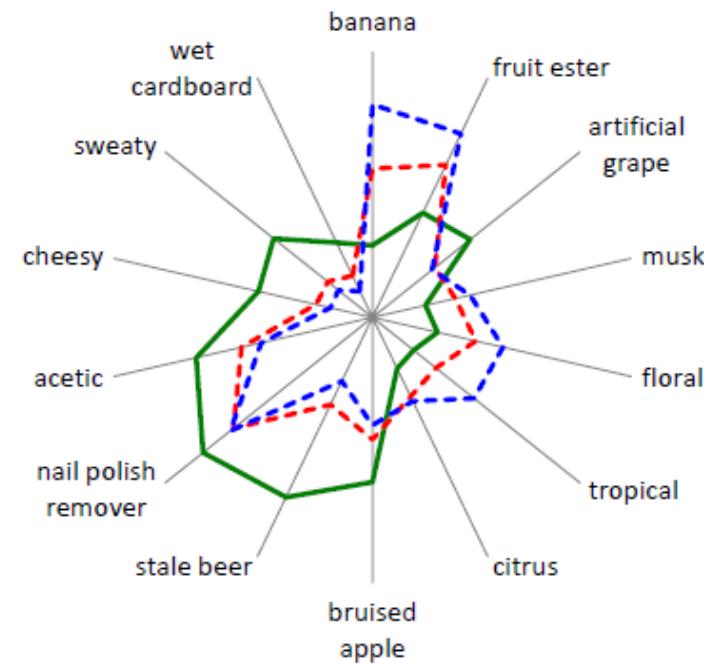
**Uvaferm BC: 25g/hL ; 22°C**



# Impact de la source azotée sur le profil sensoriel



— Control (160)  
- - NH<sub>4</sub> (320)  
- · - NH<sub>4</sub> (480)



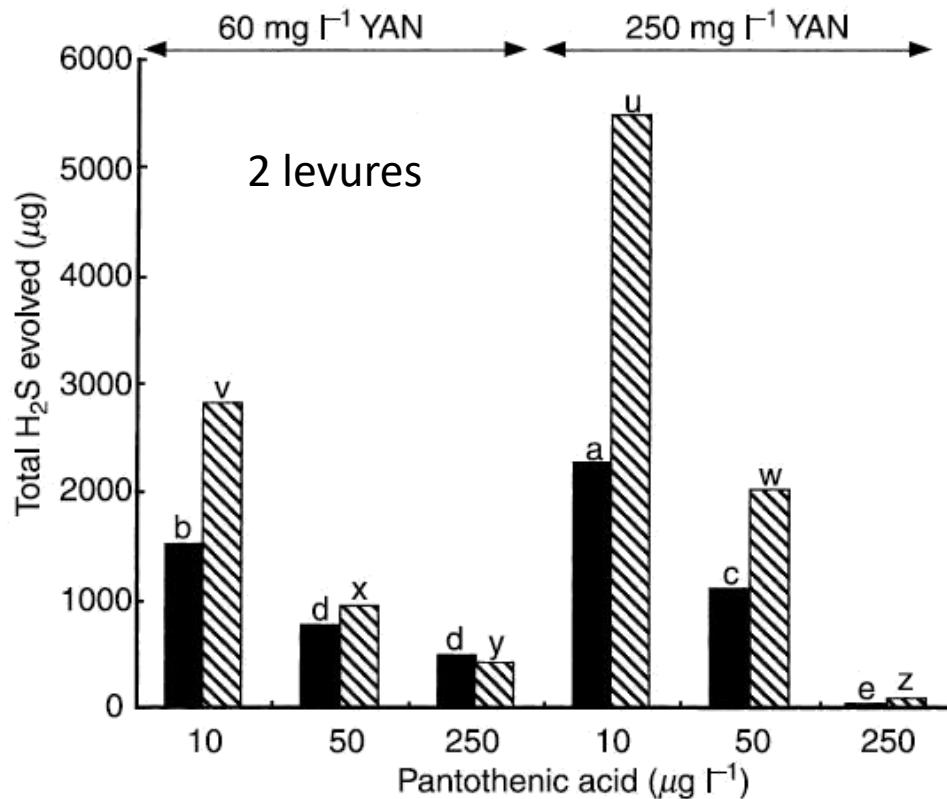
— Control (160)  
- · - AAC (320)  
- · - AAC (480)

L'ajout d'acides aminés

->meilleur impact que l'ajout de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> sur l'analyse sensorielle.

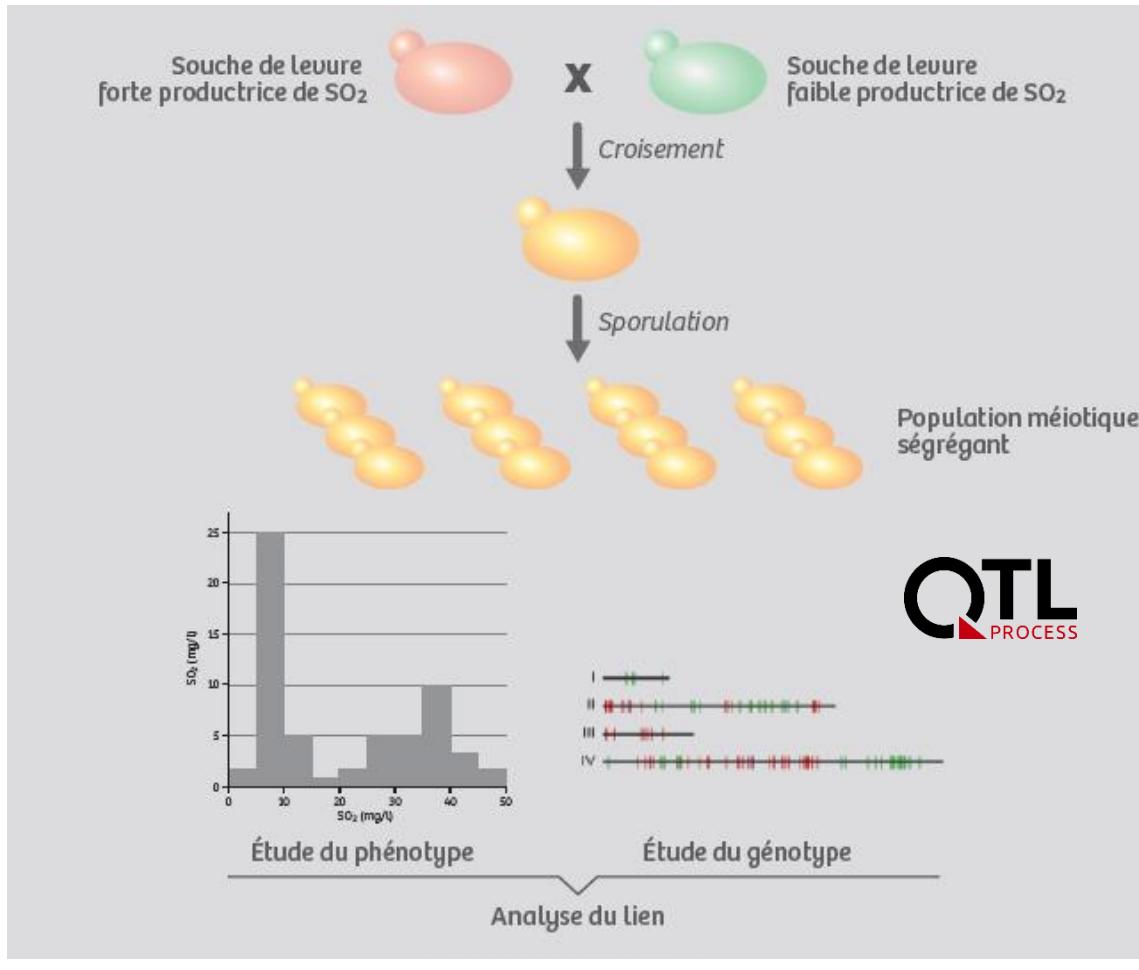
# Impact des autres nutriments sur la production de H<sub>2</sub>S (vitamines notamment)

## Acide pantothénique B5 (*Wang et al., 2002*)



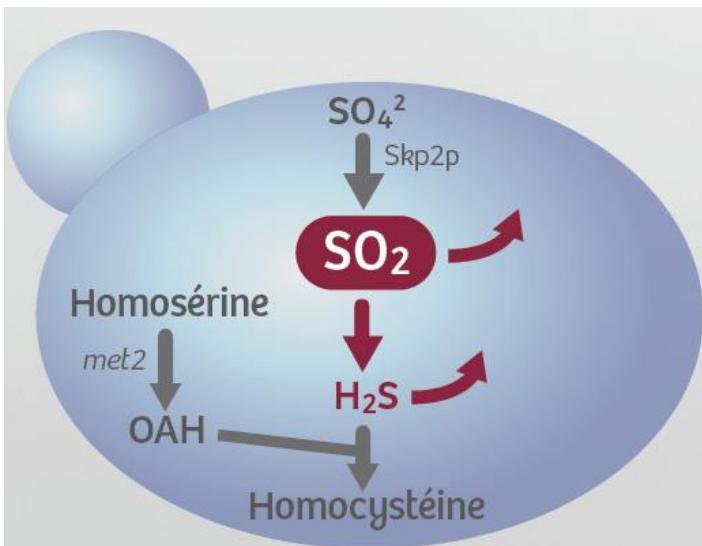
- Carence en pantothenate  
⇒ forte production d'H<sub>2</sub>S
- Augmentation de l'H<sub>2</sub>S si le pantothenate est déficient et l'azote élevé.
- Simple gestion de l'azote : très risqué et insuffisant pour assurer un profil qualitatif

# Identification des bases génétiques de la production de composés soufrés négatifs par la levure

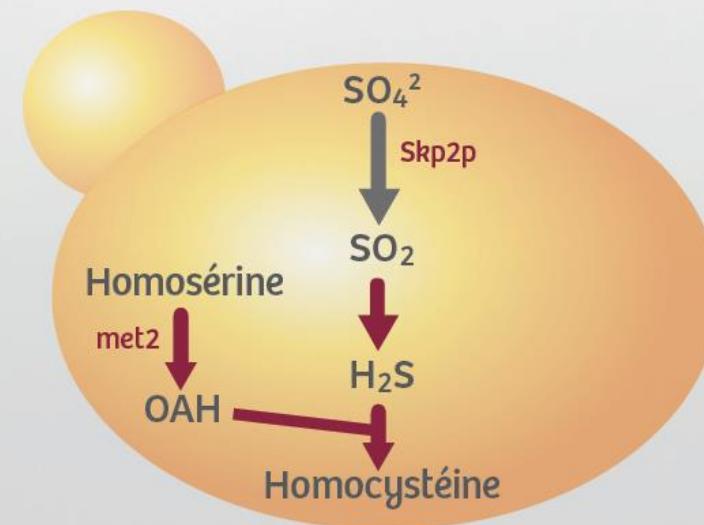


BREVET : "Méthode de contrôle de la production de SO<sub>2</sub>, d'H<sub>2</sub>S et d'acétaldehyde par des levures" PCT/IB2013/050623

# Des levures au métabolisme unique des composés soufrés et de l'éthanal

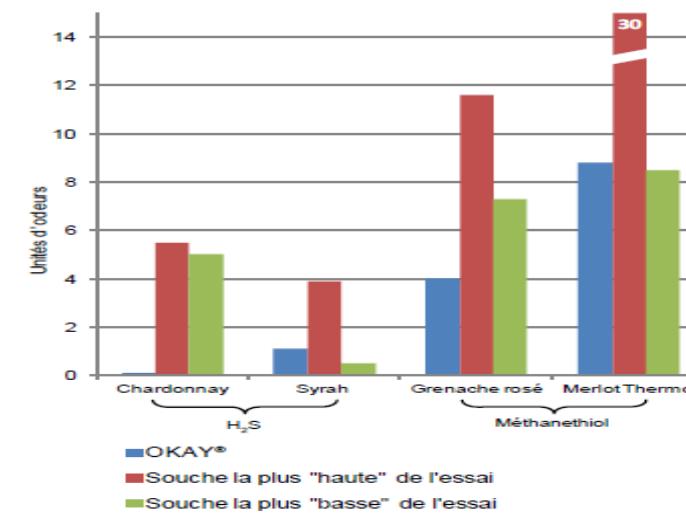
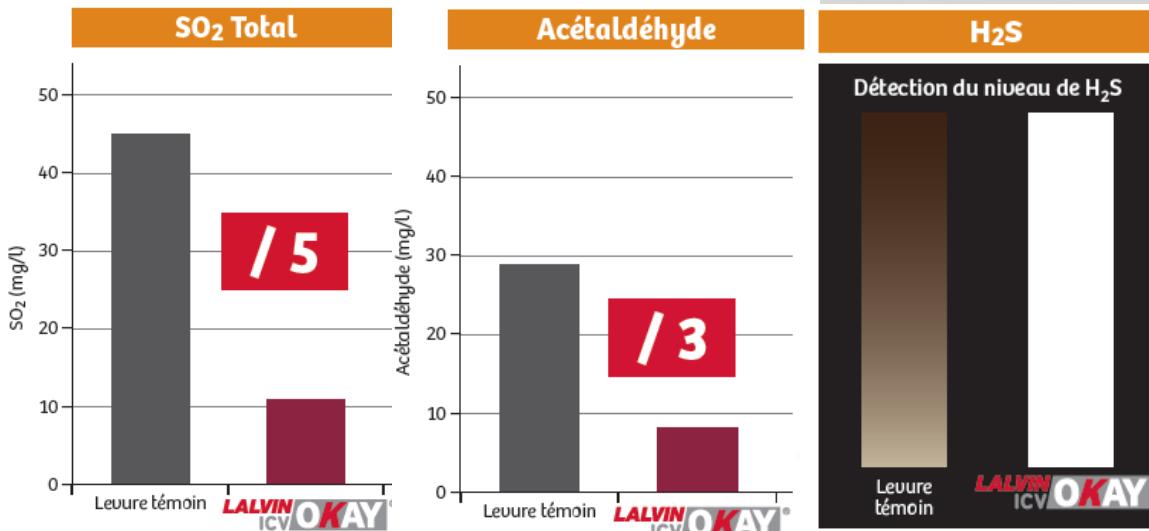


Souche à production élevée de sulfite



Souche à faible production de sulfite

## Contrôle simultané du $\text{SO}_2$ , de l' $\text{H}_2\text{S}$ et indirectement de l'acétaldéhyde





## ***PHÉNOLS VOLATILS***



# **Les phénols volatils**

## (sueur de cheval, pneu brûlé...)



# Resistance de *Brettanomyces* au SO<sub>2</sub> moléculaire

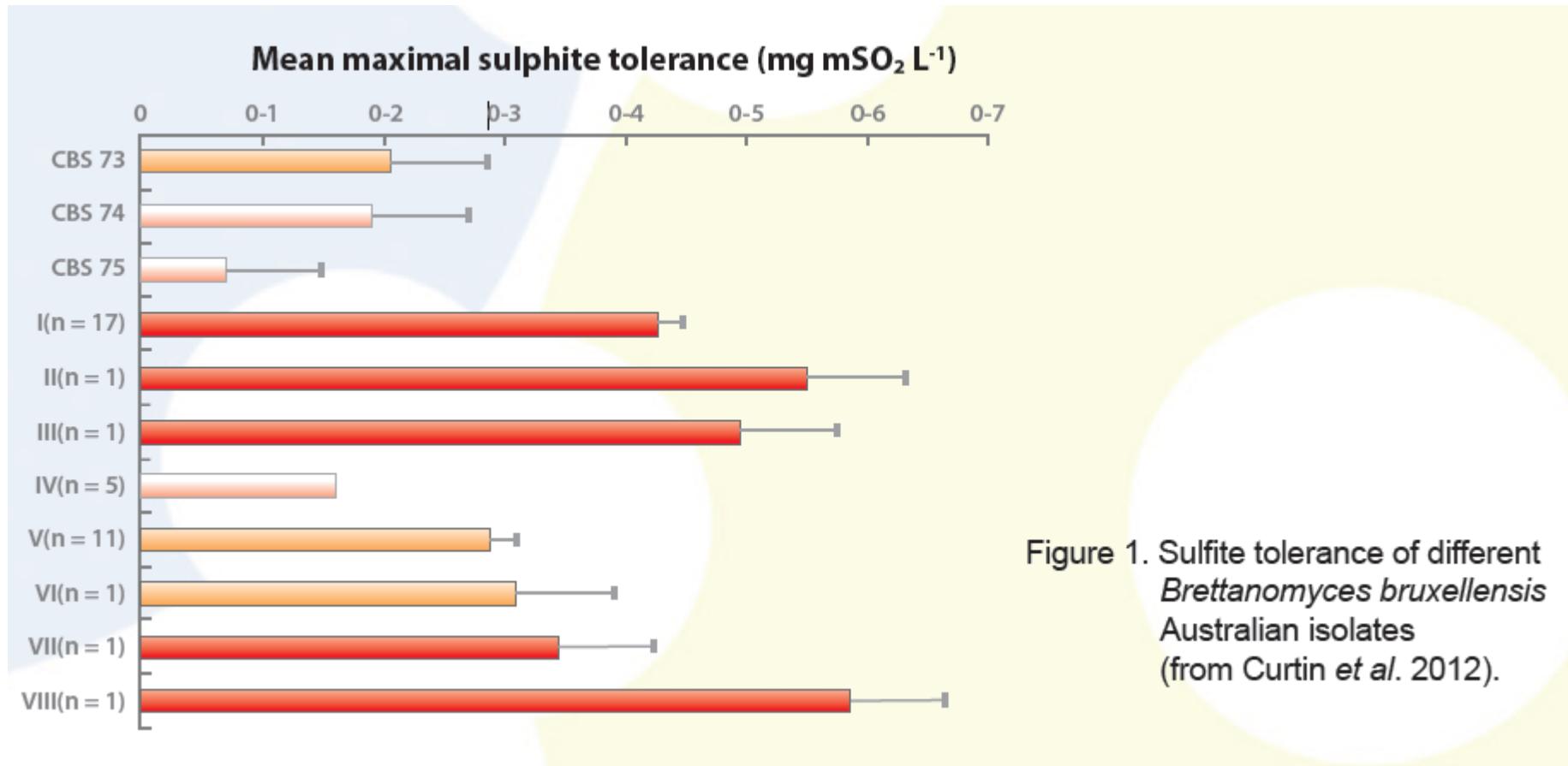


Figure 1. Sulfite tolerance of different *Brettanomyces bruxellensis* Australian isolates (from Curtin et al. 2012).

L'outil SO<sub>2</sub> pour limiter le développement de *Brettanomyces* a ses limites... en particulier pour éviter la croissance de certaines souches particulièrement résistantes au SO<sub>2</sub>.

# La maîtrise des flores indigènes : impact du levurage sur *Brettanomyces*

**Tableau 1. Influence du levurage et du sulfitage sur une vendange contaminée par *Brettanomyces* (pinot noir – 2004).**

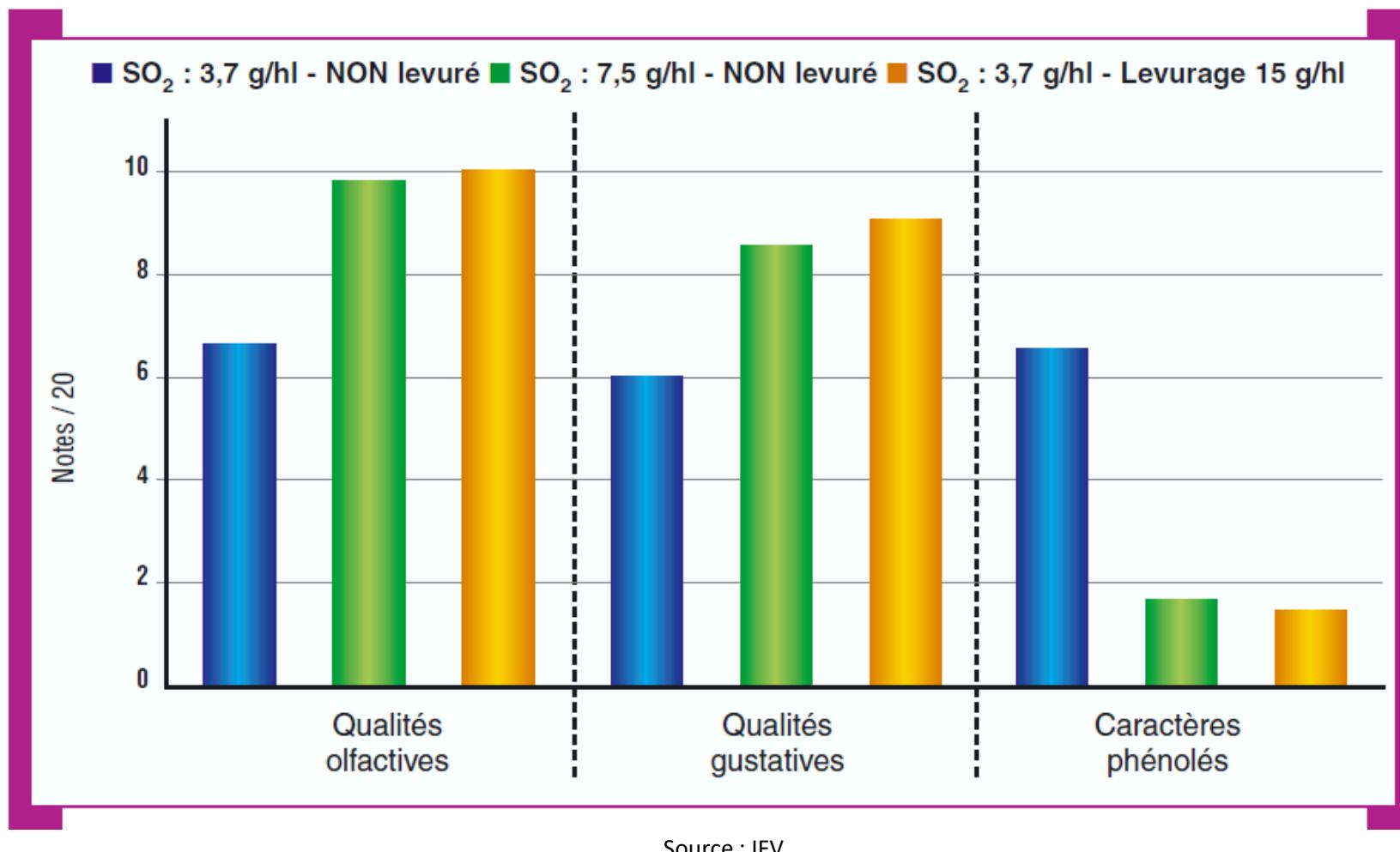
	Vin issu d'une vendange faiblement sulfitée (3,7 g/hl) et NON levurée	Vin issu d'une vendange normalement sulfitée (7,5 g/hl) et NON levurée	Vin issu d'une vendange faiblement sulfitée (3,7 g/hl) et levurée
<i>Brettanomyces</i> en fin de FA (ufc/ml)	40 000	3 000	700
Phénols volatils en fin de FA (µg/l)	94	12	17
Phénols volatils en fin de FML (µg/l)	467	68	75

Source : IFV

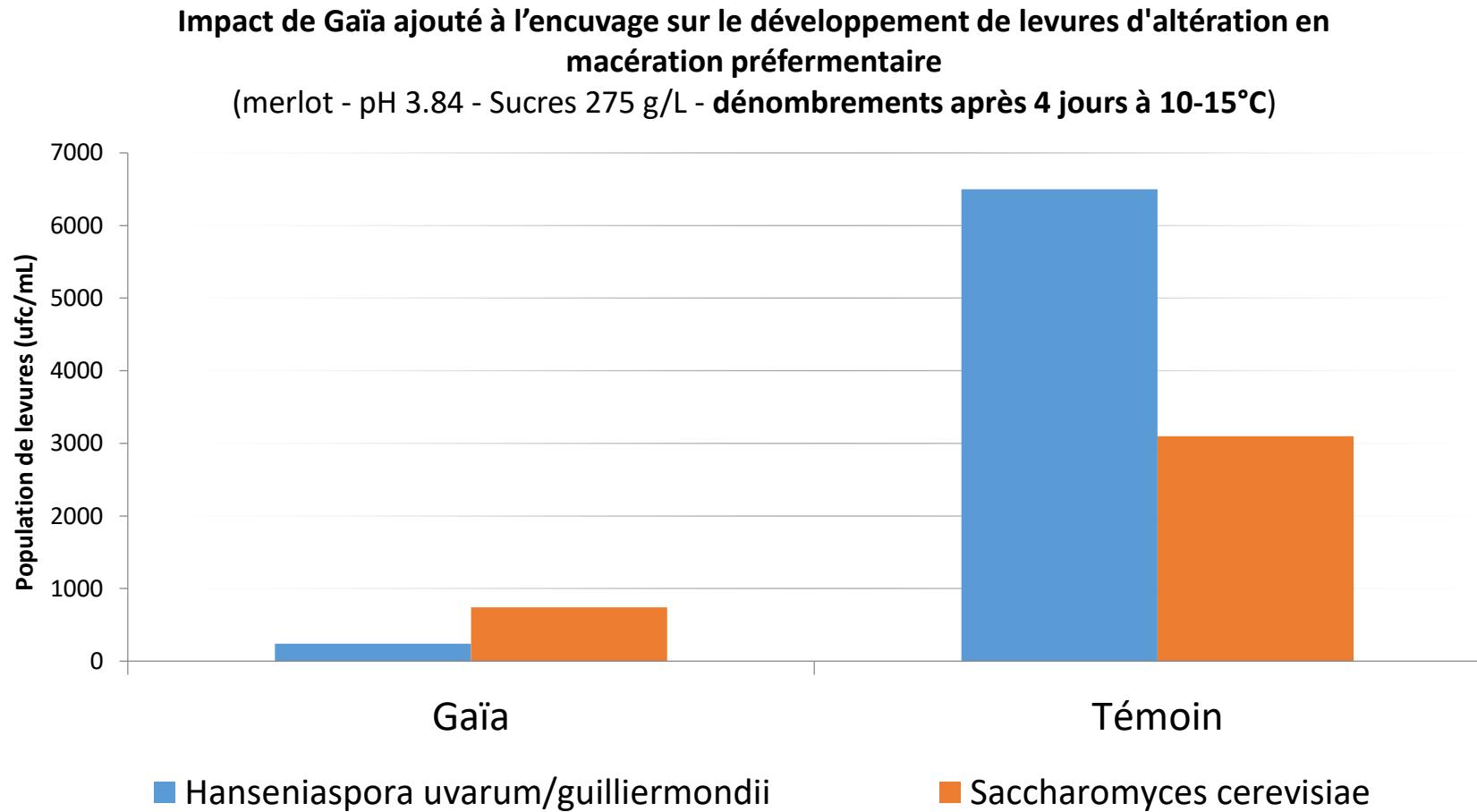
Même un sulfitage important ne permet pas une réduction des contaminations en *Brettanomyces*.

Un levurage précoce couplé à un sulfitage demi-dose est efficace

# La maîtrise des flores indigènes : impact du levurage sur les défauts liés à une contamination par *Brettanomyces*

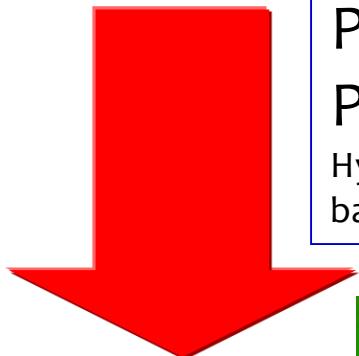


# *Metschnikowia fructicola* Gaïa<sup>TM</sup> : biocontrôle des flores contaminantes en MPF

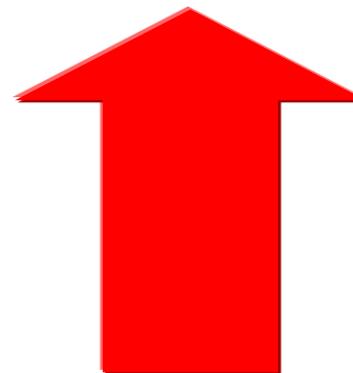
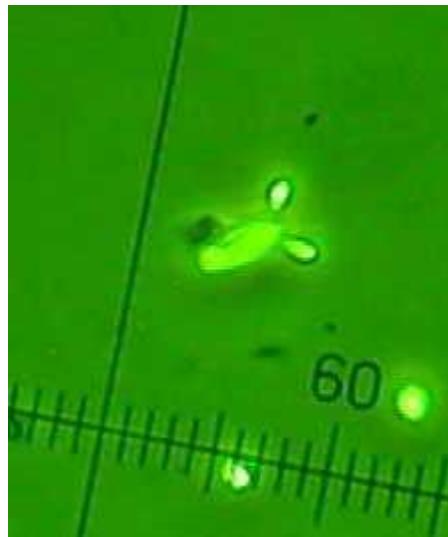


# Développement des *Brettanomyces*

“... entre fin de FA et début de FML , période propice au développement des brett...”



Peu SO<sub>2</sub>  
Ph > 3,5  
Hygiène /élevage en barrique

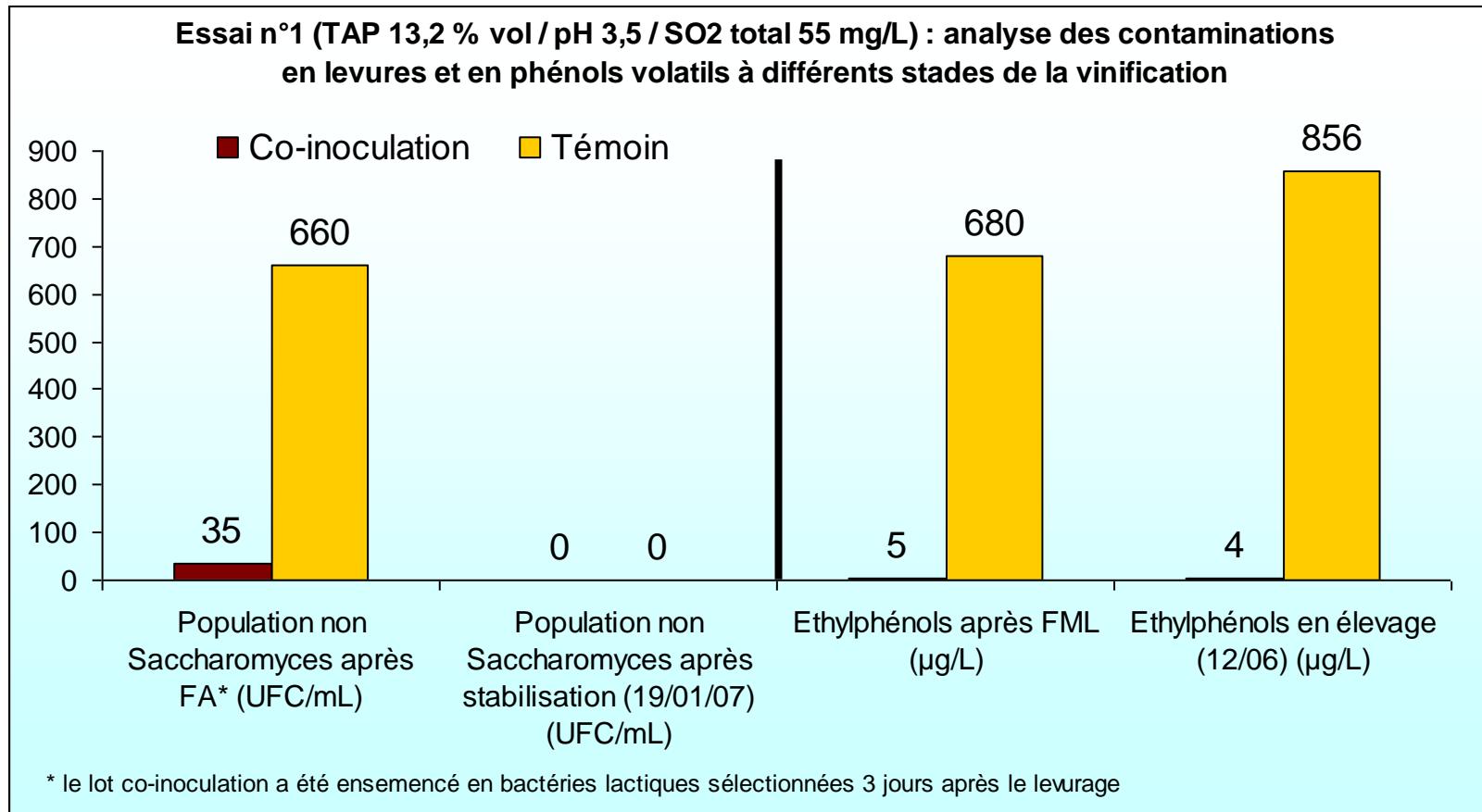


Risque de développement des brett



# La maîtrise des flores indigènes : impact des bactéries sélectionnées (notamment en co-inoculation) sur *Brettanomyces*

Occuper le terrain...  
... pour lutter contre *Brettanomyces*



# La maîtrise des flores indigènes : impact de l'utilisation des bactéries sélectionnées sur *Brettanomyces*



## Influence of Inoculation with Malolactic Bacteria on Volatile Phenols in Wines

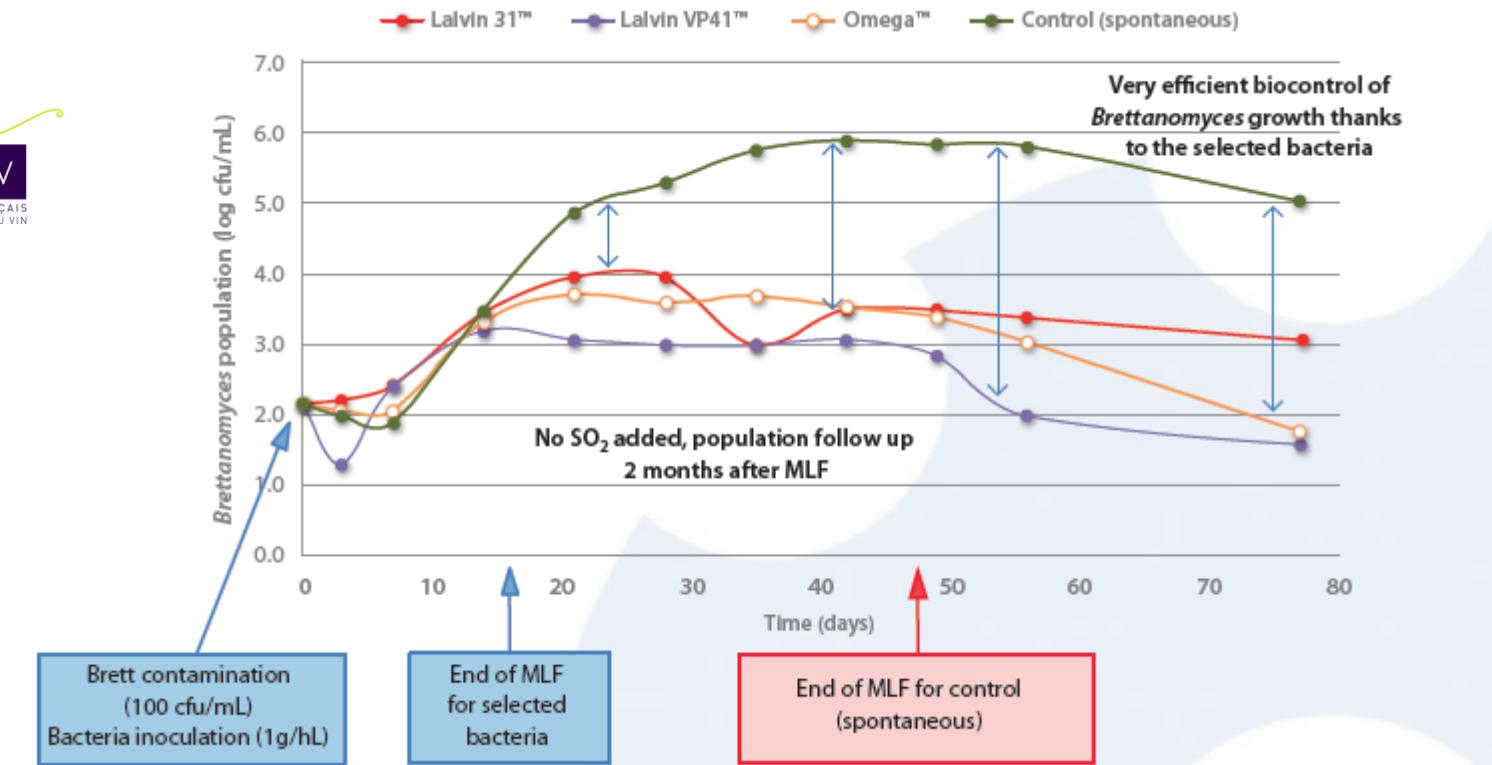
Vincent Gerbaux, Carole Briffox, Ann Dumont, Sibylle Krieger

American Journal of Enology and Viticulture, 60:2 2009; 233-236

	Bacteria	Timing of addition	4-EP (µg/L)	4-EG (µg/L)
Pinot noir	Bactérie A	End of AF	46	20
	Bactérie B	End of AF	32	15
	Spontaneous	-	1119	551
Cabernet-Franc	Bactérie A	Co-inoculation	Total = 5	
	Spontaneous	-	Total = 680	
Cabernet-Sauvignon	Bactérie A	Co-inoculation	205	78
	Spontaneous	-	1667	349

Des données plus récentes...

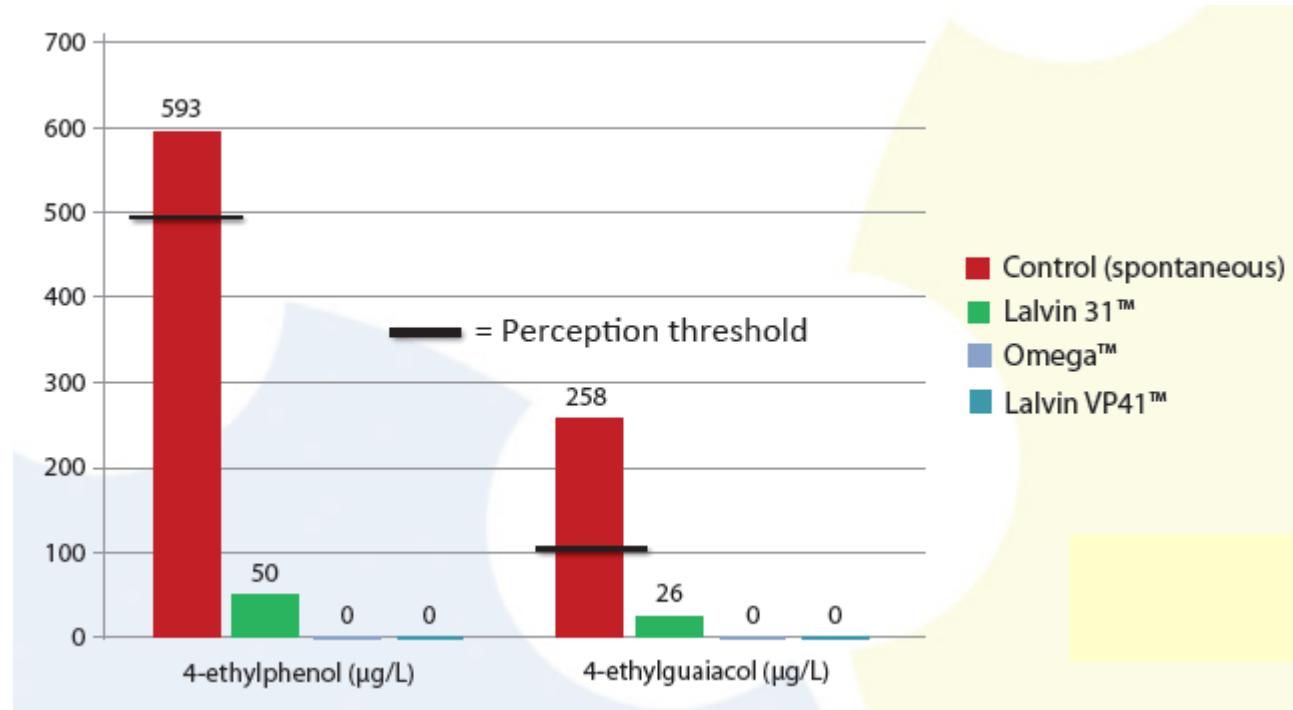
# Compétition entre les populations bactériennes et *Brettanomyces* (Pinot noir 2016)



L'inoculation en bactéries sélectionnées limite significativement le développement de la population de *Brettanomyces*.

On observe des écarts de 2 log entre les populations *Brettanomyces* des modalités inoculées et non inoculées en bactéries sélectionnées.

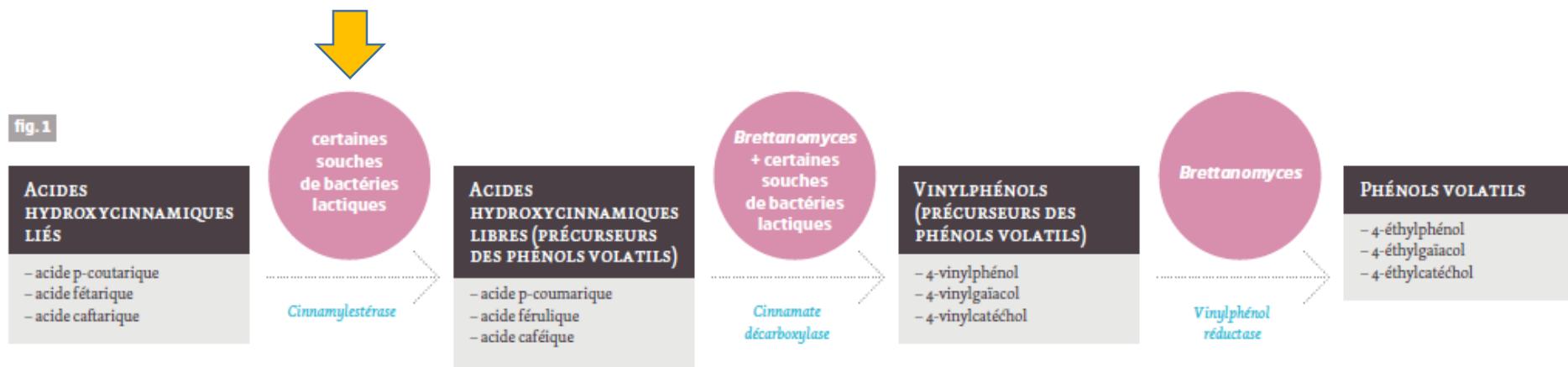
# Conséquences: teneurs en phénols volatils



Les différences de populations en *Brettanomyces* dans les différentes modalités se traduisent par des écarts extrêmement importants en niveaux de phénols volatils.

Certaines bactéries lactiques peuvent aussi avoir un rôle sur la teneur en précurseurs de phénols volatils...

# voie de biosynthèse des phénols volatils

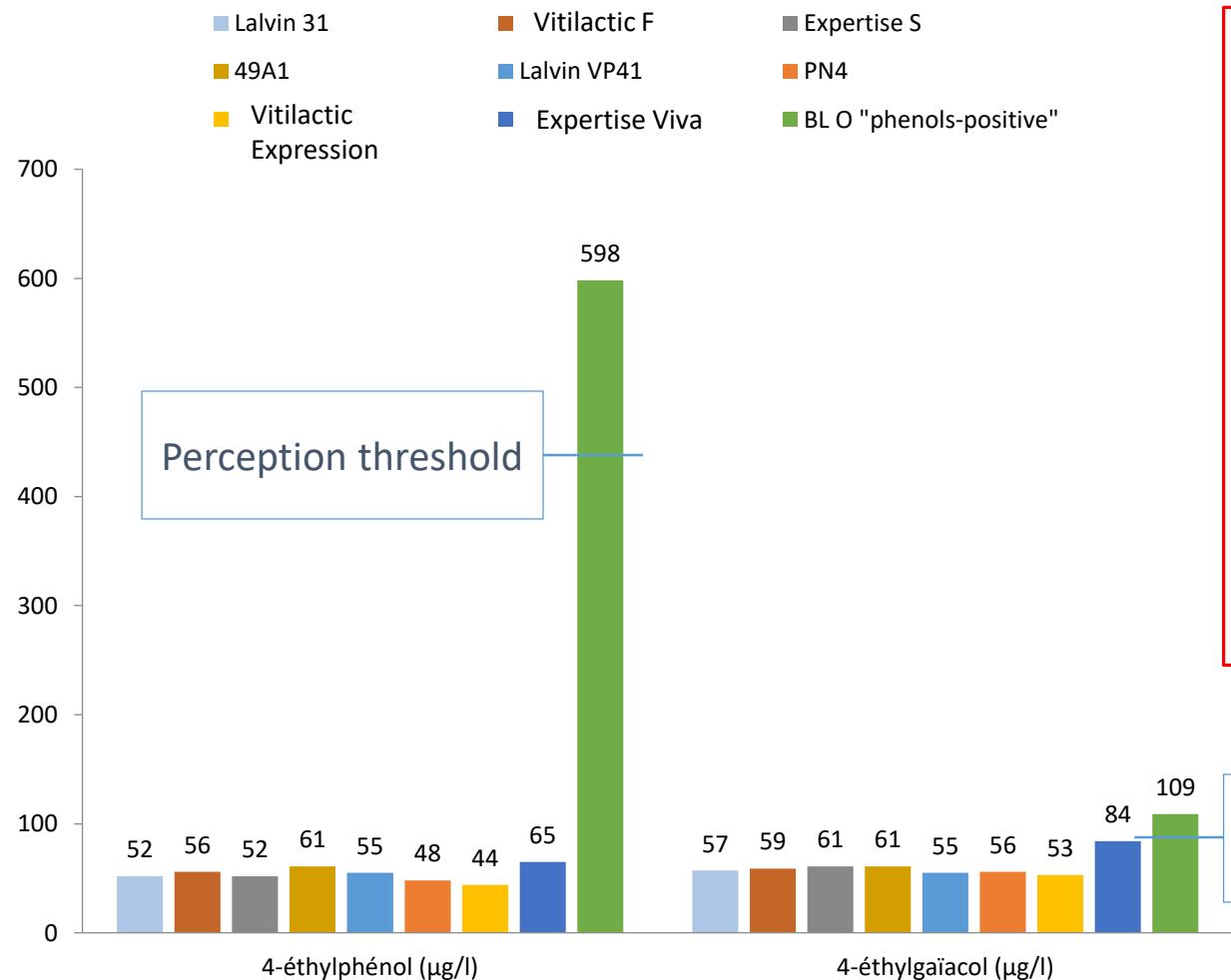


- Les acides hydroxycinnamiques sont naturellement présents sous forme liée et libre
- Seules les formes libres peuvent être transformées en phénols volatils par *Brettanomyces bruxellensis*
- Donc, toute conversion de la forme liée vers la forme libre (cinnamylestérase) est susceptible d'augmenter la quantité de phénols volatils en cas de contamination par *Brettanomyces*. Voies de conversion:
  - Transformation chimique (conditions acides – processus long, plutôt pendant l'élevage/stockage)
  - Voie enzymatique, après ajout de certaines enzymes durant la macération
  - **Action de certaines bactéries lactiques !!!**

# Biocontrôle de *Brettanomyces* par les bactéries sélectionnées

## Attention à la souche utilisée !

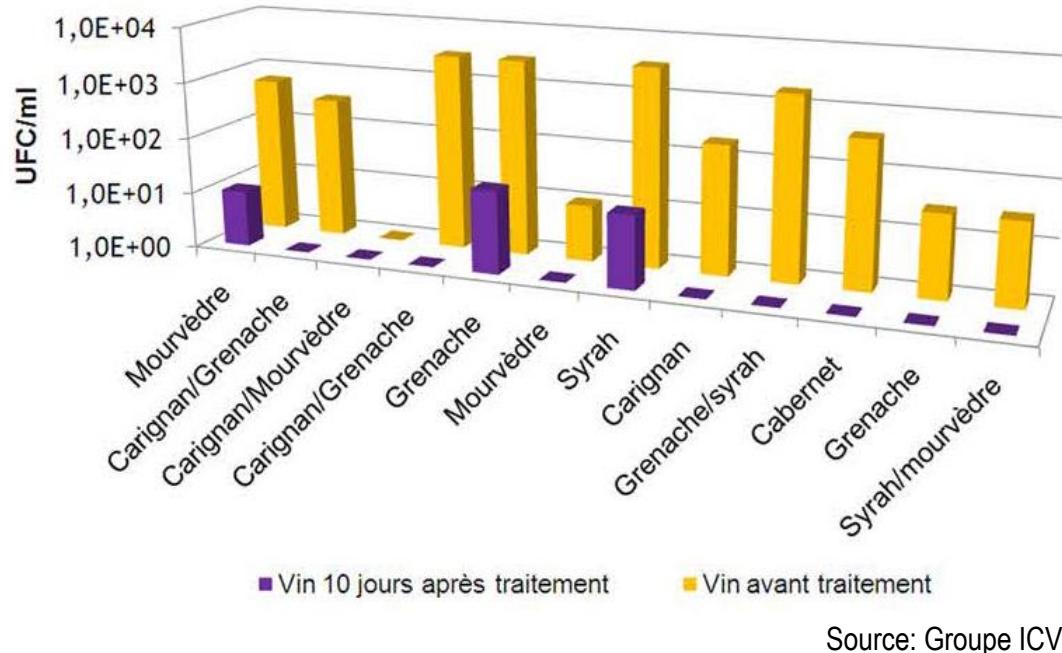
### Impact on volatile phenols production depending on the selected bacteria inoculated



Les bactéries «Phenols-positive» (avec activité cinnamyl esterase) représentent un risque accru en cas de contamination en *Brettanomyces* sur la production des phénols volatils, alors que les bactéries « phenols-negative » non.

Perception threshold

# Chitosane d'origine fongique, la vraie alternative contre *Brettanomyces*



**NO  
BRETT  
INSIDE**

- Naturel
- Respectueux de l'environnement
- Non allergène
- Facile à mettre en œuvre

## Essais sur vins contaminés naturellement en *Brettanomyces*.

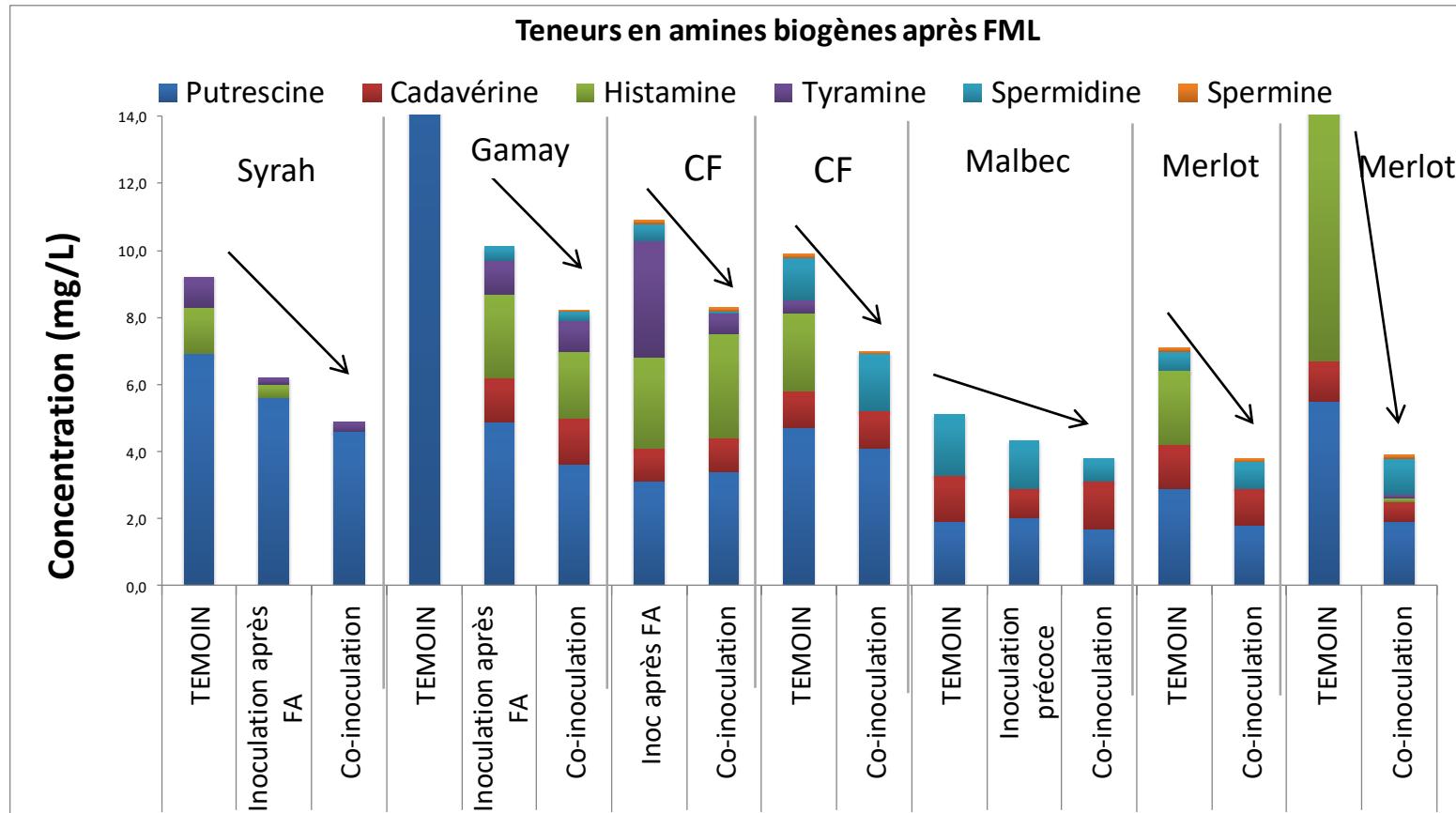
Dénombrement sur milieu gélosé spécifique des *Brettanomyces bruxellensis* (UFC/mL) à T=0 et T=10 jours après traitement avec NO BRETT INSIDE à 4g/hL.

Source: Laboratoire IOC Nuits-Saint-Georges.

# Intérêt des bactéries sélectionnées et de la co-inoculation dans la maîtrise des teneurs en amines biogènes

Occuper le terrain...

... pour lutter contre les autres bactéries contaminantes  
(productrices d'amines biogènes par exemple)



# Mécanisme de formation des amines biogènes



## Décarboxylation des acides aminés

Ex.: histamine par histidine décarboxylase

- Certaines amines biogènes peuvent être **toxiques pour la santé** (histamine) et d'autres ont un **impact aromatique négatif** (putrescine et cadavérine) et peuvent induire même à faible concentration un effet « masque » sur les arômes aromatiques des vins
- Des pays peuvent imposer des **limites maximales en amines biogènes totales**(marchés exports)

# Analyses microbiologiques dans un cidre PCR-PMA levures et bactéries totales



Microorganismo	Population initiale	Population finale (10g/hL SO2 + 10g/hL Bactiless)	Population finale (20g/hL Bactiless)
Acetobacter aceti (1)	1,00E+06	9,30E+04	4,00E+04
Lactobacillus brevis (2)	1,10E+05	7,10E+03	3,70E+03
Lactobacillus kunkeei	nd	nd	nd
Lactobacillus paracasei	nd	nd	nd
Lactobacillus plantarum (5)	nd	nd	nd
Oenococcus oeni	4,10E+05	2,30E+04	6,50E+03
Pediococcus (3)	1,20E+06	1,90E+04	5,20E+03
Saccharomyces cerevisiae	4,70E+04	1,40E+03	1,20E+03
Brettanomyces (4)	2,80E+04	7,50E+02	4,40E+01
Zygosaccharomyces Bailii	nd	nd	nd

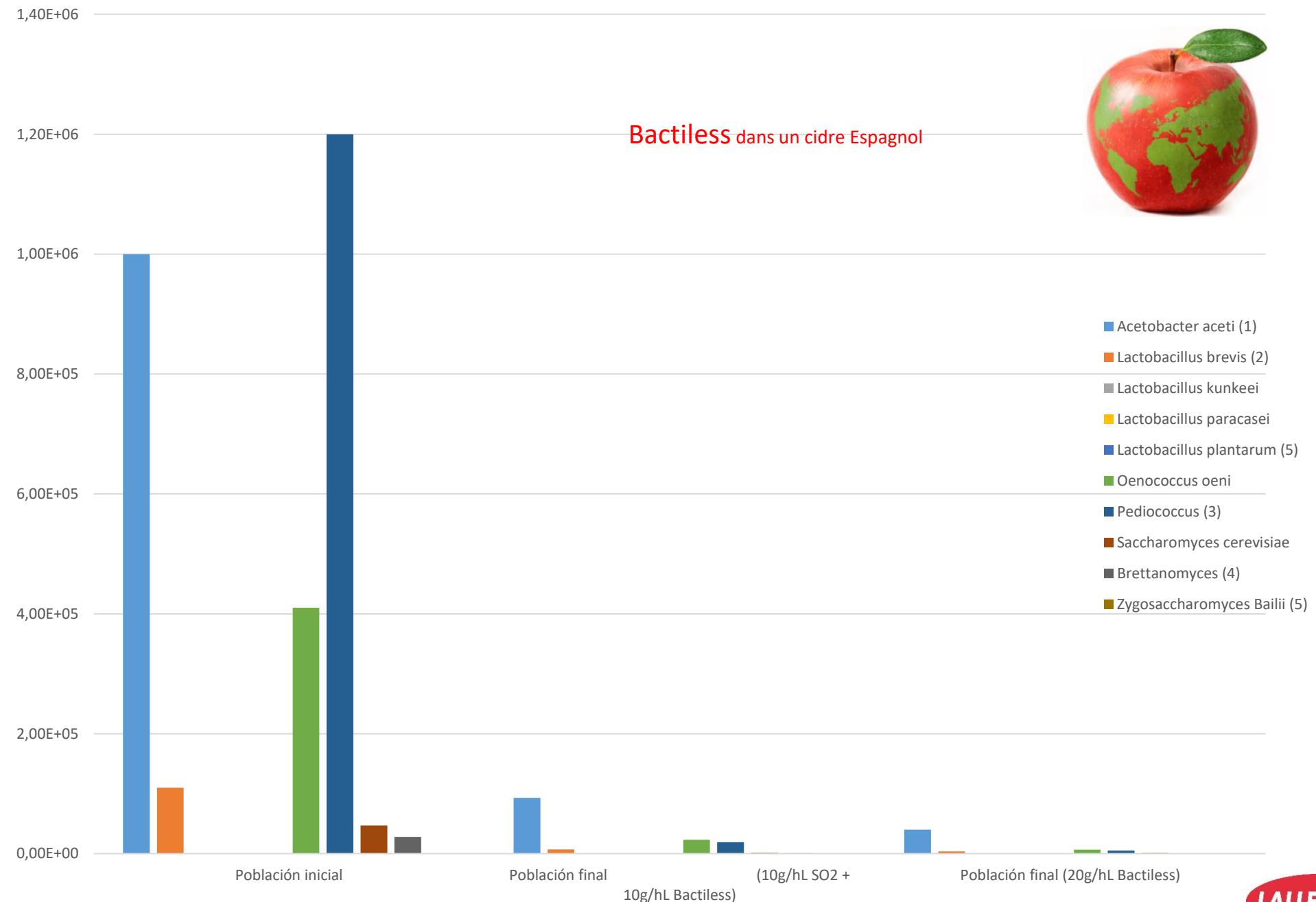
(1) = *Acetobacter aceti*, *pasteurianus*,  
*Gluconobacter oxidans*

(2) = *Lactobacillus brevis*, *hilgardii*, *fermentum*,  
*collinoides*, *buchneri*, *fructivorans*

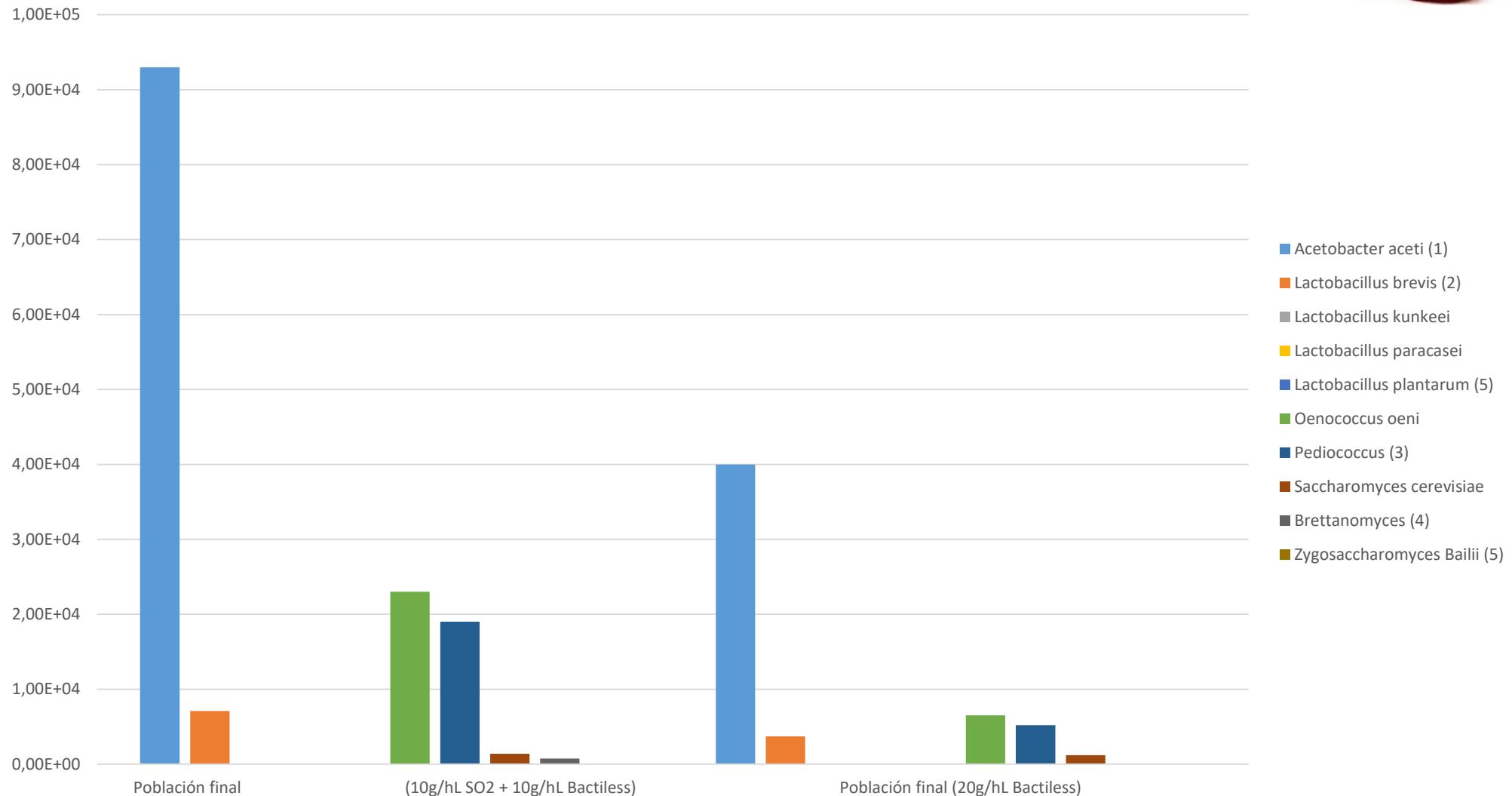
(3) = *Pediococcus damnosus*, *parvulus*, *inopinatus*,  
*pentosaceus*, *acidilactici*

(4) = *Brettanomyces bruxellensis*, *anomala*

(5) = *Lactobacillus plantarum*, *paracasei*, *casei*,  
*nagelii*, *mali*



# Comparaison entre les 2 traitements





***DIACETYL***

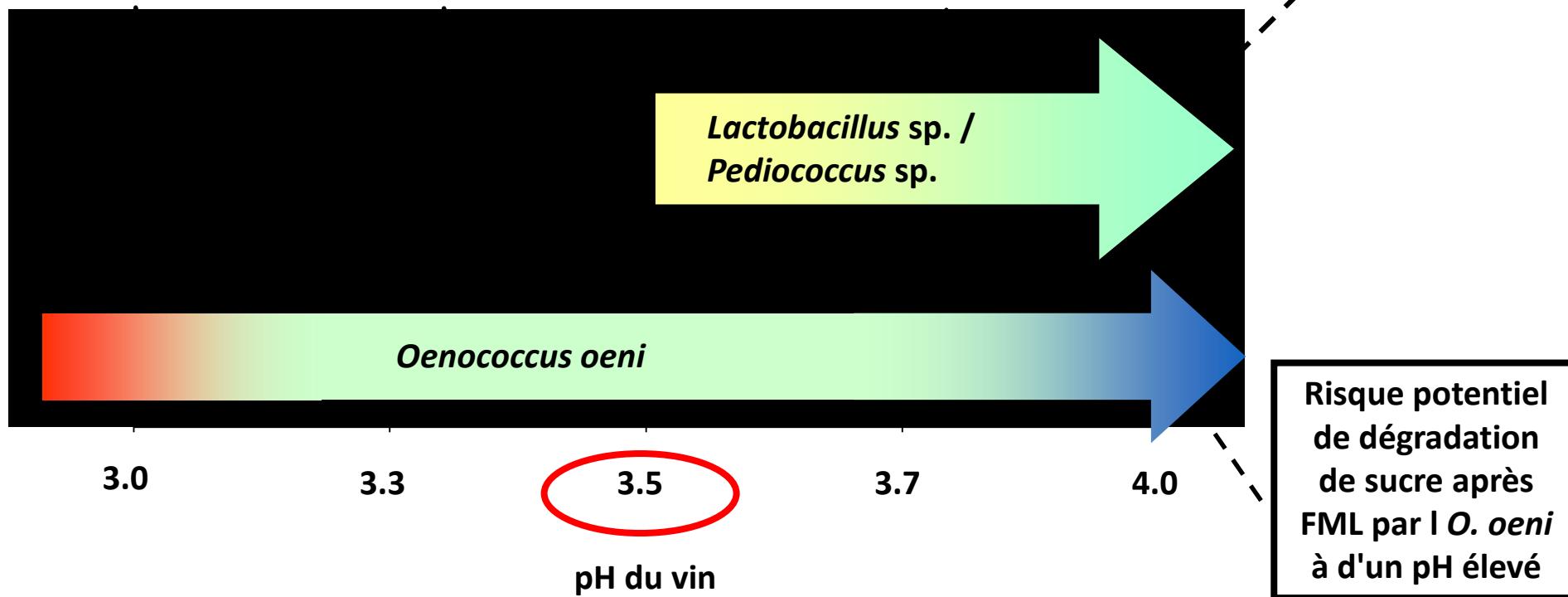


# Risque potentiel d'une FML spontanée - *Influence du pH*

La FML est très difficile à faire

Conditions où la FML spontanée peut être lente à démarrer

Risques importants : la FML spontanée se fait en présence de *Lactobacillus* & *Pediococcus* OFF-FLAVORS – MAUVAIS GOUTS



# Diacetyl: Impact sur le profil sensoriel

## Diacetyl:



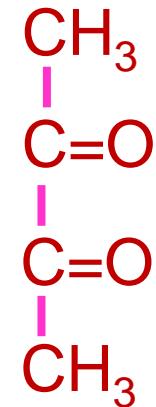
volatile – “beurre, noix” aromes/gustatif

- Seuil de detection très bas.

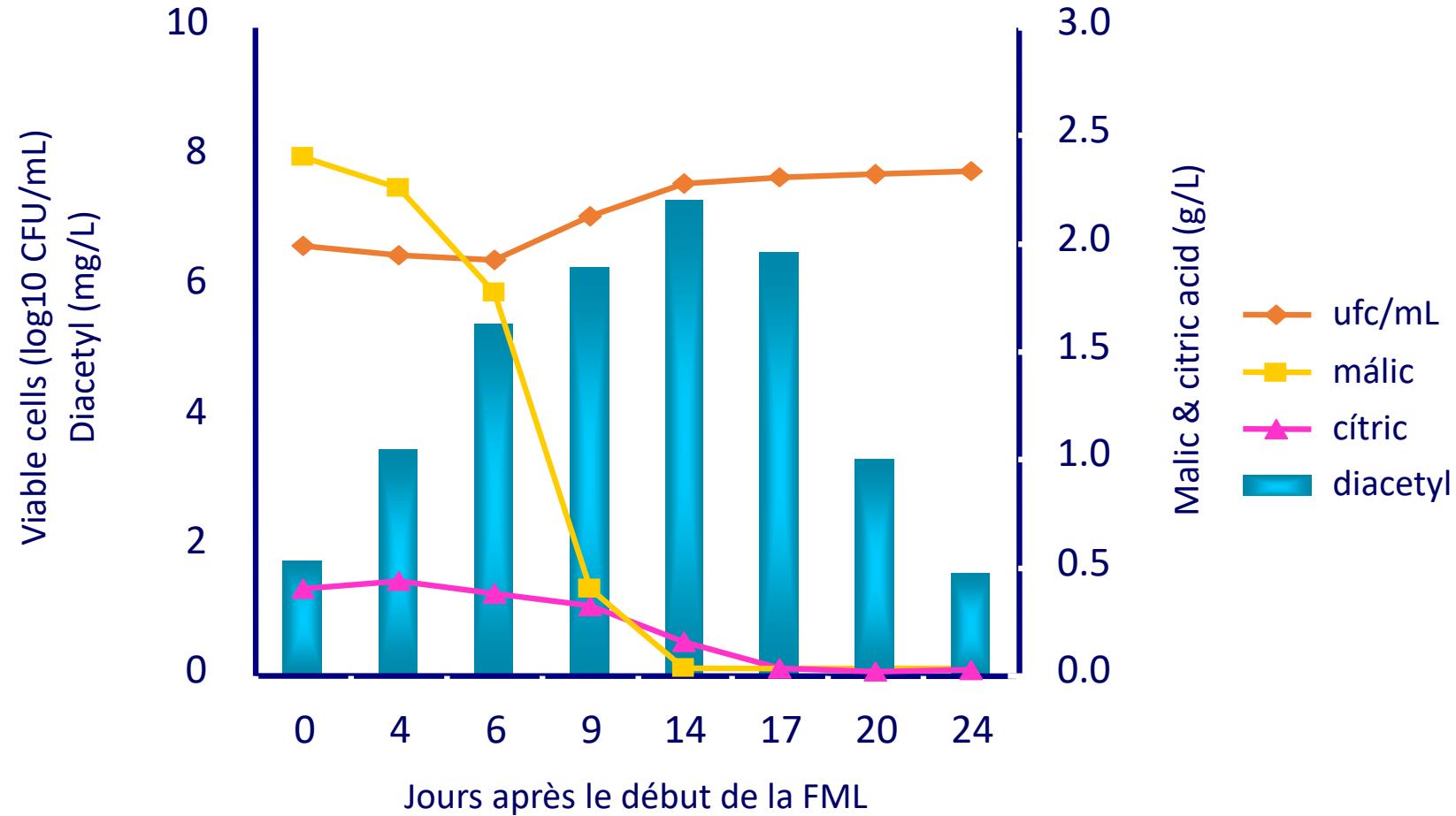
5-14 mg/l beurre

2-4 mg/l noix, caramel, miel.

Chardonnay	0.2 mg/L
Pinot Noir	0.9 mg/L
Cabernet Sauvignon	2.8 mg/L



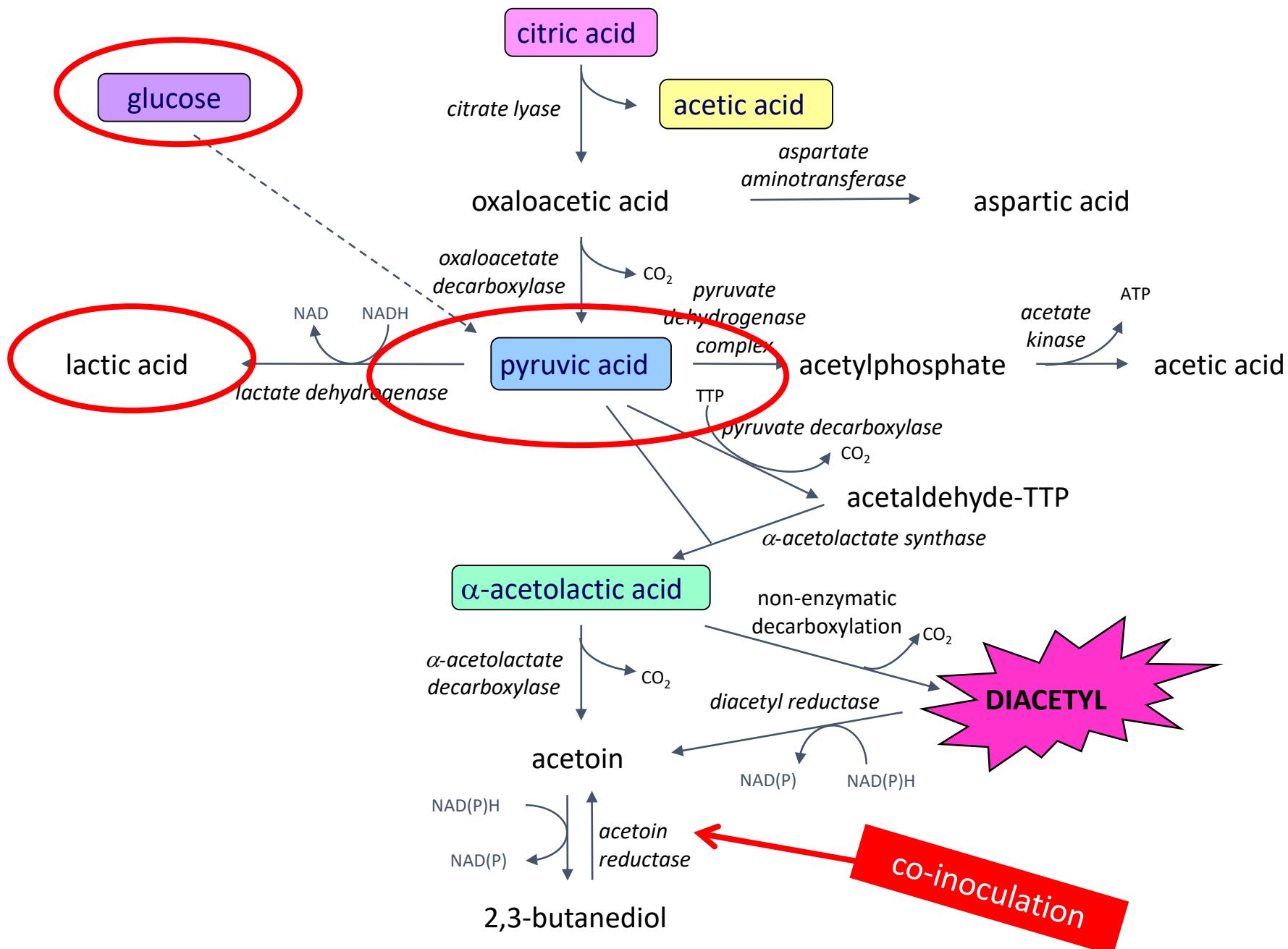
## Diacetyl – formation pendant et après la FML.



Cabernet Sauvignon.  
Barossa & Eden Valley blend  
Strain III (12.5 % alcohol)

Bartowsky & Henschke.



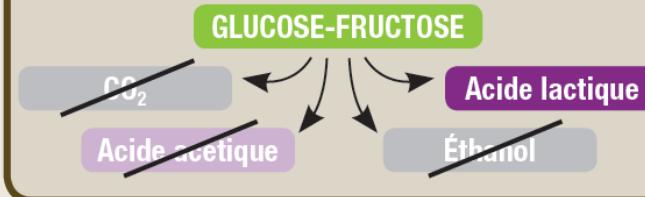


# La maîtrise des flores indigènes : l'importance d'une stabilisation rapide

## ML Prime™

### LE MÉTABOLISME DES BACTÉRIES

Métabolisme hétérofermentaire facultatif  
(métabolisme de ML Prime™)



Métabolisme hétérofermentaire obligatoire  
(métabolisme classique des bactéries œnologiques sélectionnées)



Un nouveau concept de bactérie œnologique pour une co-inoculation en toute sécurité et une FML réalisée en un temps record (3 à 10 jours en moyenne !)

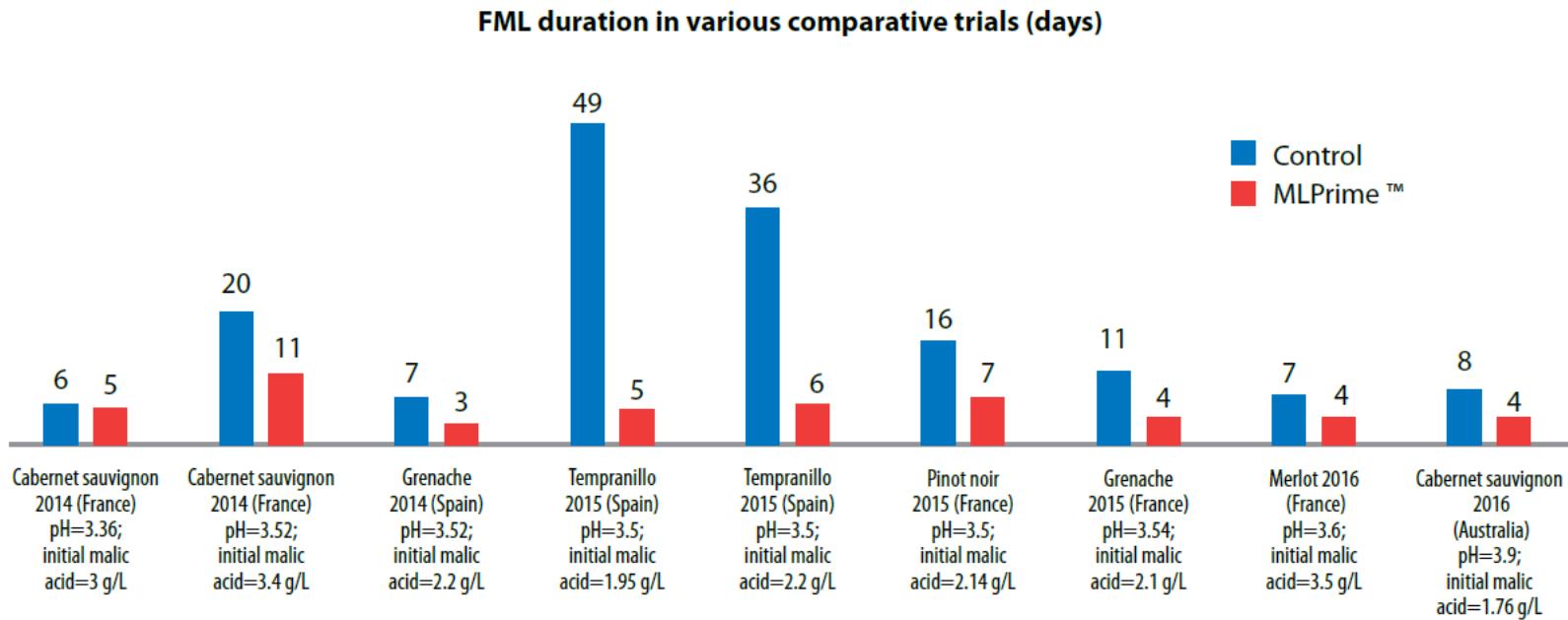
Zéro risque de montée d'acidité volatile

	ACIDITÉ VOLATILE EN FIN DE FERMENTATION ALCOOLIQUE (FA)	ACIDITÉ VOLATILE À LA MISE EN BOUTEILLE
Modalité 1 <i>O. oeni A en co-inoculation</i>	<b>0,38</b> (FML terminée à la fin de la FA, FML sous marc)	<b>0,43</b>
Modalité 2 <i>O. oeni A en inoculation post FA</i>	<b>0,29</b> (FML pas encore réalisée)	<b>0,37</b> (FML réalisée après écoulage)
Modalité 3 <i>ML Prime™ en co-inoculation</i>	<b>0,29</b> (FML terminée à la fin de la FA, FML sous marc)	<b>0,31</b>

Cas d'un cabernet sauvignon 2014, Languedoc,  
macération de 14 jours

pH = 3,8 - TAV = 12,3 % vol. - Acide malique initial = 3,05 g/L

# Rapide !



**FIGURE 5:** Benefits in terms of MLF duration with ML Prime™ in various conditions of field trials.

Stabilisation rapide afin d'éviter les risques d'oxydation,  
de contamination, de pertes d'arômes, etc.

# Et sans risque !

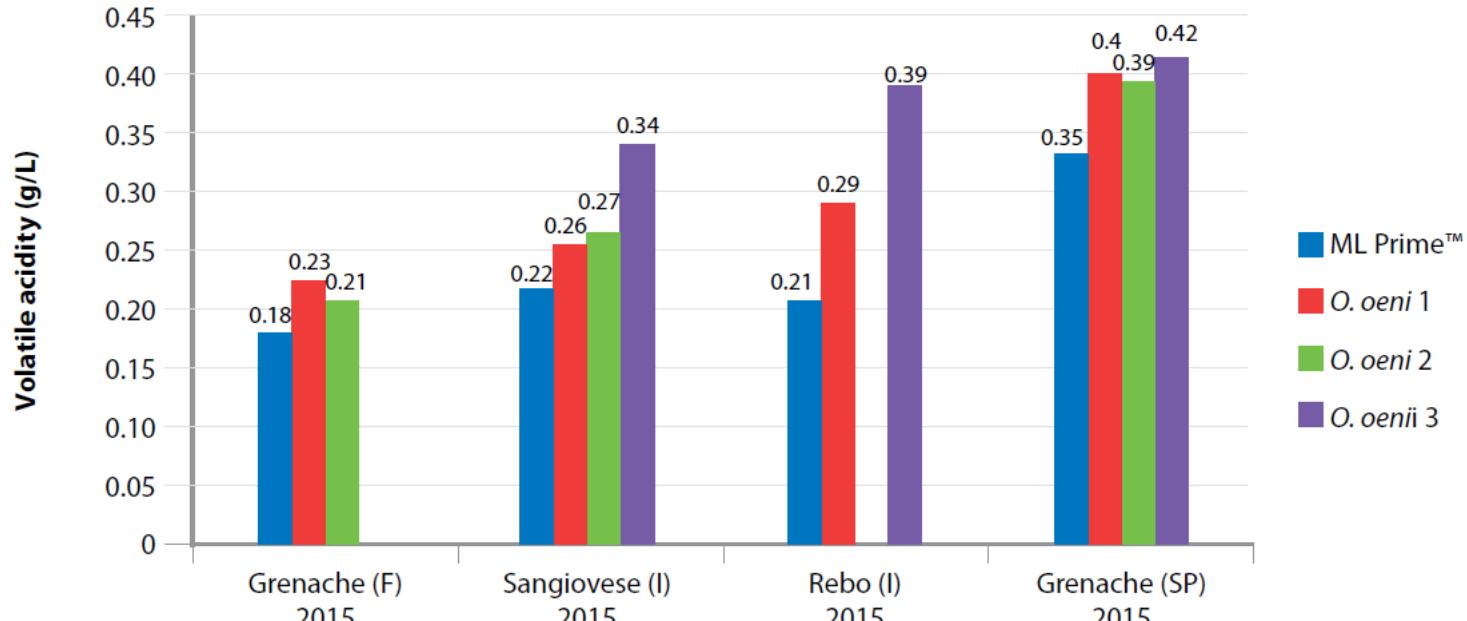


FIGURE 3: Volatile acidity production in co-inoculation comparing *O. oeni* and *L. plantarum*

Pas de production d'acidité volatile, ni d'amines biogènes, ni de précurseurs de phénols

## 1 United-States of America

### *In partnership with Virginia Tech*

Yeast nutritional needs in apple juice fermentation.

## 2 France

### *Lallemand's internal R&D team and laboratory*

Development of new specific product for cider.

### *In partnership with Institut Français des Productions Cidriques (IFPC)*

Characterization of selected active dry yeasts.

### *In partnership with Institut Français des Productions Cidriques (IFPC)*

Brettanomyces contamination management.



## 3 Estonia

### *In partnership with Centre for Food and Fermentation Technologies (CFFT)*

Influence of selected active dry yeasts and nutrition on fermentation behavior.

## 4 Australia

### *In partnership with Charles Sturt University (CSU)*

Performance of selected active dry yeasts in various fructose/glucose ratios and impact of various nutrition management on fermentation behavior.

## 5 Spain

### *Lallemand's experimental cidery Field trials and R&D applications*

# Prévenir les défauts d'origine microbiologique

- Maîtrise de l'acidité volatile
  - Bioprotection dans les phases préfermentaires
  - Respect des bonnes pratiques de fermentation alcoolique
  - Stabilisation rapide et gestion de la FML
- Maîtrise des défauts liés aux composés soufrés
  - Le rôle de la levure
  - L'importance des équilibres nutritionnels de la levure
- Maîtrise des défauts phénolés
  - Biocontrôle des Brettanomyces
  - L'intérêt du chitosane
- Maîtrise des défauts liés aux amines biogènes

