



Intérêt et conditions d'utilisation d'une préparation spécifique de chitosane fongique œnologique pour maîtriser les populations de levures *Brettanomyces* dans les cidres

Contexte et objectifs

La levure *Brettanomyces anomalus* est la principale levure d'altération des cidres, conduisant notamment à la dégradation des esters d'acétate, composés responsables des arômes fruités du cidre. Elle est également impliquée dans l'apparition d'odeurs phénolées qui, dans le cas où elles sont marquées, sont considérées comme des défauts aromatiques. Ces odeurs sont dues à la formation de phénols volatils dont les deux principaux, dans le cidre, sont le 4-éthylphénol et le 4-éthylcatéchol. Cette levure peut se développer aussi bien

en bouteille qu'en cuve. Elle a de faibles besoins nutritionnels pour se développer et est généralement résistante au SO_2 , à l'alcool et aux faibles pH.

Du fait de son action délétère sur l'arôme, un des objectifs des travaux de l'IFPC consiste à limiter l'action de cette levure. La préparation commerciale de No Brett Inside™, composée à 100 % de chitosane issu d'*Aspergillus niger* et déjà utilisée dans le vin, apparaît comme un outil intéressant dans la lutte contre *Brettanomyces*.

Présentation du chitosane

Le chitosane est une molécule dérivée de la chitine. Chitine et chitosane font partie des polymères naturels les plus répandus sur Terre ; ils arrivent ainsi en seconde position après la cellulose. On trouve de la chitine notamment dans l'exosquelette des crustacés, des insectes mais également dans la paroi cellulaire des champignons. Le chitosane est obtenu après désacétylation de la chitine.

Il est important de considérer non pas un seul mais plusieurs chitosanes : les variations de degré de désacétylation, de poids moléculaire et de préparation des formulations (granulométrie notamment) donnent lieu à des molécules de propriétés et d'activités diverses.

Les propriétés antibactériennes et antifongiques du chitosane ont été largement étudiées et documentées et sont aujourd'hui bien reconnues.

Admis comme pratique œnologique par l'OIV en juillet 2009 et par l'Union Européenne en décembre 2010, le chitosane d'origine fongique représente un outil innovant et efficace de lutte contre les *Brettanomyces*. Plusieurs travaux menés en laboratoire et en conditions réelles de vinification ont prouvé l'efficacité du chitosane sur *Brettanomyces*.

C'est dans ce contexte qu'a été mise au point la préparation No Brett Inside™, préparation pure de chitosane d'origine *Aspergillus niger*, visant au contrôle des *Brettanomyces* dans le contexte œnologique.

La préparation sélectionnée se présente sous la forme d'une poudre fine, blanche à légèrement beige. Elle doit être réhydratée avant incorporation homogène dans la matrice liquide à traiter, à la dose de 4 g/hL. Après 10 jours de temps de contact,

le chitosane a sédimenté, le volume traité doit être soutiré et séparé de ses lies.

L'objectif des expérimentations présentées dans cet article est de démontrer l'efficacité de ce produit vis-à-vis du développement de *Brettanomyces* mais aussi de ses limites potentielles dans le contexte cidricole. Ces travaux doivent conduire à déterminer une méthode d'utilisation adaptée à ce contexte particulier.

Ce produit a été testé sur la levure *Brettanomyces* seule afin de s'assurer de l'efficacité du produit vis-à-vis de cette levure d'altération, et ce, en fonction du niveau de population initial. Nous avons testé également l'utilisation de ce chitosane en présence d'un mélange de *Saccharomyces uvarum* et de *Brettanomyces anomalus* afin de déterminer l'interaction potentielle, sachant que ce schéma se retrouve régulièrement en cidre, *Brettanomyces* étant susceptible de se développer concomitamment à *Saccharomyces*.

De plus, nous avons étudié l'efficacité de ce chitosane en fonction du niveau de population de *Brettanomyces anomalus*. Cet élément doit permettre de déterminer la précocité d'action à envisager en fonction de la limite d'action du produit. Des essais ont aussi été réalisés avec ou sans soutirage afin de déterminer l'impact de cette pratique sur la rémanence de l'effet du traitement.

Ce jeu d'expérimentations va permettre de déterminer les modalités d'utilisation du chitosane dans le cidre, notamment son moment d'utilisation : avant ou après fermentation alcoolique, la dose adaptée au cidre, les compléments technologiques à apporter (soutirage, filtration...).

Efficacité du chitosane sur *Brettanomyces anomalus* en fonction du niveau de population initial

Dans un premier temps, nous avons examiné le comportement de *Brettanomyces* face à l'ajout de chitosane et ce, en fonction de la population initiale inoculée (Figure 1).

Quel que soit le niveau de population initial, l'ajout de chitosane permet de diminuer fortement les populations viables de *Brettanomyces*. Cette diminution est très rapide pour une population de 10^3 ufc/mL, entre 1 et 4 jours. On peut observer un délai d'efficacité légèrement plus long pour une population de 10^5 ufc/mL, entre 5 et 7 jours. Le traitement au chitosane a donc permis d'éliminer les populations de *Brettanomyces* dans le milieu. Cependant, on peut remarquer que dans le cas de la population initiale élevée de 10^5 ufc/mL, une recroissance de *Brettanomyces* est observée après 22 à 36 jours, avec une population qui atteint environ 10^3 ufc/mL au bout de 42 jours.

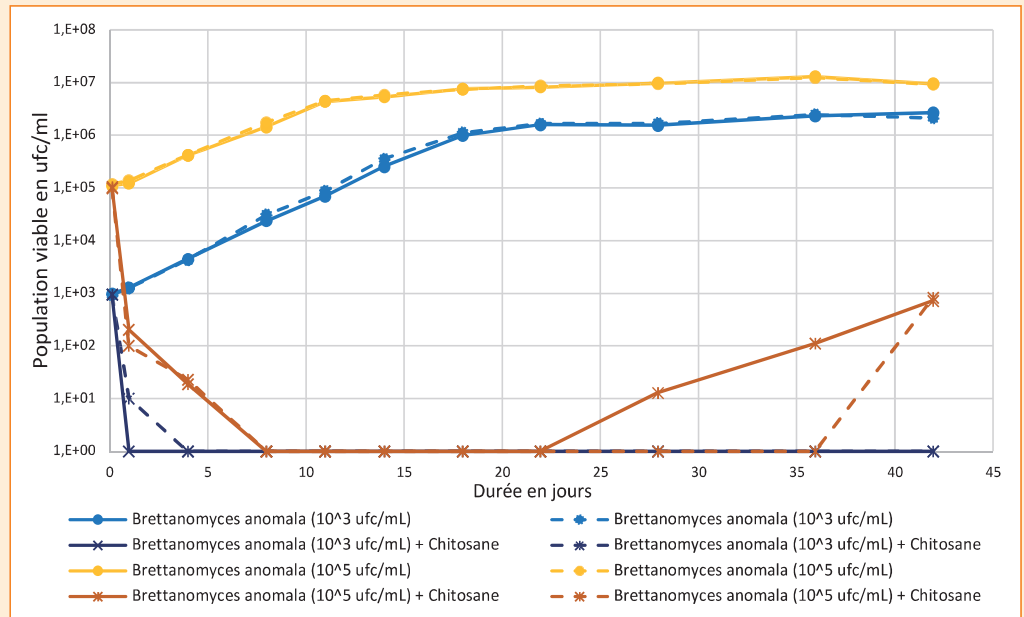


Figure 1 : Impact de l'ajout de chitosane sur les populations de *Brettanomyces anomalus* (10^3 ufc/mL et 10^5 ufc/mL)

Il est à signaler que dans cette expérimentation, le cidre est laissé tel quel après ajout de chitosane sans autre action. Ainsi, les cellules de *Brettanomyces* non détruites par le produit mais

seulement éliminées par effet d'entraînement et sédimentation, sont toujours présentes dans le milieu. Cela explique la reprise de croissance observée ici. La première constatation pou-

vant être faite est qu'il est préférable d'agir sur des niveaux de population de *Brettanomyces* faibles afin d'augmenter l'efficacité potentielle du chitosane aux doses recommandées.

Impact du chitosane sur *Saccharomyces uvarum*

Il est nécessaire de déterminer l'impact potentiel du chitosane sur la levure *Saccharomyces* d'intérêt technologique.

La Figure 2 présente les évolutions des populations de *Saccharomyces* avec ou sans ajout de chitosane.

Sans chitosane, *Saccharomyces uvarum* croît sans problème. En revanche, les populations restent à des niveaux assez faibles de $5 \cdot 10^5$ ufc/mL, probablement du fait de l'utilisation d'un milieu déjà appauvri en divers éléments dont l'azote assimilable.

Lorsque le chitosane est ajouté, les populations de *Saccharomyces* sont détruites très rapidement, et aucune croissance n'a repris au bout de 6 semaines. On peut donc conclure que le

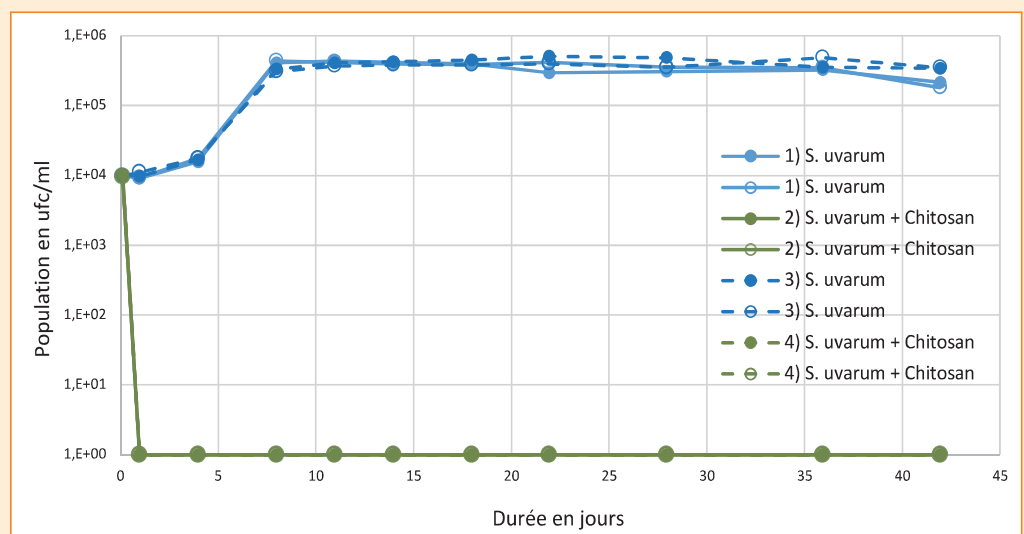


Figure 2 : Impact de l'ajout de chitosane à la dose de 4 g/hL sur les populations de *Saccharomyces uvarum* ensemencées à 10^4 ufc/mL en présence de *Brettanomyces* à différents niveaux de population initiale : 1 et 2) 10^3 ufc/mL à l'ensemencement, 3 et 4) 10^5 ufc/mL

chitosane a également un effet destructeur sur *Saccharomyces*

uvarum dans nos conditions expérimentales.

Utilisation du chitosane lors de la présence simultanée de *Saccharomyces uvarum* et *Brettanomyces anomalus*

L'effet du chitosane a été testé sur un cidre ensemencé simultanément avec deux levures (*Saccharomyces uvarum* et *Brettanomyces anomalus*) à différentes concentrations.

Concernant *Brettanomyces* (Figure 3), une diminution de population allant jusqu'à environ 2 logs est visible pour les modalités démarrants à 10^6 ufc/mL d'ensemencement initial, et 3 logs pour celle à 10^4 ufc/mL. Il est difficile de juger de l'effet des concentrations en

Saccharomyces, car les répétitions ne sont pas nécessairement superposables, surtout pour les faibles taux d'inoculation.

La figure 4 montre l'évolution des populations de la levure de type *Saccharomyces* lors du traitement par le chitosane. Dans ces conditions, nous n'avons pas observé d'impact net de la quantité de *Brettanomyces* présente (a : 10^4 ufc/mL ou b : 10^6 ufc/mL). En effet, les courbes des deux graphes ont des comportements relativement proches.

Par contre, une diminution des populations de *Saccharomyces* est malheureusement observée quel que soit le niveau initial apporté (10^2 ufc/mL à 10^5 ufc/mL). Ainsi, des diminutions allant de 1 à 2 logs ont été observées selon les niveaux de population initiale. De plus, c'est seulement au bout de 15 à 20 jours que des croissances de *Saccharomyces* sont observées, montrant une inhibition partielle des levures.

Au vu des délais des reprises de croissance, un impact notable

sur les fermentations est envisageable. En effet, seules les populations initiales de *Saccharomyces* à 10^4 et 10^5 ufc/mL ont atteint un niveau conséquent après 20 jours. Elles restent cependant faibles, globalement entre 10^5 et 10^6 ufc/mL, concentration trop limitante pour réaliser des fermentations dans de bonnes conditions.

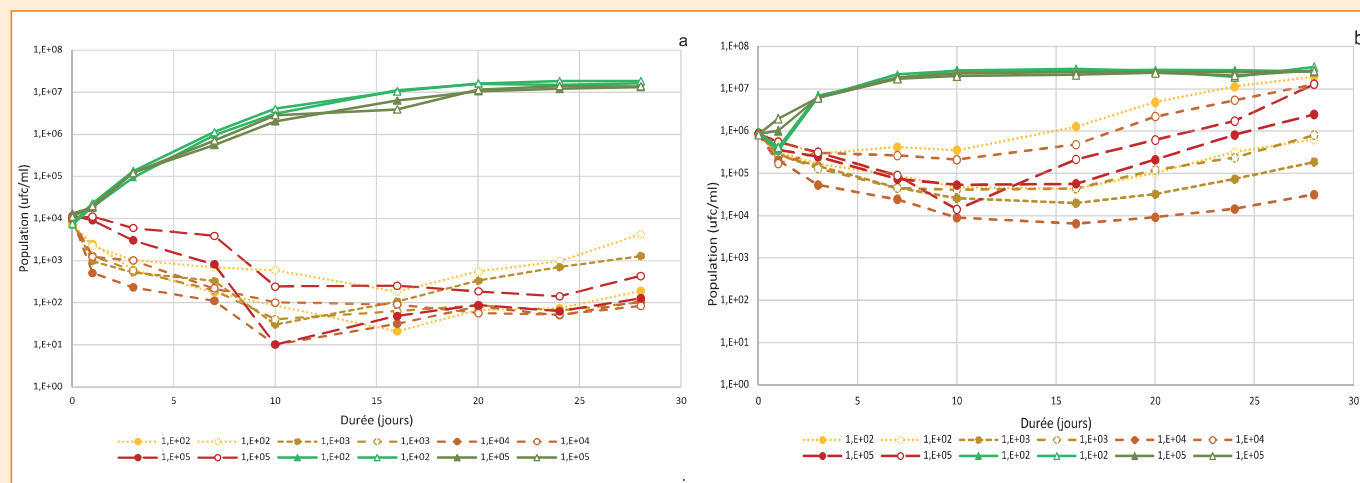


Figure 3 : Impact de l'ajout de chitosane sur les populations de *Brettanomyces anomalus* (a : 10^4 ufc/mL ; b : 10^6 ufc/mL) en présence de *Saccharomyces uvarum* (de 10^2 ufc/mL à 10^5 ufc/mL). Traits pleins verts : témoins sans chitosane

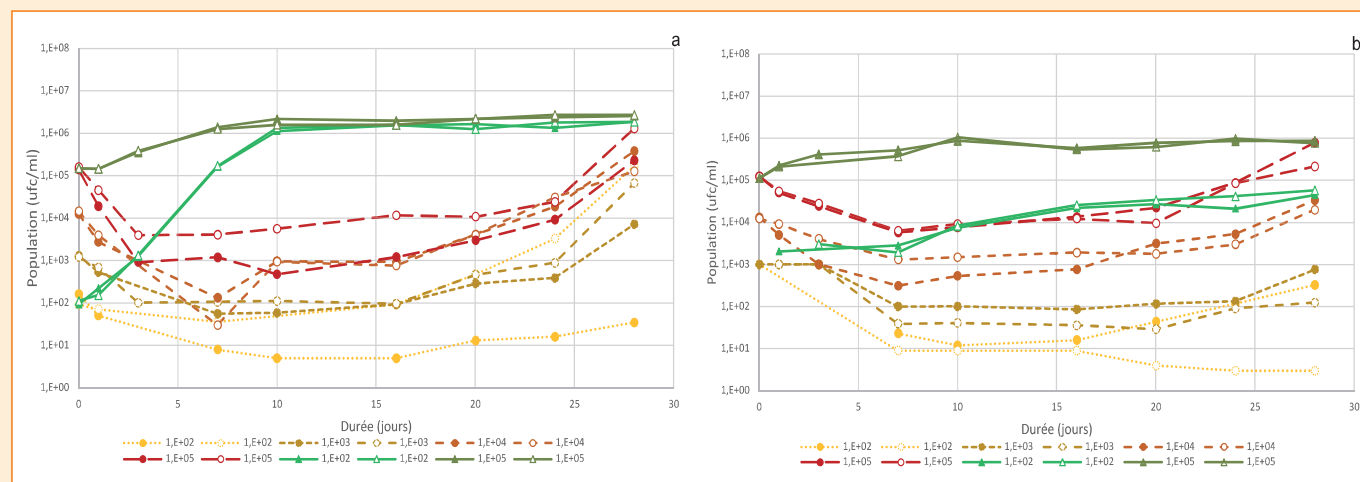


Figure 4 : Impact de l'ajout de chitosane sur les populations de *Saccharomyces uvarum* (de 10^2 ufc/mL à 10^5 ufc/mL) en présence de *Brettanomyces anomalus* à différentes concentrations (a : 10^4 ufc/mL ; b : 10^6 ufc/mL). Traits pleins verts : témoins sans chitosane

Effet du soutirage

Dans un second temps, des essais ont été réalisés afin de préciser le mode d'utilisation optimal à pratiquer : avec ou sans soutirage suite à l'action du chitosane. Ainsi, des comparaisons de ces deux modes ont été effectuées (résultats non montrés). Dans les échantillons n'ayant pas subi de soutirage, de nouvelles croissances des différents microorganismes, *Saccharomyces* ou *Brettanomyces*, sont systématiquement observées. Lors des essais réalisés avec soutirage, quelques reprises de croissance

peuvent être observées mais les délais de croissance mesurés sont bien plus importants que dans les échantillons non soutirés, indiquant une efficacité accrue du mode d'utilisation avec soutirage. Le protocole conseillé est donc d'utiliser le chitosane à la dose de 4 g/hL, à partir d'une suspension mère (voir protocole ci-dessous). On laisse agir le chitosane pendant 10 jours puis on réalise le soutirage.

Procédure de préparation de la suspension de chitosane

La procédure de préparation du chitosane est cruciale afin d'assurer le bon fonctionnement du produit. La dose d'utilisation est fixée par défaut à 4 g/hL.

La première étape consiste à réaliser une suspension mère de chitosane selon la formule ci-dessous :

$$Q = d \times V_{\text{cuve}}$$

Avec Q = Quantité de chitosane à peser en grammes
 V_{cuve} = Volume de la cuve en hectolitre
 d = dose de chitosane à utiliser (4 g/hL)

Cette quantité Q est mise en solution dans un volume de cidre V exprimé en litre selon la formule :

$$V = V_{\text{cuve}} \text{ (en hL)} \times 100 / 250$$

Quelques exemples sont donnés dans le tableau suivant, notamment avec une dose de chitosane plus importante permettant une efficacité plus grande (résultats non présentés) :

Volume de la cuve à traiter	Dose de chitosane	Quantité à peser	Volume dilution
100 hL	4 g/hL	400 g	40 L
80 hL	4 g/hL	320 g	32 L
100 hL	6 g/hL	600 g	60 L
80 hL	6 g/hL	480 g	48 L

Une agitation forte est appliquée afin d'assurer une mouillabilité complète de la solution mère et l'absence totale de grumeaux. Une fois bien remise en suspension, elle peut être ajoutée dans la cuve de destination en veillant à une bonne homogénéisation du produit dans tout le volume de cidre à traiter (remontage ou mélange de la cuve) pour optimiser le contact entre les microorganismes et le produit. Ce protocole doit assurer la bonne répartition du chitosane et, de fait, une efficacité accrue.

Conclusion et perspectives

L'étude présentée dans cet article montre l'intérêt du chitosane, No Brett Inside™, comme agent technologique en action curative contre la contamination par *Brettanomyces*. L'utilisation de cet agent nécessite de prendre quelques précautions.

- Agir suffisamment tôt pour ne pas avoir une population de *Brettanomyces* trop importante. Il est plus difficile d'avoir une action efficace à partir d'un niveau de population de l'ordre de 10^5 ufc/mL.
- L'utilisation du chitosane en cours de fermentation alcoolique est à éviter du fait de son action sur *Saccharomyces uvarum*. Si tel est le cas du fait d'un développement précoce de *Brettanomyces*, il sera nécessaire de réaliser un ensemencement avec une levure

sous forme de LSA afin de pouvoir finir la fermentation au stade souhaité.

- Utiliser une dose adaptée à la contamination : la dose recommandée est de 4 g/hL. En vin, la dose maximale autorisée est de 10 g/hL.
- Réaliser une préparation suffisamment homogène pour optimiser l'action du produit. La préparation d'une suspension mère sous forte agitation et son incorporation veillant à une parfaite homogénéité de répartition dans tout le volume est conseillée.
- Laisser un temps d'action suffisant, d'environ 10 jours, avant de pratiquer un soutirage. Les lies obtenues seront chargées en *Brettanomyces*. Il est conseillé de ne pas réutiliser ces lies pour éviter de contaminer d'autres cuves.

Auteurs :

Hugues Guichard (IFPC), Séverine Ollivier (IFPC), Rémi Bauduin (IFPC), Olivier Pillet (IOC), Nathalie Sieczkowski (Lallemand), Sigrid Gertsen-Schibbye (Lallemand)

Projet financé grâce à des fonds : IOC, Lallemand Oenology et UNICID
 Partenaires : IOC, Lallemand Oenology et IFPC