

La microbiologie du vin

De Pasteur à nos jours

Pascal Ribereau-Gayon* professeur

La présentation des travaux de Pasteur, à l'occasion du centenaire de sa naissance, montre qu'il a consacré la moitié de sa vie scientifique à l'étude théorique et pratique des fermentations. Plus particulièrement, pendant quatre années, le vin a été son thème principal de recherche, non seulement la fermentation et les maladies d'origine microbienne, mais aussi la constitution chimique et les transformations au cours du vieillissement. Les résultats acquis au cours d'une période aussi courte sont considérables ; ils satisferaient certainement la carrière complète de tout chercheur normal (voir encadré Monographie des travaux de Pasteur).

Plusieurs raisons ont probablement orienté Pasteur vers l'étude du vin. N'oublions pas d'abord qu'il est originaire d'Arbois où il possède une vigne. Abordant l'étude des fermentations, tout naturellement il prendra la fermentation vinaire comme modèle, d'autant plus qu'il retrouve dans le vin l'acide tartrique qu'il a largement utilisé dans ses études de cristallographie. Enfin, il s'attache à la compréhension des maladies du vin, parce qu'il a l'intuition qu'elles constituent une voie d'approche des contami-

nations microbiennes de l'homme et des animaux et aussi parce qu'il réussit à intéresser l'empereur Napoléon III à ce sujet, "auquel je me suis consacré dès lors avec la pensée de son intérêt pour l'une des plus grandes productions agricoles de la France".

Apports de Louis Pasteur à la microbiologie du vin

La fermentation du moût de raisin

Le phénomène est connu depuis longtemps. Il suffit d'abandonner du raisin écrasé ; spontanément il s'échauffe, une ébullition se manifeste, le goût change. Les noms levure ou ferment désignent l'agent responsable. Mais personne n'a pu démontrer définitivement s'il s'agit d'un phénomène purement chimique ou si les fonctions vitales d'un organisme vivant sont impliquées. Au moment où Pasteur a abordé cette étude, la deuxième hypothèse a été envisagée par certains observateurs, mais la théorie chimique, à laquelle le grand chimiste allemand Liebig apportait toute l'autorité de son nom, était reconnue par la majorité de la communauté scientifique : "Le ferment (c'est-à-dire la levure) n'intervient que pour communiquer son mouvement de décomposition aux autres parties de la liqueur fermentescible".

Le premier mérite de Pasteur sera de montrer l'intervention d'un micro-organisme dans toute fermentation, en particulier dans le cas de la fermentation lactique dont les bactéries (les ferments), très petites, sont difficiles à voir au microscope. La fermentation résulte de

Monographie des travaux de Pasteur

Présentée par l'Institut Pasteur en 1922 à l'occasion du centenaire de sa naissance

1847	Dissymétrie moléculaire
1857	Fermentations
1862	Génération dites spontanées
1863	Études sur le vin
1865	Maladie des vers à soie
1871	Études sur la bière
1877	Maladies virulentes
1880	Virus, vaccins
1885	Prophylaxie de la rage

40 années de vie scientifique :

10 ans	Dissymétrie moléculaire
20 ans	Fermentations et générations spontanées, vin, bière (intermédiaire "vers à soie")
10 ans	Maladies de l'homme et des animaux

la croissance d'un être vivant et non de la décomposition d'une matière organique : "L'acte chimique de la fermentation est essentiellement un phénomène corrélatif d'un acte vital, commençant et s'arrêtant avec ce dernier".

Pasteur s'intéresse à l'équation du phénomène tel qu'il a été décrit par ses prédécesseurs. Il critique Lavoisier qui utilise la fermentation alcoolique pour affirmer le principe de la conservation de la matière. Celui-ci croit avoir trouvé que les poids de gaz carbonique et d'alcool formés correspondent au poids de sucre fermenté ; en réalité il oublie, d'un côté la molécule d'eau nécessaire pour hydrolyser la molécule de saccharose du sucre de canne, de l'autre les produits secondaires formés par la fermentation.

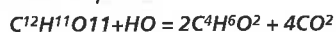
* Université de Bordeaux II, Faculté d'œnologie, 351, cours de la Libération, 33405 Talence Cedex.
Tél. : 56.84.64.56. Fax : 56.84.64.68.

Lavoisier exposa le premier les vues les plus judicieuses sur les produits de la fermentation alcoolique. Le Mémoire inséré dans ses *Éléments de Chimie* sur cet objet est singulièrement curieux. Défectueux à l'excès dans les déterminations numériques, il est admirable si on le considère au point de vue des idées générales et philosophiques. C'est là qu'on trouve ces belles paroles : "Rien ne se crée ni dans les opérations de l'art ni dans celles de la nature, et l'on peut poser ce principe, que dans toute opération il y a une égale quantité de matière avant et après l'opération, que la qualité et la quantité des principes est la même et qu'il n'y a que des changements, des modifications. C'est sur ce principe qu'est fondé tout l'art de faire des expériences en chimie".

Quoi qu'il en soit, les opérations que rapporte Lavoisier ne confirment ses vues préconçues que par suite de compensations d'erreurs considérables.

Avec une très grande habilité expérimentale, il vérifie que l'équation dite de Gay-Lussac (qu'il écrit avec C=6, H=1, O=8) n'est pas rigoureusement satisfaite

"Quinze jours après, la fermentation est terminée, et je me suis assuré en effet ultérieurement par la liqueur de cuivre, qu'il n'y avait plus traces de sucre. Si l'équation

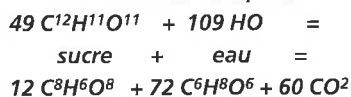


était celle de la fermentation alcoolique, 1,440 de sucre candi devrait donner 374 cc. 8 de gaz carbonique à 0° et 760 de pression. Or, après toutes les corrections de température et de pression, j'ai trouvé, pour le volume du gaz à 0° et à 760, un volume égal à 358 cc.0. La différence avec le volume théorique est de 16 cc.8".

Il démontre que la fermentation forme aussi, à partir du sucre, des quantités non négligeables de glycérine et d'acide succinique et il cherche à construire une équation plus proche de la réalité. Mais même cette dernière ne le satisfait pas vraiment ; il comprend bien que la fermentation n'est pas un phénomène chimique et, par conséquent, elle n'admet pas une équation fixe ; cette équation est variable en fonction des conditions, "assujettie aux mille variations que comportent les phénomènes de la vie".

"C'est à ce point de vue et avec ces réserves que l'équation suivante mérite d'être mentionnée. .

On trouve que 4,5 de sucre candi en se détruisant selon l'équation



Ac. succin. + glycérine + ac.carbon. fournissent

Acie succinique	0,760
Glycérine	3,607
Acide carbonique	0,708
Total	5,075

Ces nombres, en ce qui concerne la glycérine et l'acide succinique, diffèrent peu de ceux de l'expérience, pour une fermentation de 100 grammes de sucre. Quant à la proportion de l'acide carbonique, c'est bien également celle qui est exigée".

Liebig disait très justement à Pasteur : "Votre expression phénomène vital marque un phénomène chimique qu'il s'agit de décrire". Pasteur ne le conteste pas : "Maintenant en quoi consiste pour moi l'acte chimique du dédoublement du sucre et quelle est sa cause intime ? J'avoue que je l'ignore complètement". Il faudra attendre l'émergence de l'enzymologie pour aborder ces mécanismes. Pasteur a l'intuition qu'il ne sert à rien d'aborder les phénomènes chimiques tant que l'on n'aura pas parfaitement analysé leurs bases biologiques ; c'est en ce sens que sa démarche est féconde.

L'origine des levures dans les fermentations vinaïres

L'étape suivante sera la mise en évidence de l'origine des levures. D'après la théorie chimique, l'agent de la fermentation, c'est-à-dire le ferment ou levure, apparaît par décomposition des matières albuminoïdes du substrat ; c'est la théorie des générations spontanées. Un grand mérite de Pasteur sera de montrer que les ferments sont des organismes microbiens, véhiculés avec les poussières de l'air. Il imagine un certain nombre de manipulations originales qui mettent définitivement en évidence la présence des levures sur les raisins eux-mêmes, au moment de la récolte ; elles inoculent le moût qui fermente spontanément.

Pasteur prépare des ballons munis d'un tube effilé recourbé qui arrête les poussières de l'air ; ils contiennent du jus de raisin porté à ébullition ; la fermentation ne se déclenche pas. L'addition dans ces ballons de quelques gouttes d'eau de lavage des raisins entraîne la fermentation ; celle-ci ne se manifeste pas si l'eau de lavage est chauffée. Quelques gouttes de moût de raisin, prélevées aseptiquement à l'intérieur du grain, ne provoquent pas la fermentation.

Pasteur croyait avoir définitivement démontré l'origine des ferments. Quelques années plus tard, des notes manuscrites de Claude Bernard, publiées après sa mort, remirent tout en question. Pasteur en fut d'autant plus surpris qu'il entretenait d'excellentes relations avec son collègue qui n'avait jamais, devant lui, mis en doute ses théories. Peut-être s'agissait-il de simples hypothèses que l'auteur souhaitait confirmer, avant de les rendre publiques. Quoi qu'il en soit Claude Bernard fait intervenir, pour expliquer la fermentation, des "formations protoplasmiques" qui apparaîtraient dans le raisin pendant sa maturation et disparaîtraient ensuite ; ce concept permettait d'expliquer que la fermentation soit possible avec le raisin à maturité mais qu'elle ne le soit pas avec le raisin vert (le verjus) ou avec le raisin pourri. Cette circonstance oblige Pasteur à imaginer de nouvelles expériences dans lesquelles il enveloppe des raisins verts dans du coton et il en place d'autres dans des serres, pendant toute la durée de leur maturation. Dans un cas comme dans l'autre, les raisins prélevés aseptiquement à maturité donnent des jus inférmescible, parce que les raisins n'ont pas été inoculés par les levures, véhiculées par les poussières de l'air au cours de la maturation. Aujourd'hui, on attache une place prépondérante aux insectes dans la dissémination des levures dans le vignoble.

Les maladies des vins et la pasteurisation

Ce sera un autre grand succès des recherches de Pasteur sur le vin de montrer l'existence d'autres micro-organismes que les levures que nous appelons aujourd'hui des bactéries. Il effec-

tue des observations microscopiques extrêmement soignées qui lui permettent de distinguer, à côté des cristaux de tartre et des dépôts de matière colorante, des cellules de levures de forme elleptique et d'autres parasites qui sont des petits filaments beaucoup plus difficiles à voir (photo 1).

Sur le rôle de ces microbes, il s'exprime ainsi : "Une source de changements propres au vin ne doit pas être cherchée dans l'action spontanée d'une matière albuminoïde, modifiée par des causes inconnues, mais dans la présence de végétations parasitaires microscopiques, qui trouvent dans le vin des conditions favorables à leur développement et qui l'altèrent, soit par soustraction de ce qu'elles lui enlèvent pour leur nourriture propre, soit principalement par la formation de nouveaux produits qui sont un effet même de la multiplication de ces parasites dans la masse du vin".

Pasteur croit identifier différents micro-organismes (bactéries) provoquant plusieurs maladies bien caractérisées : amertume, tourne, graisse. On admet aujourd'hui que les différents microbes peuvent conduire à des attaques plus ou moins profondes et variées ; une multitude d'altérations différentes est possible. Elles se traduisent, entre autre, par une formation d'acide lactique et surtout d'acide acétique dont le taux, limité par la réglementation, traduit l'importance de l'altération.

En tout cas, ces recherches auront servi à Pasteur de voie d'approche de l'étude des maladies contagieuses de l'homme et des animaux : "Lorsqu'on voit la bière et le vin éprouver de profondes altérations parce que ces liquides ont donné asile à des organismes microscopiques, qui se sont introduits d'une manière invisible et fortuitement dans leur intérieur, où ils ont ensuite pullulé, comment n'être pas obsédé par la pensée que des faits de même ordre peuvent et doivent se présenter quelquefois chez l'homme et chez les animaux ?". Pour cette raison, sans doute, il utilise l'expression "maladies du vin" alors que "altérations" serait plus correct, puisque les transformations sont définitives, sans réversibilités entre un "état sain" et un "état malade".

Il était tout à fait dans la démarche de Pasteur, après avoir expliqué un phénomène, de chercher les applications

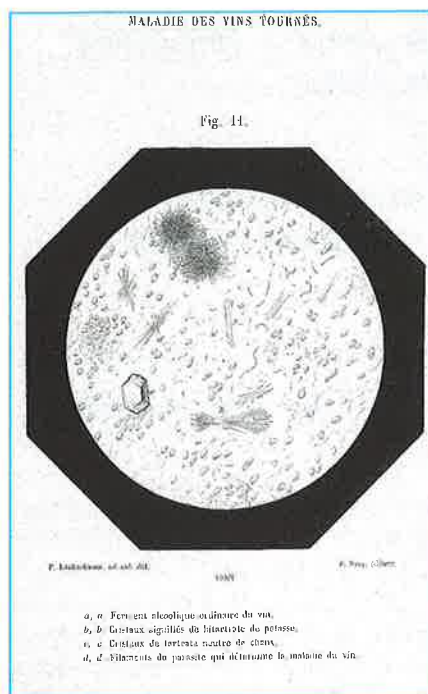


Photo 1 - Maladie des vins tournés : coupe microscopique.

pratiques, en l'occurrence le moyen de prévention des maladies du vin ; Il sait que la chaleur détruit les microbes ; tout naturellement, il applique ce procédé au vin ; ce sera la pasteurisation. Il constate l'efficacité du procédé ; il suffit de chauffer entre 60 et 100 °C pendant quelques minutes ; il vérifie que la qualité du vin n'est pas affectée ; il prend un brevet qui fera l'objet de contestations, car le chauffage du vin a été pratiqué avant lui, mais sans donner l'explication de son efficacité. Enfin il décrit de nombreux appareillages industriels pour conduire l'opération dans les chais.

Il est certain que la pasteurisation des vins n'a pas rencontré le succès prévu par son inventeur et on peut en donner plusieurs raisons. D'abord les soins d'hygiène ont été constamment améliorés et les populations microbiennes contaminantes nettement diminuées. Également, pour être tout à fait efficace, le procédé devrait conduire à l'aseptie totale qui est impossible dans un chai ; stériliser du vin par la chaleur ne pose pas de difficultés majeures, mais le manipuler et le conserver de manière stérile est un problème beaucoup plus complexe, sauf éventuellement à l'occasion de la mise en bouteille. Enfin on a appris à utiliser le dioxyde de soufre qui est un antiseptique très efficace, mais est engagé dans des réactions chimiques complexes qui affectent ses propriétés. Pasteur connaît

l'emploi de ce produit, mais il note que son efficacité est aléatoire et on ne saurait en être surpris.

La microbiologie du vin après Pasteur

La fermentation malolactique

Il est admis aujourd'hui, tout au moins dans le cas des vins rouges, que leur vinification fait intervenir deux phénomènes fermentaires ; après la fermentation alcoolique principale, la fermentation malolactique transforme l'acide malique en acide lactique (figure 1). La conséquence est une baisse d'acidité favorable à la qualité gustative et une meilleure stabilité, malgré l'augmentation du pH, parce que l'acide malique est une molécule facilement biodégradable, dont la décomposition éventuelle dans le vin en bouteille est un accident grave. Bien qu'elle soit provoquée par les mêmes bactéries, responsables des maladies qu'il a étudiées, Pasteur n'a pas vu la fermentation malolactique. On peut en donner plusieurs explications. D'abord, on conçoit très bien qu'il ne puisse pas imaginer que les bactéries, responsables dans bien des circonstances de l'altération du vin, puissent avoir un effet bénéfique sur la qualité dans d'autres cas. Pasteur connaît, également, la présence de l'acide malique dans le raisin, mais il note la difficulté de l'isoler pour en faire un dosage. Il faudra attendre la chromatographie sur papier, en 1953, pour avoir un moyen simple et précis pour suivre l'évolution de l'acide malique. En 1946, E. Peynaud a pu écrire à ce sujet, "Il n'est peut-être pas exagéré de dire que la science œnologique aurait été très différente si Pasteur, au lieu de nous laisser les bases d'une parfaite méthode de dosage de l'acide tartrique, nous avait appris à doser l'acide malique".

Des documents du siècle dernier montrent, indiscutablement, l'existence de la fermentation malolactique ; mais

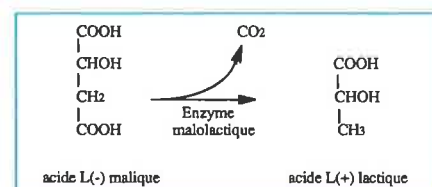


Figure 1.

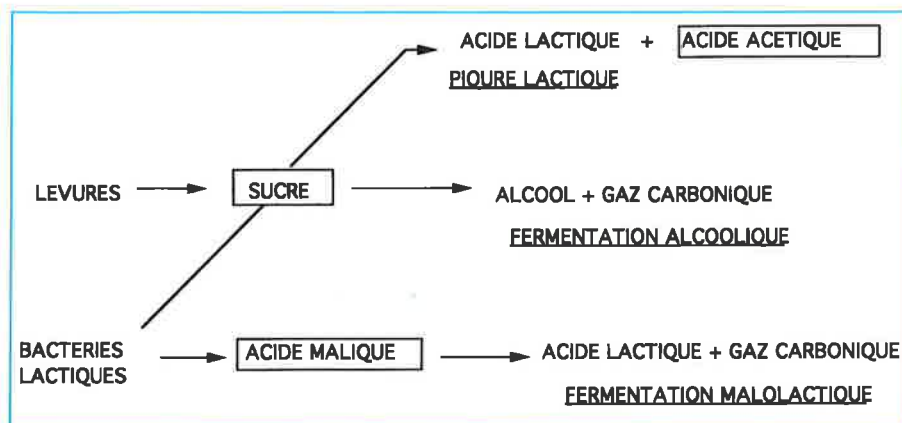


Figure 2 - Schéma des principes modernes de vinification.

son interprétation n'était pas comprise. Il faudra attendre plusieurs décennies, et les années 1960, pour que la fermentation malolactique soit définitivement reconnue comme une étape indispensable de la vinification des vins rouges. Il était effectivement difficile d'imposer une théorie à l'encontre de celle du grand savant qui interprétait systématiquement la présence de bactéries par un début d'altération.

Par ailleurs, les bactéries lactiques du vin dégradent préférentiellement les sucres (glucose et fructose) et l'acide malique ; dans le premier cas, il s'agit d'un accident grave qui se traduit par la formation d'acide acétique (acidité volatile). Ces mêmes bactéries, ou tout au moins certaines d'entre elles, peuvent aussi attaquer d'autres constituants du vin (acide tartrique, glycérol) et conduire aux maladies décrites par Pasteur (tourne, amertume) ; elles correspondent à un manque total d'hygiène et ont pratiquement disparu aujourd'hui.

Un schéma (figure 2) montre que les principes modernes de vinification consistent à mettre les bactéries lactiques en situation de pouvoir dégrader uniquement l'acide malique, parce qu'elles interviennent lorsque tous les sucres ont été, au préalable, fermentés par la levure ; l'œnologie est très attentive à éviter les arrêts

de la fermentation alcoolique qui laissent un milieu sucré, dans lequel l'intervention de bactéries peut avoir des conséquences graves. Il intervient dans ces arrêts de fermentation, les carences nutritionnelles, mais aussi des phénomènes d'inhibition par l'éthanol et d'autres substrats (acides gras en C₆ et C₈) ; la levée de cette inhibition est au moins aussi efficace sur l'activation de la fermentation que l'amélioration de la nutrition des levures.

Le schéma montre, également, comment les dosages du sucre, de l'acide malique et de l'acide acétique permettent simplement un contrôle efficace des fermentations alcoolique et malolactique, également des éventuels déviations bactériennes. La conséquence a été, depuis les années 1960, une amélioration certaine de la qualité des vins dont l'analyse chimique rend parfaitement compte.

Application des données de la biologie moléculaire à l'identification des souches

Du temps de Pasteur on différencie deux types de levures au microscope : les "apiculées" (*Kloeckera apiculata*) et les "elliptiques" (*Saccharomyces ellipsoideus* ou *Saccharomyces cerevisiae*). On imagine l'existence d'espèces et de races variées, mais sans aucun moyen de les

identifier. Il est impossible de suivre la population qui assure une fermentation donnée, en particulier l'intervention effective d'une souche inoculée.

Aujourd'hui, on dispose d'au moins trois méthodes d'identification des souches qui s'appuient sur l'analyse du génome ; elles possèdent des performances et des conditions de mise en œuvre différentes :

a) Des endonucléases coupent l'ADN mitochondrial et les fragments sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose.

b) Les caryotypes peuvent être analysés par séparation directe des chromosomes par électrophorèse en champ pulsé.

c) La méthode PCR (réaction de polymérisation en chaîne) amplifie une région cible de l'ADN et analyse les fragments obtenus par électrophorèse.

Il est possible, ainsi, d'effectuer de véritables études écologiques des levures de vinification. On constate, dans le vignoble, une prépondérance de quelques souches résistantes aux conditions de milieu ; la répartition obéit au hasard et il n'est pas possible d'identifier des levures spécifiques des différents crus.

Une autre remarque concerne l'intervention des levures sur d'autres substrats que le sucre, avec la production de métabolites différents de ceux dérivant de la fermentation alcoolique proprement dite (éthanol, glycérol, acide succinique, autres produits secondaires).

Certaines souches sont susceptibles de communiquer des défauts (H₂S, acétate d'éthyle...) ; on peut les éviter par inoculation d'une souche sélectionnée judicieusement choisie.

Mais, aussi, la levure peut intervenir sur l'expression aromatique. Dans le cas du cépage sauvignon, la 4-mercapto-4-méthyl-pentan-2-one a été identifiée parmi les constituants de son arôme typique (figure 3). Cette molécule est extrêmement aromatique, puisque son seuil de perception dans l'eau est de 1 ng/l ; elle existe dans le raisin sous la forme d'un dérivé de la cystéine non aromatique ; elle est libérée par action d'une β-lyase des S-conjugués. La levure intervient dans cette libération d'arôme, différemment selon les souches ; à partir du même raisin, plusieurs souches de levure donnent des vins de sauvignon plus ou moins aromatiques. Si les mêmes

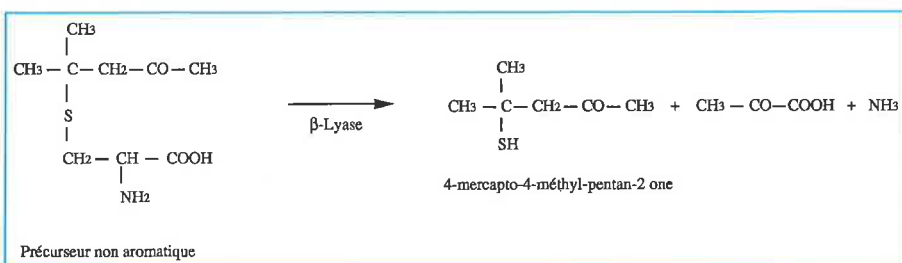


Figure 3.

levures fermentent un moût aromatique-ment neutre, elles sont sans incidence.

Création de souches nouvelles de levures par génie génétique

Les techniques du génie génétique permettent d'envisager la modification du génome de la levure, l'élimination ou plus généralement l'adjonction d'un gène. On peut ainsi espérer l'obtention d'une nouvelle levure, n'existant pas dans la nature et douée de propriétés intéressantes. Les problèmes soulevés par une telle démarche sont certains et, pour le moment, aucune tentative n'a débouché sur des applications industrielles.

Différents objectifs ont fait l'objet de travaux de recherche :

a) Modification de la biosynthèse des stérols, avec formation de terpénols et accumulation de géraniol et de linalol qui communiquent un arôme de muscat.

b) Introduction d'une activité protéolytique, afin d'hydrolyser les protéines instables du vin.

c) Transformation d'une partie du sucre en acide lactique, afin d'obtenir

une boisson moins alcoolisée et plus acide.

d) Réalisation simultanée de la fermentation alcoolique et de la fermentation malolactique. A partir de la séquence des acides aminés de la protéine de l'enzyme malolactique, le gène codant pour cette enzyme a pu être transféré et exprimé dans une levure. Dans l'état actuel des connaissances, la transformation de l'acide malique n'est que partielle ; une optimisation des systèmes de transfert reste à faire.

Bien entendu, on peut concevoir des objections concernant l'opportunité de la diffusion dans la pratique industrielle de telles souches de levures dont on ne maîtrise pas forcément toutes les conséquences.

Conclusion

Dans le domaine du vin, comme dans bien d'autres, on peut être admiratif devant l'importance des découvertes réalisées par Pasteur en peu de temps. Ses travaux sont le reflet de ses qualités exceptionnelles de chercheur, parmi lesquelles on relève l'habileté expé-

mentale, le don d'observation rigoureuse et aussi une grande intuition qui lui permet de privilégier les voies de recherches les plus porteuses de progrès.

Sans doute, toutes les prévisions de Pasteur n'ont-elles pas connu les développements qu'il avait envisagés, en particulier la pasteurisation. Sans doute, aussi, n'a-t-il pas vu l'existence de la fermentation malolactique qui pourtant est un phénomène tout à fait spontané. Cette notion donne un rôle utile aux bactéries ; elle va à l'encontre des théories pasteuriennes ; manifestement, cette circonstance a retardé sa diffusion. Mais ces réserves n'enlèvent rien à la fécondité de l'œuvre du grand savant qui a dominé pendant plus d'un siècle la microbiologie du vin.

Au cours de la dernière décennie, l'utilisation des méthodes de la biologie moléculaire et du génie génétique ont commencé à renouveler complètement ce domaine. L'œnologie fait de plus en plus appel à la microbiologie, même si elle reste profondément attachée à ses bases chimiques sur lesquelles elle s'est essentiellement appuyée pendant longtemps.