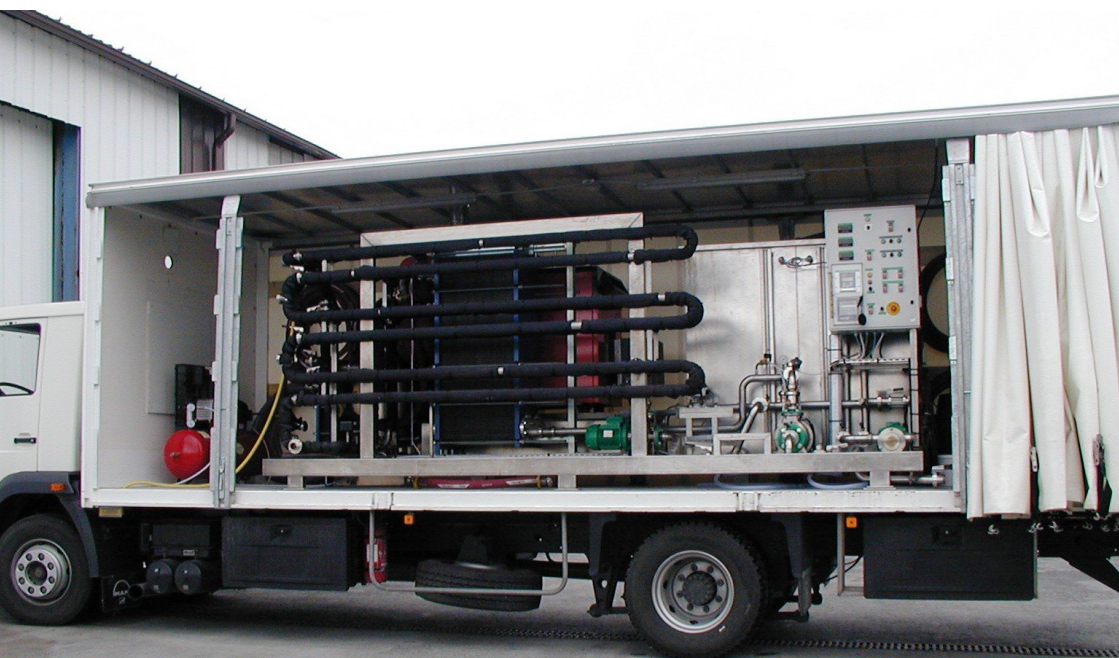


Mieux comprendre la Thermoflash®

MICHAEL  PAETZOLD

L'ŒNOTECHNIQUE EN CONSCIENCE

Choisir la Flash-Pasteurisation pour
stabiliser microbiologiquement son vin.



Sommaire

I. Rappel de la technologie 4

II. Dénombrer les micro-organismes 15

III. Aucune influence sur le vin 26

IV. La Thermoflash® élimine les micro-organismes, contrairement à la filtration tangentielle 32

V. Conclusion générale 39



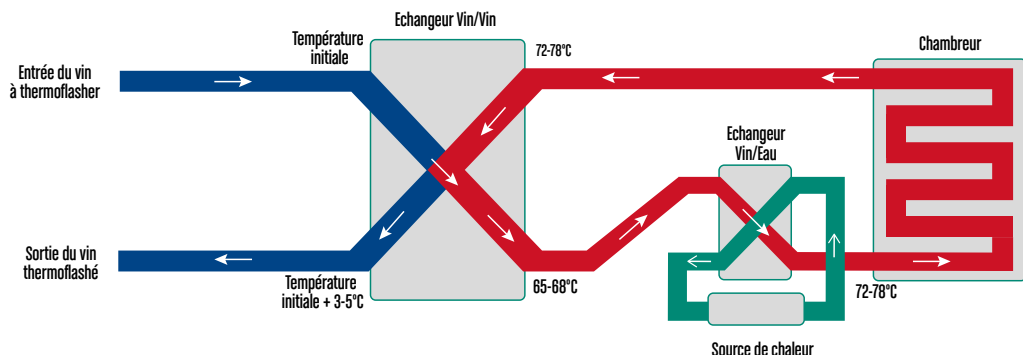
Mieux comprendre la Thermoflash®



I. RAPPEL DE LA TECHNOLOGIE

1. Principe de l'action de la Thermoflash®

La flash-pasteurisation vinicole consiste à monter le vin très rapidement à une certaine température, puis de le maintenir durant un temps déterminé et de le redescendre à la température ambiante. La Thermoflash® est notre vision de la flash-pasteurisation.



PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT DE LA THERMOFLASH®

Le vin à thermoflasher traverse un premier échangeur à plaques et échange ses calories avec le vin sortant. Puis le vin circule dans un deuxième échangeur à plaques traversé à contre-courant par une eau chauffée par une source de chaleur. La température de l'eau est ici parfaitement maîtrisée. Le vin est ainsi amené à la température souhaitée.

Le vin traverse ensuite un chambreur qui permet de le maintenir à la température de traitement pendant 20 secondes. En contrôlant le débit, un temps de maintien précis est assuré. Enfin, le vin traverse de nouveau le premier échangeur et échange ses calories avec le vin entrant.

En sortie de traitement, le vin n'a alors subi qu'une chauffe douce de type bain-marie, sans contact direct avec une source de chaleur. Il n'a pris que 3 à 5°C par rapport à sa température initiale.

Aucun volume de vin n'a été perdu.

1.1 Les facteurs déterminants

Un barème temps-température approprié aux caractéristiques du produit à traiter

Dans le vin, plus la turbidité est importante, plus les micro-organismes sont protégés de l'action de la chaleur. Il en est de même pour la concentration en sucre qui joue aussi ce rôle. En revanche, le phénomène est inversé avec l'augmentation de la concentration en alcool, les pH bas et la concentration en SO_2 libre actif.

A cela, il faut ajouter la thermorésistance de chaque famille de micro-organismes.

Avec la Thermoflash®, nous avons développé nos propres barèmes de température pour une adaptation aux problématiques vinicoles. La plage de traitement que nous avons choisie se situe entre 72 et 78°C, avec un temps de chambrage toujours égal à 20 secondes. Dans ce type de traitement, l'impact de la température est beaucoup plus important que l'impact temps.

La précision de la température et du débit appliquée

Les équipements de régulation de température et de débit doivent être extrêmement précis puisqu'ils sont garants de la bonne qualité et ainsi de l'efficacité du traitement. Les équipements sont vérifiés, étalonnés et contrôlés régulièrement par l'œnotechnicien au cours de la prestation.

L'homogénéité du traitement

L'intégralité des volumes du vin doit être travaillée à la même température. C'est la raison pour laquelle les échangeurs à plaques ont été privilégiés aux échangeurs tubulaires avec lesquels il est difficile de traiter le centre du tube sans sur-traiter le vin à la surface.

La méthodologie de travail

Compte tenu du process qui oblige à travailler en continu pour échanger ses calories, la préparation du traitement doit être parfaite : la cuve de réception doit être prête et désinfectée, la longueur du tuyau définie au préalable et désinfectée, l'enchaînement des différents lots prévu à l'avance...

La gestion de l'oxygène dissous

Comme pour l'ensemble de nos prestations, l'oxygène dissous est maîtrisé. Pour ce traitement physique qui élève la température du vin, la vigilance est accrue car la consommation d'oxygène dissous est d'autant plus rapide que la température augmente.

1.2 Les applications

Cette technique éprouvée peut avoir de nombreuses applications pour traiter des problématiques rencontrées par les clients :

Applications curatives :

- **Elimination des levures**
 - sur des vins en refermentation : quelle que soit la population levurienne de départ, les levures sont détruites par la chaleur. La technique fonctionnant avec des produits à muter pour lesquels les concentrations levuriennes sont très importantes, il n'y a pas de problème particulier avec des vins repartis en fermentation.
 - sur des vins en arrêt de fermentation ou en fermentation languissante : l'élimination des populations levuriennes permet un ensemencement plus facile et donc une reprise de fermentation optimisée.
 - sur des vins contenant des *Brettanomyces* (Voir Chapitre 2).

- **Elimination des bactéries**

Le traitement par Thermoflash® éradique également les populations bactériennes.

- bactéries acétiques :

Bactéries acétiques (UFC/10 ml)					
Vins à traiter	250 000	350 000	570 000	620 000	790 000
Vins thermoflashés	<1	<1	<1	<1	<1

Après Thermoflash®, tous les vins traités avaient moins d'1 UFC/10 ml (Unité Formant Colonie).

- bactéries lactiques : nous avons traité des vins contenant jusqu'à 10^7 UFC/10 ml. Après Thermoflash®, les vins contenaient moins d'1 UFC/10 ml.

Applications préventives :

- **Mutage des vins moelleux et liquoreux**

Compte tenu des très bons résultats microbiologiques et œnologiques, l'application de la Thermoflash® est possible pour le mutage des vins moelleux et liquoreux.

	TAV (% vol.)	Degré en puissance (% vol.)	Sucres (g/l)	AV (g/l H ₂ SO ₄)	AT (g/l H ₂ SO ₄)	pH	Activité Laccase (U/ml)	Levures flore totale (UFC/10 ml)	Bactéries flore totale (UFC/10 ml)
Moût initial	13.50	6.22	112	0.75	4.00	3.81	20	Too numerous to count	<1
Moût muté à 20 g/hl de SO ₂	13.50	6.22	112	0.75	4.05	3.81	20	5300	<1
Moût thermoflashé	13.45	6.22	112	0.75	4.05	3.81	0	<1	<1

Ce tableau démontre l'avantage du mutage par Thermoflash® plutôt qu'avec un mutage classique au SO₂ :

- destruction de la laccase : un point particulièrement intéressant lorsque l'état sanitaire du raisin n'est pas satisfaisant. Ainsi, nous observons une diminution des risques oxydasiques.
- destruction de la population levurienne : contrairement au mutage traditionnel où une activité levurienne peut subsister.
- diminution des concentrations en SO₂ libre : compte tenu de la destruction des populations microbiologiques, le risque de refermentation est moindre; ce qui est particulièrement intéressant lors des années à forte combinaison et/ou pour limiter les doses d'intrants.

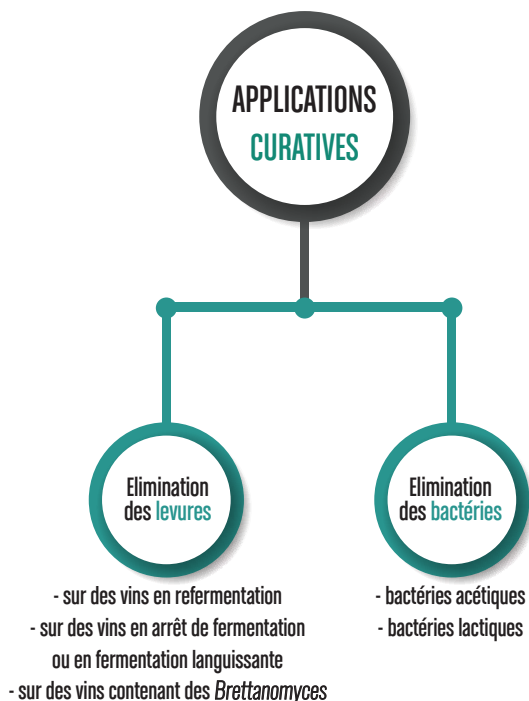
En outre, lors des différentes dégustations effectuées pendant l'élevage, les vins mutés par la Thermoflash® ont toujours été jugés plus volumineux, plus amples avec une fin de bouche plus longue. Ceci peut s'expliquer de plusieurs façons :

- un élevage sur lies favorisé car sécurisé d'un point de vue microbiologique : il n'y a pas besoin d'éliminer les lies par filtration ou soutirage.
- l'autolyse des levures favorisée par la Thermoflash® : elle induit une libération plus importante de mannoprotéines, apportant gras et volume en bouche.
- la teneur alors réduite en SO₂ qui permet aux vins de mieux exprimer leur potentiel organoleptique.

- Préparation des vins avant mise en bouteilles

La Thermoflash® avant mise en bouteilles permet d'éliminer les micro-organismes (<1 UFC/10 ml) tout en respectant le produit, évitant ainsi des filtrations très serrées et donc traumatisantes pour le vin.

Les Applications de la Thermoflash®



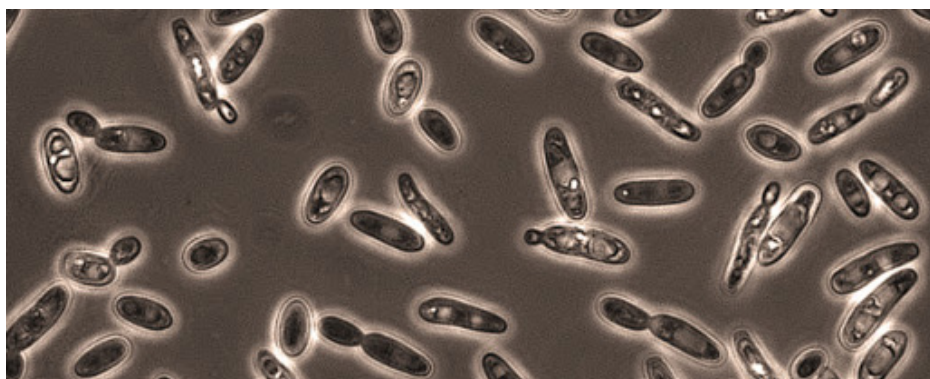
2. Problématique des *Brettanomyces*

Brettanomyces est une levure ubiquitaire que l'on retrouve sur les baies de raisin mais qui est plus souvent associée au vin. Elle est également retrouvée dans l'air de la cave, sur le matériel, les pompes ou les tuyaux vinaires.

Brettanomyces est une levure de contamination du vin. Elle peut engendrer d'importantes déviations organoleptiques et alors déprécier les qualités d'un vin, impactant économiquement le vigneron.

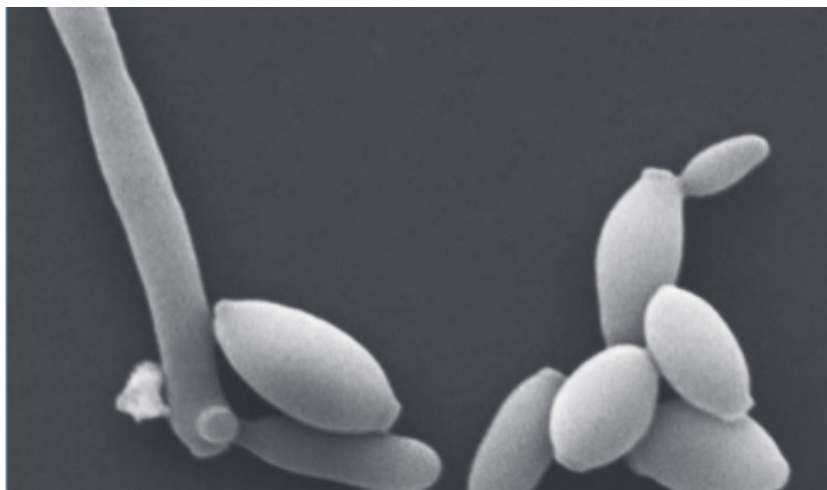
Elle se retrouve fréquemment dans les vins rouges, mais plus rarement dans les vins blancs (pH plus faible et protection du SO_2 plus élevée).

Cette levure d'altération est peu exigeante en sources nutritives, résistante à l'éthanol et aux pH bas. Son développement est d'autant plus rapide que le pH est élevé, le degré d'alcool et le niveau de SO_2 faibles.



BRETTANOMYCES OBSERVÉES AU MICROSCOPE

2.1 Polymorphisme



BRETTANOMYCES EN MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE À BALAYAGE

Brettanomyces est une levure polymorphe dont la taille et la forme peuvent varier considérablement selon son environnement et son état physiologique. On la retrouve sous forme ovale, cylindrique, ellipsoïdale ou sphérique.

En outre, cette levure peut se trouver dans deux états physiologiques différents : à l'état Viable Cultivable (VC) et à l'état Viable Non Cultivable (VNC).

Quelle différence entre ces deux états ?

- **Viable Cultivable (VC)**

Micro-organisme qui, placé dans un milieu optimal, se développe.

- **Viable Non Cultivable (VNC)**

Micro-organisme actif qui ne se multiplie pas mais qui, exposé à un changement de son environnement, recouvre sa «cultivabilité». C'est un état réversible : l'état VNC de *Brettanomyces* peut être induit par une addition de sulfite, puis une modification du pH (diminution du SO_2 actif) ou une baisse du SO_2 libre sortira *Brettanomyces* de l'état VNC par un regain de cultivabilité.

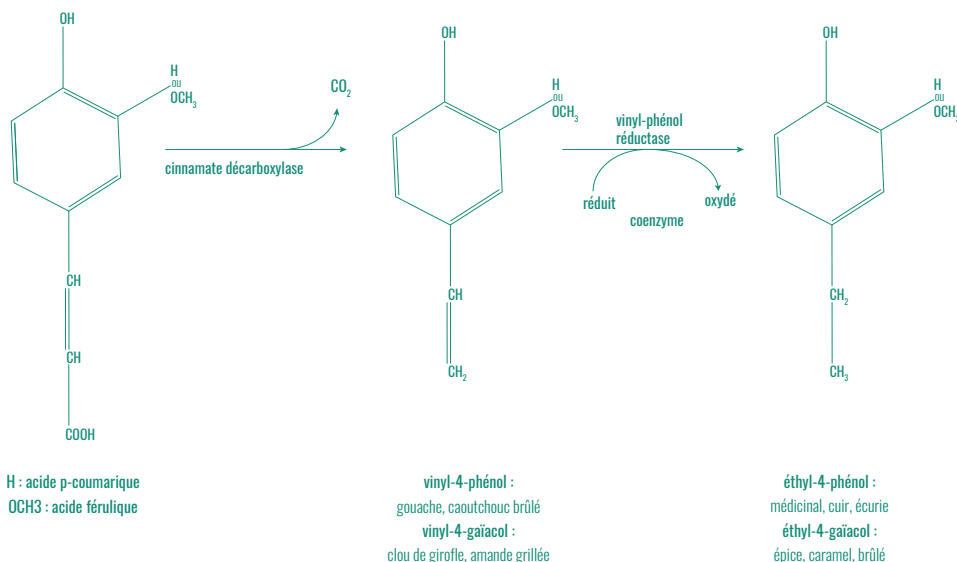
Brettanomyces recouvre alors l'état VC avec l'amélioration des conditions environnementales : on parle de «ressuscitation».

L'état VNC de *Brettanomyces* représente ainsi un risque potentiel de dégradation du vin en recouvrant l'état VC. Dans cet état, *Brettanomyces* pourrait alors contaminer le milieu en se multipliant et produire des altérations organoleptiques.

2.2 Les altérations

Les levures du genre *Brettanomyces* produisent des composés aux odeurs désagréables, dépréciant la qualité et donc la valeur du vin.

Les phénols volatils



Les précurseurs (acide férulique et acide coumarique) sont présents dans le vin à des concentrations variables en fonction du cépage, de la maturité et des choix de vinification (macération...). Leurs transformations en phénols volatils nécessitent deux activités enzymatiques détenues par *Brettanomyces*.

Les éthyl-4-phénols (E4P) et éthyl-4-gaïacols (E4G) sont des molécules volatiles et odorantes qui communiquent au vin un caractère «phénolé» (cuir, écurie, pharmaceutique). Ils agissent également comme «masqueurs d'arômes», faisant perdre toute l'expression aromatique d'un vin.

Les tétrahydropyridines

Le goût de souris est une problématique de plus en plus courante. Il est associé à des odeurs «animales», «fumé gras», «riz», «popcorn»... Trois molécules ont été identifiées comme responsables du goût de souris. Deux d'entre elles, l'ATHP (acétyltétrahydropyridine) et l'ETHP (éthyltétrahydropyridine) sont produites par *Brettanomyces*.

2.3 Thermoflash® et *Brettanomyces*

Une température élevée est la réponse contre les *Brettanomyces*. Elle inhibe les activités de transport et augmente la fluidité membranaire : toutes les fonctions vitales associées aux membranes sont donc stoppées. Si la température excessive est atteinte rapidement et maintenue sur un temps donné, les cellules n'ont pas la capacité à s'adapter : les membranes se détériorent irrémédiablement et les cellules meurent.

Au même titre que les autres levures, les *Brettanomyces* sont sensibles à la température. Ainsi, le traitement par Thermoflash® permet de descendre en dessous d'une UFC/10 ml quel que soit le moment de l'attaque, de la fin de la vinification à la mise en bouteille.

II. DÉNOMBRER LES MICRO-ORGANISMES

1. Explications des différentes méthodes de dénombrement

Pour analyser l'action de la Thermoflash®, il est nécessaire de pouvoir quantifier précisément la population de *Brettanomyces* dans le vin, avant et surtout après le traitement. Plusieurs techniques d'analyses courantes, proposées par les laboratoires œnologiques, vont être détaillées ici pour identifier la méthode la plus pertinente.

Boîte de Petri

La croissance sur milieu de culture sélectif est une méthode classique en microbiologie. Après plusieurs jours d'incubation, les micro-organismes se développent en colonies sur le milieu gélosé et peuvent alors être dénombrés (résultats en UFC/10 ml).

Cette analyse est peu coûteuse, mais le délai de réponse est long.

Pour l'isolement des *Brettanomyces*, une culture sur milieu sélectif *Brettanomyces* est utilisée. Mais avec cette méthode basée sur le développement, seuls les micro-organismes en état VC sont visibles alors que les micro-organismes en état VNC, ne se multipliant pas, ne sont pas détectables. Il y a alors un risque important de sous-estimation des populations contaminantes.

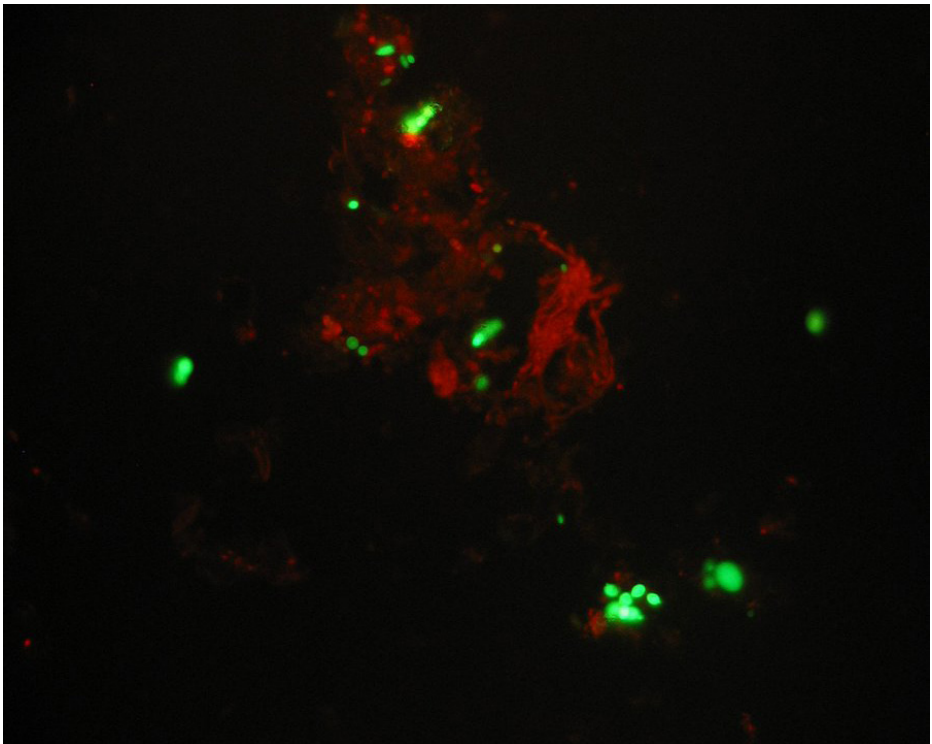


COLONIES DE BRETTANOMYCES SUR BOÎTE DE PETRI

Epifluorescence

Cette technique permet la visualisation et le dénombrement des bactéries et des levures. Le vin est filtré sur une membrane mise en contact avec un fluorochrome qui pénètre dans les cellules. Les cellules viables libèrent alors la fluorescéine grâce à leur activité estérase et il est alors possible de distinguer les cellules mortes des cellules vivantes, tout comme de décrire la forme de ces micro-organismes.

Mais à cause du polymorphisme des *Brettanomyces*, il n'est pas possible des les distinguer selon le seul critère morphologique. Son manque de spécificité fait ici sa faiblesse.



LEVURES VIVANTES (VERTES) ET MORTES (ROUGES) OBSERVÉES AU MICROSCOPE À EPIFLUORESCENCE

PCR Quantitative

La PCR (*Polymerase Chain Reaction* ou réaction de polymérisation en chaîne) est une technique d'amplification enzymatique permettant d'obtenir un grand nombre de copies identiques d'un fragment d'ADN.

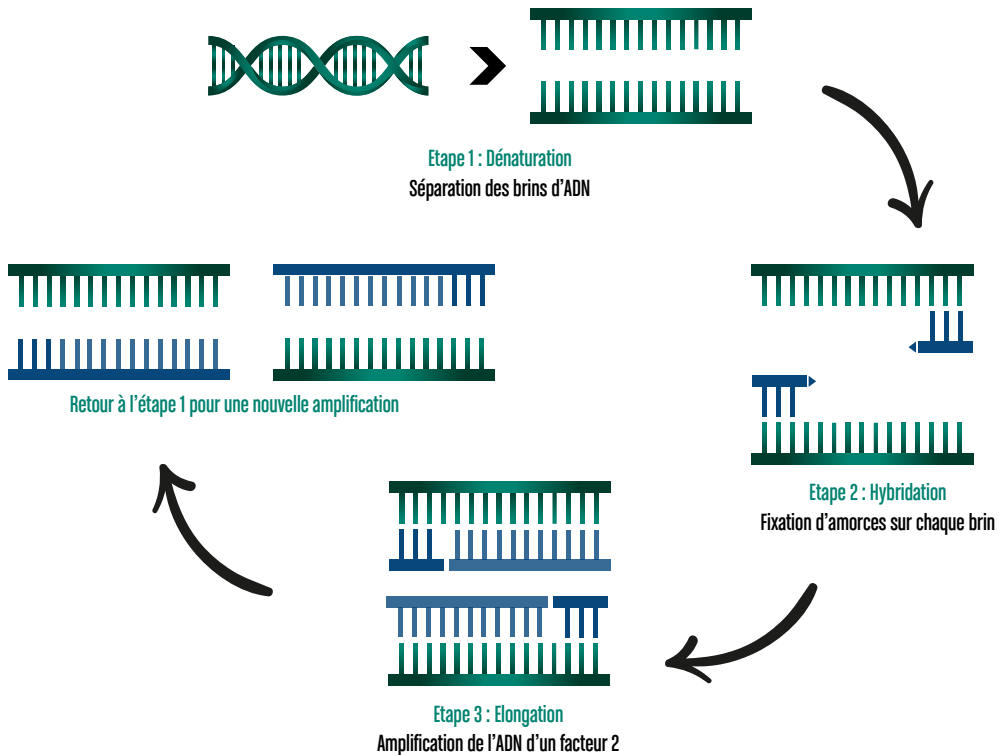


SCHÉMA DE FONCTIONNEMENT DE LA PCR

Le principe consiste à amplifier une région d'ADN d'intérêt balisée par deux amorces spécifiques.

Le procédé nécessite la succession de nombreux cycles avec trois étapes :

- dénaturation : les deux brins d'ADN sont séparés par chauffage (95°C),
- hybridation : en abaissant la température (50-70°C), des amorces spécifiques de l'ADN cible constituées de courts fragments d'ADN viennent s'hybrider sur les brins d'ADN,
- élongation : une enzyme thermostable, la Taq polymérase, complète la synthèse du brin d'ADN à partir de l'amorce grâce aux oligonucléotides présents dans le milieu de réaction.

Un thermocycleur permet d'automatiser la réaction PCR en programmant des cycles consécutifs de montée et de baisse de température. La PCR multiplie les brins d'ADN au cours de cycles successifs avec une augmentation théorique d'un facteur 2 à chaque cycle. La quantification de la population initiale est rendue possible par l'utilisation de molécules fluorescentes qui permettent de suivre l'augmentation de la quantité d'ADN.

• Préparation de l'échantillon :

- sans pré-traitement : l'ADN mort est amplifié et donc quantifié avec l'ADN vivant. Or, après la ThermoFlash®, il y a beaucoup d'ADN mort. Cela entraîne un risque de surestimation de la population viable (faux positifs).
- avec pré-traitement : une molécule est ajoutée lors de la préparation de l'échantillon. Celle-ci va permettre l'élimination des cellules mortes pour ne pas les amplifier dans le thermocycleur et donc éviter les faux-positifs. Mais en cas de faible concentration, la PCR avec pré-traitement perd en fiabilité, ce qui peut entraîner un risque de faux-négatifs.

En plus des risques de faux-positifs et de faux-négatifs, nous avons constaté un manque de répétabilité lors des analyses PCR sur les vins thermoflashés. Après de multiples répétitions sur des lots différents, nous avons opté pour une autre méthode d'analyse : la cytométrie en flux.

Cytométrie en flux

La cytométrie en flux (CMF) est une technique robuste permettant l'analyse de multiples paramètres de cellules isolées dans un flux. La méthode CMF permet à la fois une détection et une quantification des micro-organismes avec rapidité et une forte spécificité. La CMF peut être couplée à une sonde fluorescente (méthode FISH) afin de quantifier spécifiquement les *Brettanomyces*.

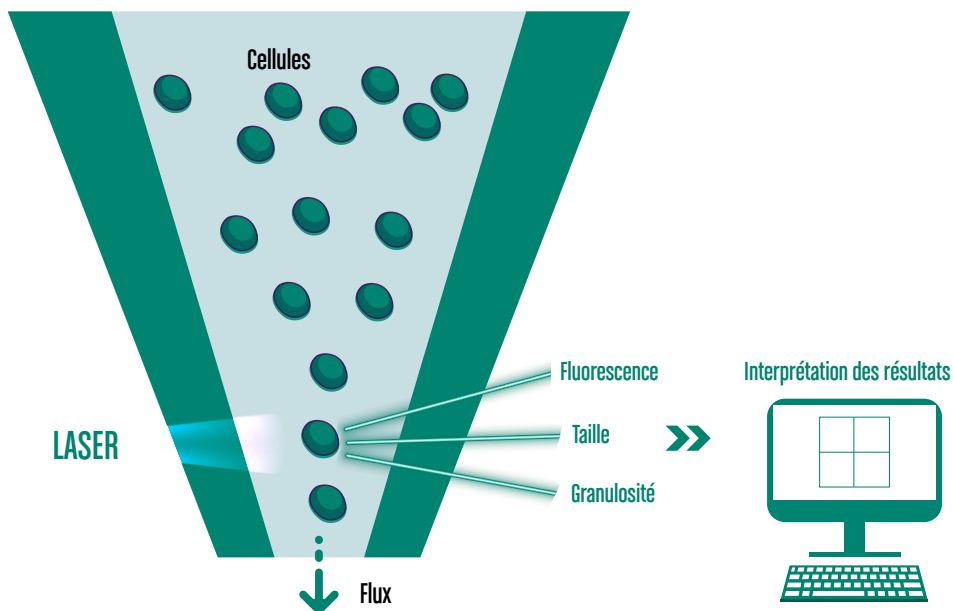


SCHÉMA DE FONCTIONNEMENT DE LA CYTOMÉTRIE

La détection et la quantification se font selon des critères de taille, de granulosité et de fluorescence.

La CMF permet également de faire la distinction entre les levures et les bactéries, d'identifier les *Brettanomyces*, de faire la différence entre les populations à faible viabilité et à forte viabilité, ainsi qu'entre les cellules vivantes et mortes. Avec cette technique, tout ce qui est métaboliquement actif, tels que le sont les états VC et VNC, est considéré comme viable.

2. Résultats d'analyses

Afin d'étudier la véracité des résultats de la Thermoflash®, nous avons soumis 3 vins rouges, avant et après traitement Thermoflash®, à des analyses en cytométrie et boîte de Petri.

Pour cette étude, nous avons utilisé à chaque prestation la même unité de travail (FL180) avec un protocole de travail identique : 20 secondes à 76°C. Les échantillons ont été prélevés dans des contenants stériles de 1 litre. Les robinets qui ont servi au prélèvement ont été stérilisés au préalable.

Les échantillons ont ensuite été déposés en laboratoire le jour même et analysés en cytométrie et boîte de Petri immédiatement.

2.1 Premier vin

Avant Thermoflash®

	Avant Thermoflash®
Levures viables totales (cellule/ml)	3300
Viabilité de la population levurienne totale	modérée
Cytométrie Spécifique <i>Brettanomyces</i> (cellule/ml)	845
Culture sur milieu spécifique <i>Brettanomyces</i> (UFC/ml)	350

L'analyse par cytométrie révèle que le vin renferme une population levurienne totale élevée avec une viabilité modérée. A noter que cette population levurienne totale englobe les VC et VNC. L'analyse spécifique de *Brettanomyces* met en évidence la présence d'une population viable élevée, mais non majoritaire au regard de la population levurienne totale.

En culture en boîte de Petri, une population de *Brettanomyces* à l'état VC est dénombrée. Elle est inférieure de près de moitié à la population dénombrée par analyse en cytométrie, attestant de la présence de cellules à l'état VNC dans le vin analysé.

Après Thermoflash®

	Avant Thermoflash®	Après Thermoflash®			
		T0	J+15	M+1	M+3
Levures viables totales (cellule/ml)	3300	<1/10	<1/10	<1/10	<1/10
Viabilité de la population levurienne totale	modérée	ND	ND	ND	ND
Cytométrie Spécifique <i>Brettanomyces</i> (cellule/ml)	845	ND	ND	ND	ND
Culture sur milieu spécifique <i>Brettanomyces</i> (UFC/ml)	350	<1/100	<1/100	<1/100	<1/100

ND : Non Détecté

Par cytométrie, aussitôt après traitement et jusqu'à 3 mois après traitement, aucune population levurienne viable n'est détectée. Aucun regain de viabilité de la population levurienne totale n'est donc observé.

Les résultats de la boîte de Petri corroborent les résultats obtenus en cytométrie.

2.2 Deuxième vin

Avant Thermoflash®

	Avant Thermoflash®
Levures viables totales (cellule/ml)	240
Viabilité de la population levurienne totale	élevée
Cytométrie Spécifique <i>Brettanomyces</i> (cellule/ml)	50
Culture sur milieu spécifique <i>Brettanomyces</i> (UFC/ml)	3

L'analyse par cytométrie révèle que le vin renferme une population levurienne modérée mais avec une viabilité élevée. L'analyse spécifique de *Brettanomyces* met en évidence la présence d'une population, non majoritaire au regard de la population levurienne totale.

En culture en boîte de Petri, une très faible population VC de *Brettanomyces* est dénombrée. Elle est très nettement inférieure à la population dénombrée par cytométrie attestant d'une importante quantité de cellules à l'état VNC dans le vin analysé.

Après Thermoflash®

	Avant Thermoflash®	Après Thermoflash®			
		T0	J+15	M+1	M+3
Levures viables totales (cellule/ml)	240	<1/10	<1/10	<1/10	<1/10
Viabilité de la population levurienne totale	élevée	ND	ND	ND	ND
Cytométrie Spécifique <i>Brettanomyces</i> (cellule/ml)	50	ND	ND	ND	ND
Culture sur milieu spécifique <i>Brettanomyces</i> (UFC/ml)	3	<1/100	<1/100	<1/100	<1/100

Par cytométrie, aussitôt après traitement et jusqu'à 3 mois après traitement, aucune population levurienne viable n'est détectée. Aucun regain de viabilité de la population levurienne totale n'est donc observé.

Les résultats de la boîte de Petri corroborent les résultats obtenus en cytométrie.

2.3 Troisième vin

Avant Thermoflash®

	Avant Thermoflash®
Levures viables totales (cellule/ml)	48
Viabilité de la population levurienne totale	élevée
Cytométrie Spécifique <i>Brettanomyces</i> (cellule/ml)	15
Culture sur milieu spécifique <i>Brettanomyces</i> (UFC/ml)	45

Le vin renferme une population levurienne totale faible avec une viabilité élevée. L'analyse spécifique de *Brettanomyces* met en évidence la présence d'une faible population.

En culture en boîte de Petri, une faible population VC de *Brettanomyces* est dénombrée. Le résultat est similaire à ceux obtenus en cytométrie.

Après Thermoflash®

	Avant Thermoflash®	Après Thermoflash®			
		T0	J+15	M+1	M3
Levures viables totales (cellule/ml)	48	<1/10	<1/10	<1/10	<1/10
Viabilité de la population levurienne totale	élevée	ND	ND	ND	ND
Cytométrie Spécifique <i>Brettanomyces</i> (cellule/ml)	15	ND	ND	ND	ND
Culture sur milieu spécifique <i>Brettanomyces</i> (UFC/ml)	45	<1/100	<1/100	<1/100	<1/100

Par cytométrie, aussitôt après traitement et jusqu'à 3 mois après traitement, aucune population levurienne viable n'est détectée. Aucun regain de viabilité de la population levurienne totale n'est observé.

Les résultats de la boîte de Petri corroborent les résultats obtenus en cytométrie.

2.4 Conclusion sur l'efficacité du traitement

Pour chacun des 3 vins, la méthode de cytométrie en flux atteste que la technique de Thermoflash® permet d'éliminer les populations levuriennes VC et VNC, dont *Brettanomyces*, de façon immédiate. Il n'y a aucun regain de viabilité et cultivabilité après 3 mois de conservation à 15°C, sans correction de la concentration en SO₂.

Les résultats en boîte de Petri confirment l'absence de VC mais seule la cytométrie en flux peut attester de l'élimination commune des VC et des VNC.

III. AUCUNE INFLUENCE DE LA THERMOFLASH® SUR LE VIN

Un préjugé s'est installé dans le milieu vinicole : la Flash-Pasteurisation pourrait abîmer les vins. Persuadés de l'authenticité de ces propos, certains vignerons ont fini par s'éloigner de cette technique.

Pourtant, la Thermoflash® n'engendre aucune modification sur le vin. Nous le savons depuis 20 ans mais il était temps d'en faire la démonstration.

Pour cela, nous avons réalisé de nombreuses analyses en laboratoire et des dégustations pour prouver que cette prestation préserve les qualités organoleptiques des vins.

1. La preuve par l'analyse

Nous avons comparé les indicateurs œnologiques courants avant et après traitement : TAV, AV, AT, pH, IPT, Intensité Colorante Modifiée, DO 420, DO 520, DO 620, Nuance, Glucose Fructose, Tanins et Anthocyanes.

Identification du prélèvement	11204	11204			
Site de prélèvement	Avt traitement	Après traitement			
Appellation					
Couleur	Rouge	Rouge			
Millésime					
Volume (hl)					
Informations complémentaires	MCO	MCO			
Référence Laboratoire	170825-29171	170825-29172			
Analyses & Méthodes	Résultats par Echantillon				Unités
Analyses œnologiques courantes					
Titre Alcoométrique Volumique à 20°C MO 12: Réflectance Infrarouge +/- 1%	14.25 *	14.22 *			% Vol.
D-Glucose + D-Fructose Dosage enzymatique LD = 0.07 ; LQ = 0.20 ; +/- 8%	2.77 *	2.77 *			g/L
Acidité totale MO 08: Titrimétrie Potentiométrique automatisée +/- 6%	3.31 *	3.26 *			g/L H2SO4
Acidité volatile MO 01: Flux Continu LD = 0.02 ; LQ = 0.06 ; +/- 8%	0.63 *	0.65 *			g/L H2SO4
Acide L-Malique Dosage enzymatique LD = 0.03 ; LQ = 0.1 ; +/- 11%	0.01 *	0.01 *			g/L
Acide L-Malique Dosage enzymatique LD = 0.03 ; LQ = 0.1 ; +/- 11%	Non détecté *	Non détecté *			g/L
pH MO 08: Titrimétrie Potentiométrique automatisée +/- 2%	3.71 *	3.71 *			
Intensité colorante modifiée MO 19: Spectrophotométrie	12.79 *	12.77 *			
DO 420 MO 19: Spectrophotométrie +/- 13%	4.860 *	4.860 *			
DO 520 MO 19: Spectrophotométrie +/- 13%	6.170 *	6.150 *			
DO 620 MO 19: Spectrophotométrie +/- 12%	1.760 *	1.760 *			
IPT (DO280) MO 25: Spectrophotométrie +/- 12%	63 *	64 *			
Anthocyanes Décoloration au SO2 +/- 9%	505	482			mg/L
Nuance MO 19: Spectrophotométrie	0.788 *	0.790 *			
Tanins Chauffage en milieu acide +/- 10%	3.7	3.9			g/L
Analyses microbiologiques					
Dénombrement levures Culture sur milieu gélosé spécifique	6/mL	<1/10mL			UFC
Composés du bois					
5-Hydroxyméthylfurfural HPLC/UV +/- 15%	0.36	0.31			mg/L

EXEMPLE D'ANALYSES (ROUGE 2016)

Les résultats sont sans appel : aucune variation significative de ces paramètres avant et après traitement.

Hormis évidemment la population de levures, passée sous le seuil de détection grâce à l'action de la Thermoflash® !

2. La preuve par la dégustation

Plusieurs dégustations à l'aveugle ont été réalisées afin de déterminer si les vins avant et après Thermoflash® pouvaient être différenciés.

Les essais ont été menés sur quatre vins différents. Tous ces vins ont été traités pour des problématiques microbiennes (présence de *Brettanomyces*).

Composition du jury de dégustateurs :

Les dégustations ont été réalisées par un total de 8 personnes qui se caractérisent de la façon suivante :

- 3 femmes et 5 hommes,
- 6 personnes de 30-40 ans et 2 personnes de 40-50 ans,
- tous des professionnels du vin, avec l'habitude de déguster.

Les tests d'analyses sensorielles ont été réalisés quelques jours après la réalisation de la prestation :

- tests comparatifs,
- tests triangulaires.

2.1. Test 1 : tests comparatifs

Lors de ces tests, deux verres étaient proposés aux dégustateurs. Il leur a été demandé si les vins étaient similaires, et dans le cas contraire, le dégustateur devait indiquer les descripteurs intervenant dans leur critère de différenciation.

	Sans réponse	Réponse retenue	Différence observée	Critères de différenciation
1ère dégustation	0	8	0	/
2ème dégustation	0	8	1	Vin plus fermé pour le vin non traité
3ème dégustation	0	8	0	/
4ème dégustation	0	8	0	/

Ces tests comparatifs mettent en évidence que les dégustateurs ne trouvent pas de différence entre les deux vins : 96% trouvent les vins identiques. Seul un dégustateur trouve une différence.

Cela permet de conclure que la prestation de Thermoflash® n'a pas d'impact sur les caractéristiques organoleptiques des vins.

2.2. Test 2 : tests triangulaires

Chaque poste avait une configuration différente. Il a été demandé aux dégustateurs de retrouver les deux verres identiques.

	Sans réponse	Réponse retenue	Différence observée
1ère dégustation	0	8	0
2ème dégustation	0	8	0
3ème dégustation	0	8	1
4ème dégustation	0	8	0

Ces tests triangulaires mettent en évidence que seul un dégustateur a trouvé une différence : 96% des dégustateurs ne différencient pas les vins.

2.3. Conclusion

Qu'il s'agisse des tests comparatifs ou des tests triangulaires, les dégustateurs ne font pas de différence entre les vins avant et après l'action de la Thermoflash®.

Les analyses et les dégustations à l'aveugle se corroborent : la prestation de Thermoflash® n'a pas d'impact sur les caractéristiques organoleptiques des vins.

IV. LA THERMOFLASH® ÉLIMINE LES MICRO-ORGANISMES, CONTRAIREMENT À LA FILTRATION TANGENTIELLE

1. Différence entre les deux technologies

Comme nous l'avons expliqué précédemment, les levures *Brettanomyces* ont des tailles et des formes très variables. Le polymorphisme de ces levures d'altération engendre une difficulté de rétention sur filtre. Si les *Brettanomyces* à l'état VC ont une taille moyenne comprise entre 1 et 2 μm , à l'état VNC, celles-ci ont des tailles diminuées et des formes variées.

La Thermoflash®

Les *Brettanomyces*, comme toutes les levures, sont sensibles à la température. A forte température, il y a un arrêt de toutes les activités de transport et les membranes cellulaires se détériorent. Un barème temps-température adapté à la thermorésistance de la souche *Brettanomyces*, quel que soit son état physiologique a été défini. Les caractéristiques de destruction thermique de *Brettanomyces* sont connues. Ainsi une température de 76 °C, maintenue pendant 20 secondes, permet de descendre en dessous d'une UFC/10 ml. La Flash-pasteurisation permet alors l'élimination des micro-organismes présents au moment du traitement. L'atout majeur du traitement physique est le niveau d'efficacité du traitement, quel que soit le niveau de population du départ.

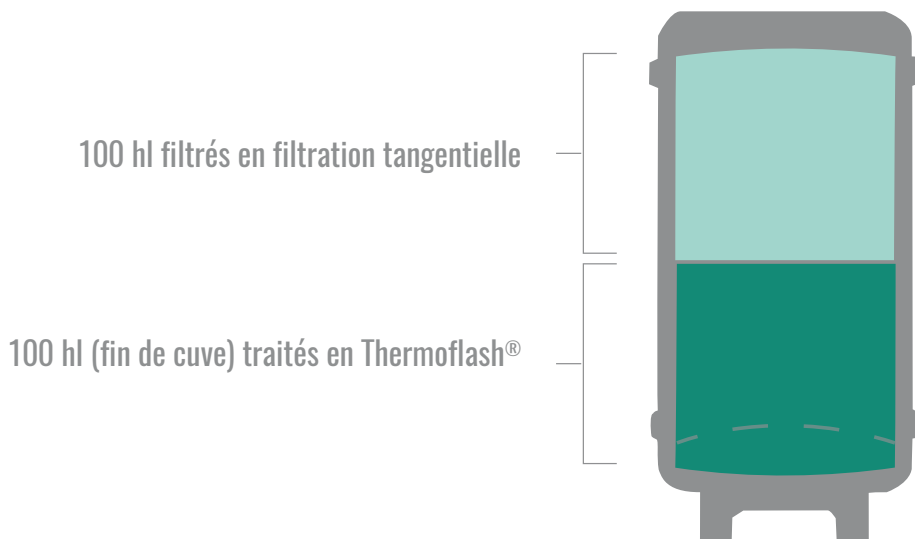
La filtration tangentielle

Les membranes du filtre tangentiel ont un diamètre de 0.2 μm . En théorie, ce filtre est donc capable de retenir les *Brettanomyces* dans un état VC. Or, les études ont montré qu'en fonction du niveau de population initiale, la rétention de ces levures à l'état VC peut être partielle. En revanche, les levures *Brettanomyces* à l'état VNC et les bactéries (taille inférieure à 1 μm) ne sont pas retenues.

Cette méthode n'est donc pas efficace pour cette levure de contamination, puisque certaines cellules sont capables de passer au travers des membranes.

2. La preuve par les analyses

Pour cette étude, nous avons comparé les résultats analytiques et microbiologiques d'une cuve de 200 hl de vin rouge, appellation Saint Estèphe millésime 2017, soumise au protocole suivant :



Les échantillons ont été prélevés dans des contenants stériles d'une contenance de 1 litre. Les robinets qui ont servi aux prélèvements ont été stérilisés au préalable. Les échantillons ont ensuite été déposés en laboratoire le jour même et analysés immédiatement.

Les vins ont été observés pendant 6 mois et conservés dans les mêmes conditions. Aucun réajustement de la concentration en SO_2 n'a été réalisé sur cette période.

2.1. Caractéristiques analytiques du vin

	Avant traitement	Après Thermoflash®					Après Filtration tangentielle				
		T0	J+15	M+1	M+3	M+6	T0	J+15	M+1	M+3	M+6
TAV (%vol.)	12.95	12.95 (%vol)	/	/	/	/	12.9	/	/	/	/
G+F (g/l)	<0.2	<0.2	/	/	/	/	<0.2	/	/	/	/
AV (g/l H ₂ SO ₄)	0.33	0.33	0.35	0.34	0.34	0.33	0.33	0.34	0.38	0.38	0.46
AT (g/l H ₂ SO ₄)	3.31	3.34	/	/	/	/	3.33	/	/	/	/
pH	3.62	3.61	/	/	/	/	3.6	/	/	/	/
IPT (mg/l)	60	60	/	/	/	/	59	/	/	/	/
SO ₂ L (mg/l)	24	25	15	10	5	<5	23	13	10	5	5
SO ₂ T (mg/l)	70	75	/	/	/	/	68	/	/	/	/
E4P (µg/l)	238	237	240	236	265	281	235	240	234	260	438
E4G (µg/l)	37	34	24	20	30	30	36	29	47	32	109

6 mois après Thermoflash®, l'Acidité Volatile (AV) et les teneurs en phénols volatils restent stables et ce malgré une diminution de la concentration en SO₂ libre.

En revanche, 6 mois après filtration tangentielle, la concentration en phénols volatils augmente (et atteint le seuil de perception) et l'AV augmente également.

2.2. Caractéristiques microbiologiques du vin

Avant traitement :

	Avant traitement
Levures viables totales (cellule/ml)	510
Viabilité de la population levurienne totale	élevée
Cytométrie Spécifique <i>Brettanomyces</i> (cellule/ml)	15
Culture sur milieu spécifique <i>Brettanomyces</i> (UFC/ml)	22

Le vin renferme une population levurienne avec une viabilité élevée. L'analyse spécifique de *Brettanomyces* par cytométrie met en évidence la présence d'une faible population viable, non majoritaire au regard de la population levurienne totale. Par une analyse sur boîte de Petri, une population de *Brettanomyces* à l'état viable cultivable est dénombrée. Elle est similaire à la population dénombrée par cytométrie.

Après traitement par Filtration tangentielle :

	Avant Thermoflash®	Après Filtration tangentielle				
		T0	J+15	M+1	M+3	M+6
Levures viables totales (cellule/ml)	510	32	112	48	20672	12100
Viabilité de la population levurienne totale	élevée	élevée	modérée	élevée	élevée	élevée
Cytométrie Spécifique <i>Brettanomyces</i> (cellule/ml)	15	<5	15	5	5	120
Culture sur milieu spécifique <i>Brettanomyces</i> (UFC/ml)	22	5	10	5	Too Numerous Too Count	300

Dans les mois qui suivent la filtration tangentielle, une population de *Brettanomyces* est dénombrée jusqu'à atteindre un niveau élevé de contamination 6 mois après le traitement.

En boîte de Petri, on observe une population levurienne très importante 3 mois après la filtration tangentielle.

Après traitement par Thermoflash® :

	Avant Thermoflash®	Après Thermoflash®				
		T0	J+15	M+1	M+3	M+6
Levures viables totales (cellule/ml)	510	<10	<10	<10	<10	<10
Viabilité de la population levurienne totale	élevée	/	/	/	/	/
Cytométrie Spécifique <i>Brettanomyces</i> (cellule/ml)	15	/	/	/	/	/
Culture sur milieu spécifique <i>Brettanomyces</i> (UFC/ml)	22	<1/100	<1/100	<1/100	<1/100	<1/100

Aucune population levurienne viable n'est détectée. Aucun regain de viabilité de la population levurienne totale n'est donc observé pour cette modalité durant les 6 mois suivant le traitement.

2.3. Conclusion

L'efficacité du traitement Thermoflash® est validée par les analyses en cytométrie et en culture sur milieu spécifique.

Aussitôt après filtration tangentielle, une population résiduelle est dénombrée. Celle-ci va augmenter dans les mois qui suivent.

Sur les bases de ces résultats, on peut conclure à l'efficacité immédiate du traitement par Thermoflash® pour éliminer les populations *Brettanomyces* à l'état viable cultivable et à l'état viable non cultivable.

De son côté, la filtration tangentielle ne permet pas d'éliminer totalement la population levurienne dont *Brettanomyces*, qui connaît après plusieurs mois une recrudescence.

En outre, le traitement par Thermoflash® peut être mis en œuvre pendant l'élevage, sans le remettre en cause car il n'y a pas de clarification du vin contrairement à la filtration tangentielle.

Mieux comprendre la Thermoflash®



V. CONCLUSION GÉNÉRALE

La Thermoflash® est un traitement physique efficace et homogène pour l'élimination des micro-organismes, notamment des *Brettanomyces* à l'état viable cultivable et à l'état viable non cultivable.

La Thermoflash® permet d'assainir le milieu durablement sans ajout d'intrant, et sans impacter les qualités organoleptiques du vin.

Cette technique éprouvée a de nombreuses applications préventives et curatives, sans remettre en cause l'élevage et sans perte de vin.

Le procédé est totalement maîtrisé pour un résultat efficace dans le parfait respect du produit. Un œnotechnicien pilote la prestation et assure sa traçabilité.

Les points clés de la Thermoflash®



Un traitement physique efficace,
durable et homogène



Des applications curatives,
comme préventives



Un procédé maîtrisé par nos
oenotechniciens



Aucune perte de vin



Aucune remise en cause de
l'élevage



Une efficacité sur tous les états des micro-organismes,
Viables Cultivables et Viables Non Cultivables



Le respect du produit au coeur de la prestation

MICHAEL PAETZOLD

L'ŒNOTECHNIQUE EN CONSCIENCE

Forte de 150 collaborateurs-trices, notre entreprise est spécialisée dans les traitements physiques (filtration, équilibres gustatifs, mise en bouteille, reconditionnement...) respectueux du vin. Nous intervenons auprès de 7000 clients, Domaines, Châteaux, Caves coopératives et Négoces en Europe, en Amérique et en Afrique. Notre site de Cadaujac (Gironde, France) regroupe le siège social, le centre de R&D/conception œnotechnique et l'atelier de fabrication. Nos 7 agences en France, Espagne et Afrique du Sud apportent un accompagnement commercial et technique au plus près des grands vignobles.

Notre catalogue compte aujourd'hui 29 prestations œnotechniques, configurées à chaque problématique et chaque besoin vinicole, dont la Thermoflash®, notre procédé œnologique de précision dédié à l'élimination des micro-organismes.



NOS AGENCES DANS TOUTE LA FRANCE

AGENCE CENTRE / VAL DE LOIRE

Site de Saumur
38, impasse du Pigeonnier
49400 SAUMUR
Tél. : 0241385706

AGENCE CENTRE / VAL DE LOIRE

Site de Sancerre
14 rue A Cantin
18300 BANNAY
Tél. : 0248723780

AGENCE BOURGOGNE

"Les Grandes Corvées" - RN 6
21190 CHASSAGNE MONTRACHET
Tél. : 0380219841

AGENCE AQUITAINE

ZI de Calens - D 1113
33640 BEAUTIRAN
Tél. : 0556675046

SIEGE SOCIAL

3700 avenue de Toulouse
33140 CADAUJAC
Tél. : 0557838585

AGENCE MÉDITERRANÉE

Lieu dit La Bertrane
Route de Lançon - BP 39
13330 PELISSANNE
Tél. : 0490428746

MICHAEL PAETZOLD

L'ÉNOTECNIQUE EN CONSCIENCE

3700, avenue de Toulouse • 33140 Cadaujac • France
Tél. : +33 (0)5 57 83 85 85

WWW.MICHAELPAETZOLD.COM