

EVIDENCES DE L'INTERET DES LEVAINS MALOLACTIQUES SUR LE PROFIL AROMATIQUE DES VINS

Dr. Vincent RENOUF

Chef produit bactéries – LAFFORT BP17 – 33072 BORDEAUX cedex – France vincent.renouf@laffort.com

Introduction.

La fermentation malolactique (FML) est une étape clef dans l'élaboration des vins rouges et de certains vins blancs. Elle permet d'éliminer l'acide-L-malique qui conférait une « verveur » indésirable au vin. L'acide-L-lactique qui en résulte est moins agressif. Il possède une attaque plus douce et aigrelette. Pendant la FML, les bactéries lactiques sont à l'origine d'autres modifications notables : apparition des arômes beurrés (Bartowski et Henscke 2004), révélations des notes boisées lors des FML en barriques ou avec des copeaux (Bloem et al. 2007). Certains effets sont également suspectés : impact sur les arômes fruités des vins, effet sur la couleur... Ils sont, à l'heure actuelle, plus ou moins bien caractérisés et doivent encore faire l'objet de travaux de recherche.

Dans tous les cas, la FML est la dernière intervention microbienne souhaitée et souhaitable dans l'itinéraire de vinification. Après, la flore microbienne du vin doit être stabilisée car les micro-organismes susceptibles d'agir : bactéries lactiques résiduelles, bactéries acétiques et levures d'altérations peuvent être très préjudiciables.

L'objectif de ce travail n'est pas de mettre en évidence les effets directs des bactéries lactiques sur les profils organoleptiques des vins durant la FML mais de démontrer pourquoi une bonne gestion de la FML est indispensable pour préserver les qualités aromatiques du vin en cours d'élaboration.

L'origine des bactéries lactiques du vin.

L'origine naturelle des bactéries lactiques du vin est le raisin. Avec les moisissures et les levures, les bactéries tapissent naturellement les baies. Lors des vendanges, la population bactérienne est de l'ordre de 100 à 1000 cellules par baie. A ce moment la diversité des espèces est très importante. Une cinquantaine d'espèces de bactéries peuvent être identifiées à partir d'un échantillon de raisins (Renouf et al. 2005a), parmi lesquelles l'espèce *Oenococcus oeni* (*O. oeni*), principale actrice de la FML, et les espèces d'altération (*Pediococcus* sp.) (Figure 1). Par la suite, dans le moût puis dans le vin, l'environnement change considérablement. L'ajout de SO₂, les variations de la température, la production d'éthanol par les levures de la fermentation alcoolique (FA) sont des contraintes pour les bactéries. Seules subsistent les espèces les plus résistantes, parmi lesquelles *O. oeni*. Cette dernière est bien armée pour survivre et se développer dans le vin après FA. Mais certaines espèces indigènes d'altérations comme, les *Pediococcus* sp., résistent aussi très bien aux contraintes environnemental (Tableau 1).

D'un point de vue physiologique, bien souvent le métabolisme lié à une altération confère un avantage sélectif aux bactéries qui l'expriment. Par exemple, la transformation de certains acides aminés en amines biogènes est une source d'énergie cellulaire utile à la bactérie. Lorsque que les conditions sont trop contraignantes, lors des fermentations spontanées, la présence de souches d'altérations est donc plus probable que lorsque les conditions du milieu sont plus clémentes.

Au sein d'une même espèce, *O. oeni* par exemple, il existe également une diversité importante entre les souches (Renouf et al. 2008). Certaines peuvent être préjudiciables. Elles possèdent les gènes impliqués dans les métabolismes d'altération. Les autres sont « inoffensives » car elles sont dépourvues de ces gènes. De même certaines souches sont mieux armées pour résister aux conditions œnologiques (alcool, SO₂, pH...) que d'autres. Là aussi, des différences de patrimoine génétique sont à l'origine de cette diversification des métabolismes (Renouf et al. 2007a).

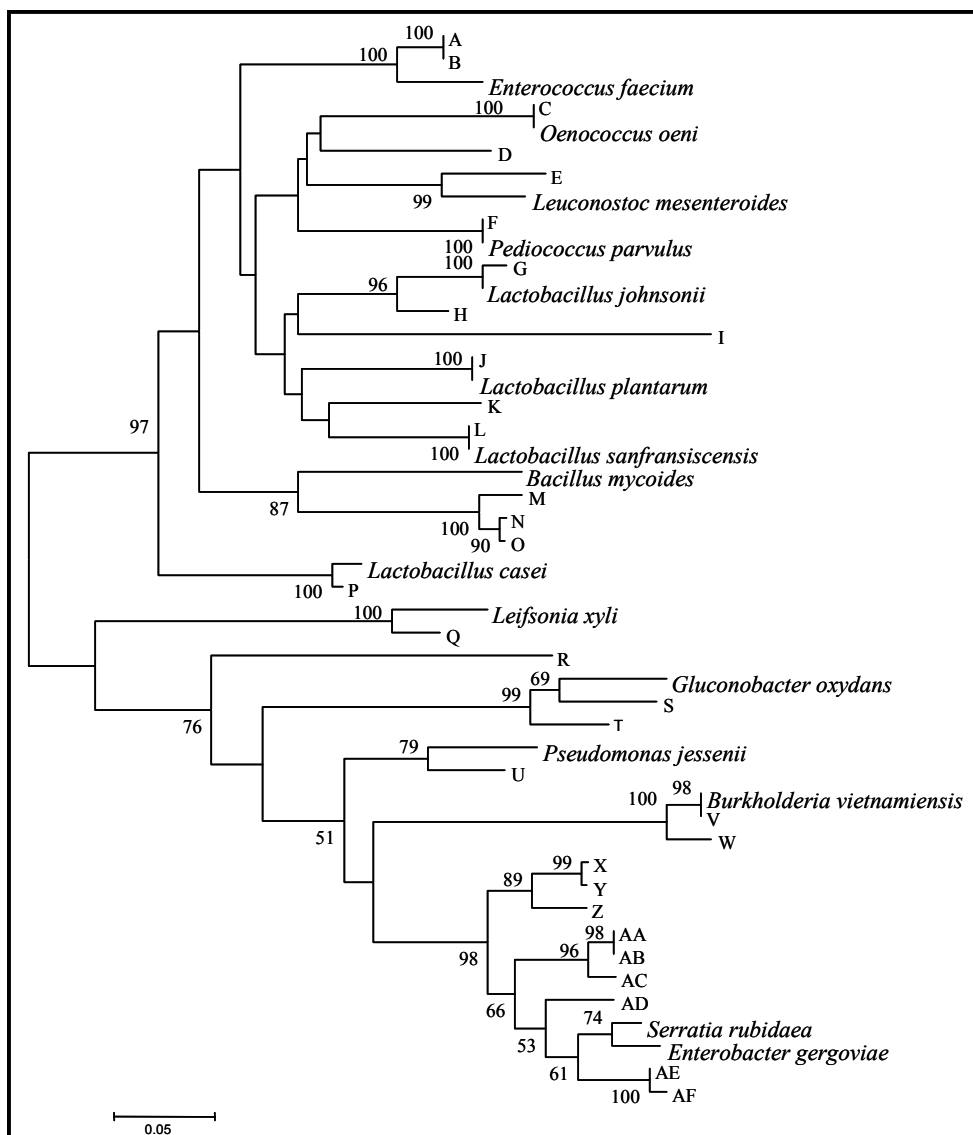


Figure 1 : Inventaire des espèces de bactéries du raisin (les lettres symbolisent les bactéries isolées du raisin, leur ADN est comparé aux espèces de référence, en italique, pour identification).

Tableau 1 : Liste des principales altérations causées par les bactéries lactiques indigènes du vin.

Altération	Conséquences	Microorganismes
Production excessive d'acidité volatile	Acescence – perte du caractère fruité et de la fraîcheur	Toutes les bactéries lactiques indigènes
Dégradation du glycérol	Amertume	<i>Lactobacillus</i> sp.
Dégradation de l'acide tartique	Affadissement du vin et perte des couleurs vives	<i>Lactobacillus</i> sp. et certaines souches d' <i>Oenococcus</i> .
Production d'exopolysaccharides	Aspect huileux	<i>Pediococcus</i> sp. et certaines souches indigènes d' <i>O. oeni</i>
Production d'amines biogènes	Masque des caractères fruités et effets préjudiciables sur la santé des consommateurs : maux de têtes...	<i>Lactobacillus</i> sp. et certaines souches indigènes d' <i>O. oeni</i> .
Production de phénols volatils	Odeurs animales	<i>Lactobacillus</i> sp. et <i>Pediococcus</i> sp.

Actuellement, la production d'amines biogènes est une problématique pour les microbiologistes du vin, les praticiens et les acheteurs. La teneur élevée en amines biogènes

masque les caractères fruités des vins, mais surtout cela engendre chez les sujets sensibles des réactions allergiques désagréables (rougeurs, maux de tête...). Aujourd'hui, la teneur maximale en amines biogènes est soumise à la réglementation pour l'exportation dans certains pays (Suisse et Canada notamment). En France, de plus en plus d'acheteurs imposent une concentration limite à leurs collaborateurs. De récents travaux menés à la faculté d'œnologie de Bordeaux par Patrick Lucas sur le domaine bordelais ont démontré que les souches indigènes productrices d'amines biogènes étaient fréquemment présentes dans les vins à des niveaux de populations pouvant atteindre 10^6 ϕ /mL. Ainsi, lors des FML indigènes, les doses d'amines biogènes sont généralement bien supérieures aux limites admises (entre 2 et 10 mg/L).

Les levains malolactiques

Pour contrôler la flore bactérienne indigène, qui est donc une source naturelle d'altérations et dont les aptitudes fermentaires sont inconnues et imprévisibles, des levains malolactiques ont été développés. Un levain malolactique est une souche d'*O. oeni* sélectionnée pour ses *aptitudes œnologiques* (résistance et capacité de croissance dans le vin, cinétique fermentaire) et l'*absence de métabolismes préjudiciables*. L'avancée des connaissances moléculaires a permis d'identifier les gènes incriminés dans la production de métabolites d'altération (Walling et al. 2001, Claisse et Lonvaud-Funel 2001, Lucas et Lonvaud-Funel 2002). Des tests de mise en évidence de la présence des métabolismes d'altération ont été mis au point. Lorsqu'une souche d'*O. oeni* est sélectionnée, son innocuité (=absence de métabolisme d'altération) est systématiquement contrôlée par PCR au laboratoire puis vérifiée lors de micro-vinifications.

Outre l'amélioration de la cinétique fermentaire qui assure un gain de temps et un contrôle des frais énergétiques nécessaires pour maintenir le vin à une température clémente pour les bactéries, la présence massive de la souche sélectionnée rend négligeable les métabolismes de la flore bactérienne indigène. En effet, le levain malolactique est directement introduit à des niveaux de population (10^6 ϕ /mL) et d'activité (qui peut être favorisée par une étape rapide de ré-acclimatation de la souche en présence d'éléments nutritifs) élevés tandis que les cellules indigènes, qui ont du résister à la FA (production d'éthanol et d'autres composés inhibiteurs : SO₂, acides gras à moyenne chaîne...), sont à des niveaux de populations plus bas (couramment entre 10 et 10^3 ϕ /mL) et dans un état physiologique moins optimal. L'utilisation d'un levain malolactique s'impose donc à l'écosystème dès son inoculation dans le vin. Il permet ainsi de contrôler les flores d'altérations indigènes et de réduire les altérations des vins durant la FML.

Pour optimiser les avantages conférés, l'utilisation d'un levain malolactique doit être s'inscrire dans une gestion raisonnée des fermentations. En amont de l'itinéraire de vinification, il est recommandé de prévoir l'utilisation de la souche sélectionnée de bactérie. Il est, en effet, préférable d'anticiper la croissance de la flore indigène et la colonisation du milieu par cette dernière car, dans ce cas, non seulement les bactéries indigènes peuvent débiter la production des composés préjudiciables mais leur présence à des niveaux de populations semblables à celle du levain entraînerait des phénomènes de compétition entre les souches. Ces compétitions peuvent nuire l'implantation du levain et réduire son efficacité. A la fin de la FA, la flore bactérienne indigène est naturellement à des niveaux bas de populations car parmi les nombreuses souches initialement présentes sur le raisin et dans le moût, de nombreuses ont disparues à cause des stress environnementaux subis lors de la FA, et, celles qui ont résisté n'ont pas encore eu le temps de se développer. C'est donc à ce moment là que doit être introduit le levain malolactique pour assurer l'efficacité de son implantation (Figure 2).

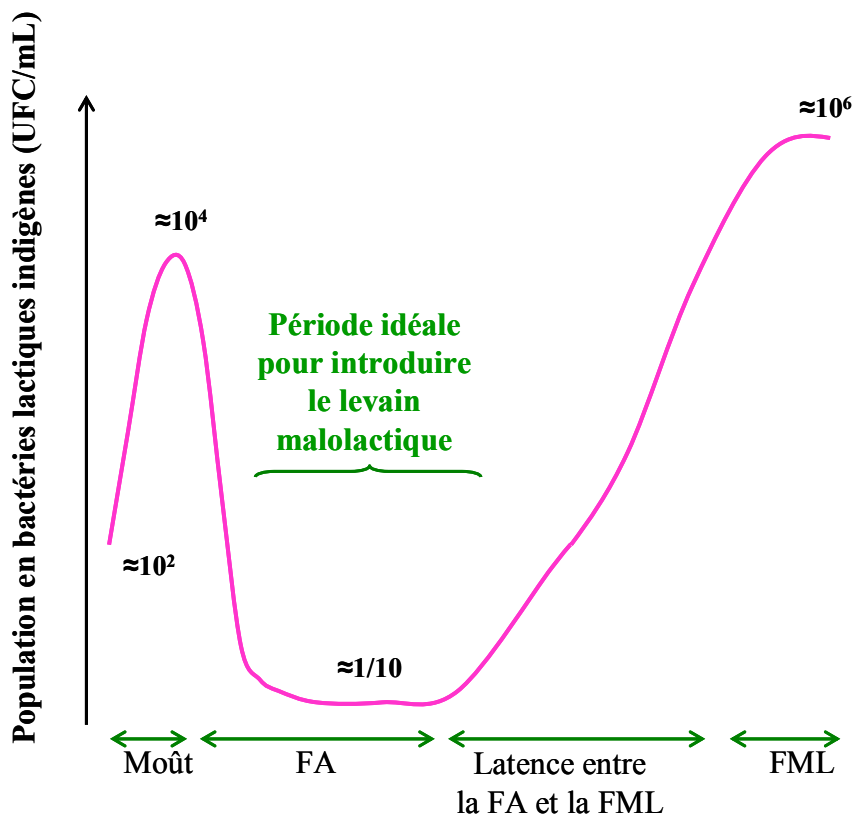


Figure 2 : Evolution naturelle des bactéries lactiques indigènes lors des vinifications.

1 : Dans le moût, les cellules du raisin trouvent des conditions favorables à la croissance, la population croît

2 : Lors de la FA, les souches sensibles à l'alcool disparaissent, les cellules résistantes subsistent mais ne se développent pas car le milieu est encore occupé par les levures de la FA, la population diminue puis stagne à des niveaux très bas.

3 : Entre la FA et la FML, les souches qui ont résisté à la fin de la FA débutent leur phase de croissance. Cette phase peut être relativement longue selon les qualités des souches et les conditions du milieu.

4 : Lorsque la population atteint 10^6 UFC/mL la dégradation de l'acide malique devient significative, c'est la FML.

Il est donc recommandé de pratiquer un ensemencement précoce: classiquement aussitôt après l'écoulage, voire même encore plus en amont avec les protocoles de co-inoculation (Figure 3). Les phénomènes de compétitions avec les flores indigènes sont alors minimisés et les conditions du milieu sont moins hostiles aux bactéries. En co-inoculation, il est évident qu'un moût en fermentation est plus favorable au levain malolactique que le vin correspondant riche en éthanol et dont les facteurs nutritifs ont été épuisés par les levures. Lorsque l'utilisation n'a pas été programmée par praticien, et que la flore indigène a été déficiente, l'inoculation tardive ou curative est possible, mais dans ce cas il est important de bien considérer que les conditions sont plus difficiles (carences nutritionnelles et compétitions avec les autres microorganismes). L'utilisation d'activateur de la FML peut dans ce cas s'avérer nécessaire pour détoxifier le milieu et/ ou nourrir les bactéries.

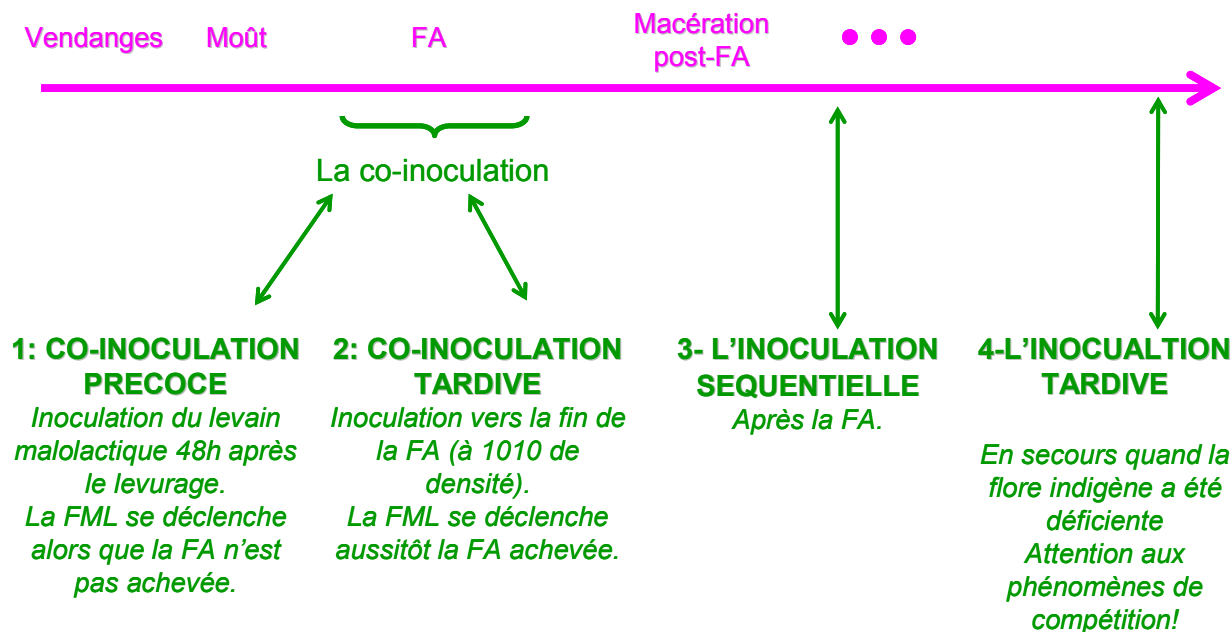


Figure 3 : Les différents stades d'utilisation des levains malolactiques.

L'action indirecte des levains malolactique sur le contrôle du risque *Brettanomyces*.

Lors des FML indigènes, après la FA, les levures *Saccharomyces* déclinent et libèrent l'écosystème. A ce moment les flores qui peuvent se développer sont celles qui ont résisté à l'épuisement des sucres du milieu et à la production d'éthanol. Les suivis des espèces de levures et de bactéries au cours de vinifications (Renouf et al. 2006, 2007b) ont démontré qu'il s'agissait de *Brettanomyces bruxellensis* (*B. bruxellensis*) chez les levures et d'*Oenococcus oeni* chez les bactéries. Toutes les deux tolèrent bien l'alcool et disposent d'autres substrats carbonés que les sucres : l'acide malique pour *O. oeni* et les acides phénoliques pour *Brettanomyces*. Après le déclin *Saccharomyces* les *Brettanomyces* et les *O. oeni* indigènes sont donc en compétition pour occuper l'écosystème.

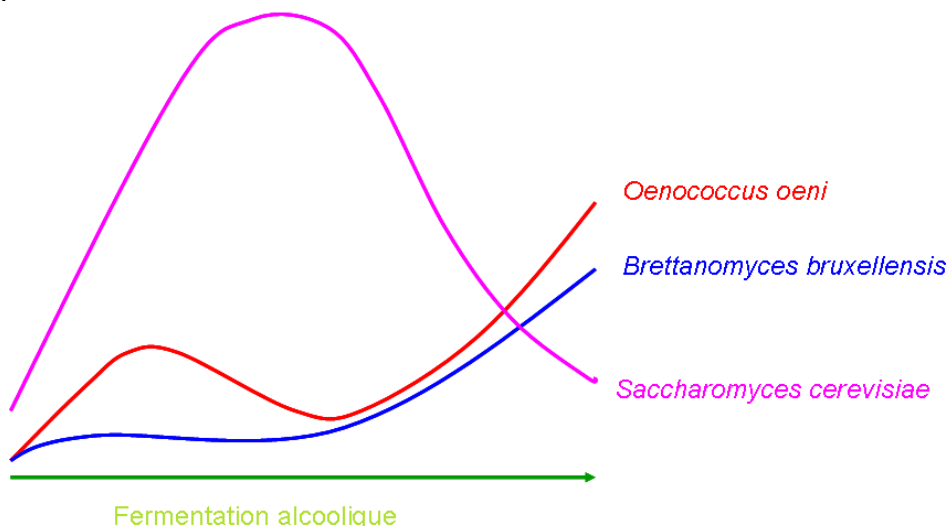


Figure 4 : le déclin des *Saccharomyces* de la FA libère l'écosystème que se disputent les *B. bruxellensis* et les *O. oeni* qui ont résisté à la FA.

Si les souches d'*O. oeni* indigènes sont déficientes et qu'elles peinent à se développer, les *Brettanomyces* prennent le dessus, elles dominent le milieu et altèrent les vins en produisant des

phénols volatils (Chatonnet et al. 1992) et d'autres molécules néfastes (Romano et al. 2008). Des relations entre le temps nécessaire au déclenchement de la FML et les populations de *Brettanomyces* ou les concentrations en phénols volatils ont pu être établies (Renouf et al. 2005b, Renouf et Murat 2008). Plus la FML est longue à se déclencher, plus le risque d'altération par les levures *Brettanomyces* est important. En utilisant un levain malolactique on impose une microflore active et contrôlée au milieu qui se retrouvent aussitôt monopolisés. Lorsque le levain malolactique succède aux levures *Saccharomyces* de la FA, l'écosystème n'est jamais libéré et *Brettanomyces* ne peut pas s'immiscer entre les deux fermentations. L'utilisation d'un levain malolactique est donc un outil de contrôle du risque *Brettanomyces* et de la production des phénols volatils, le profil aromatique du vin est alors plus net et les notes de fraîcheur et de fruitées sont préservées.

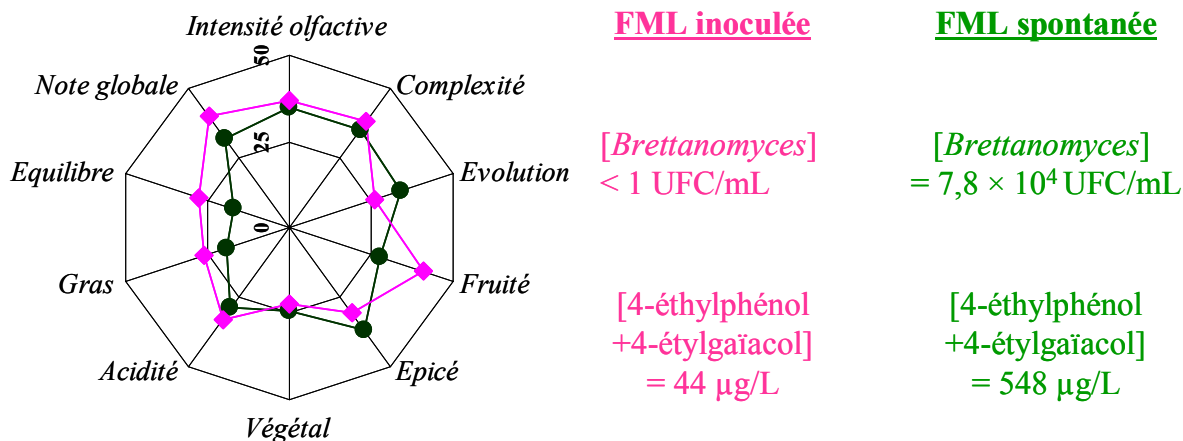


Figure 5 : Comparaison d'un vin de Cabernet-Sauvignon lors d'une FML inoculée (en rose) avec un levain malolactique (mise en œuvre en co-inoculation tardive) et d'une FML spontanée (en vert).

Conclusion.

A l'heure actuelle de nombreux travaux sont nécessaires pour caractériser de façon exhaustive l'implication directe des bactéries lactiques sur le profil aromatique des vins durant la FML. Néanmoins, il est important de bien considérer que la FML est une étape capitale dans l'obtention d'un vin de qualité. Tous les efforts réalisés en amont, au vignoble : pour produire les raisins les plus qualitatifs possibles, au chai : lors des opérations pre-fermentaires et de la FA, peuvent être annihilés si la FML n'est pas gérée de la façon optimale. Les bactéries lactiques indigènes peuvent être à l'origine de nombreuses altérations. Les métabolismes secondaires incriminés sont incontrôlables lors des FML indigènes. De plus, si elles ne font pas preuve de capacité à se développer rapidement, elles laissent la porte ouverte aux *Brettanomyces* qui en profitent pour s'adapter au vin nouveau et l'altérer. Aléatoires et subites, les FML indigènes peuvent donc altérer les qualités aromatiques du vin en cours d'élaboration. Pour résoudre ces problèmes, l'utilisation d'un levain malolactique est le meilleur outil possible.

Le maintien d'une microflore active et contrôlée : la levure sèche active (LSA) pour la FA, et le levain malolactique pour la FML assure une main mise continue et totale sur le consortium microbien durant les fermentations. En succédant aux levures de la FA, en terme d'activité fermentaire et de niveaux de populations majoritaire, le levain malolactique est préventif des risques de développement des *Brettanomyces* et de contrôle des teneurs en phénols volatils à la fin des vinifications. Bien évident cela n'évite pas les efforts de stabilisation et d'hygiène à respecter scrupuleusement durant l'élevage à venir mais cela contribue fortement à limiter les risques : les *Brettanomyces* qui se développent durant l'élevage sont celles qui ont pu s'adapter au milieu durant les vinifications (Renouf et al. 2007c). Donc, en contrôlant les étapes fermentaires ont réduit considérablement les risques de déviations futures.

Finalement, sans pouvoir à l'heure actuelle, caractériser de façon exhaustive la contribution des bactéries lactiques au profil aromatique des vins, il est évident que l'utilisation d'une souche sélectionnée d'*O. oeni* et de son utilisation raisonnée permet de prévenir les déviations organoleptiques et de préserver les qualités aromatiques du vin en cours d'élaboration.

Références bibliographiques

- Bartowsky, E.J., Henschke, P.A., 2004. The 'buttery' attribute of wine diacetyl desirability, spoilage and beyond. *Int. J. Food Microbiol.* 15, 235-52
- Bloem, A., de Revel, G., 2007. Fermentation malolactique en barriques : le rôle des bactéries lactiques dans la libération de l'arôme boisé. *Rev œnol.* 123, 1-3.
- Chatonnet, P., Dubourdiou, D., Boidron, J.N., 1992. La caractère phénolé des vins rouges : caractérisation, origine et moyens de lutte. *Rev. Fr. Œnol.* 138, 21-24.
- Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., 2001. Détection de bactéries lactiques produisant du 3-hydroxypropionaldéhyde à partir du glycérol par tests moléculaires. *Le Lait* 81,173-181.
- Lucas, P., Lonvaud-Funel, A., 2002. Purification and partial gene sequence of the tyrosine decarboxylase of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809. *FEMS Microbiol. Lett.* 211, 85-89.
- Renouf, V., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., 2005a. Numeration, identification and understanding of yeast and bacteria ecosystem on grape berry surface. *Aust. J. Grape Wine Res.* 11, 316-327.
- Renouf, V., Gindreau, E., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., 2005b. Microbial changes during malolactic fermentation in red wine. *J. Int. Sci. Vigne Vin* 39, 179-190.
- Renouf V., Perello M.C., Strehaiano P., Lonvaud-Funel A., 2006. Global survey of the microbial ecosystem during alcoholic fermentation. *J. Int Sc. Vigne Vin* 40, 101-116.
- Renouf, V., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., 2007a. Caractérisation physiologique et génétique de la diversité intraspécifique chez *Oenococcus oeni*. 7^{ème} symposium international d'œnologie. 28-30/06/07. Bordeaux. France.
- Renouf V., Claisse, O., Lonvaud-Funel A., 2007b. Inventory and monitoring of the wine microbial consortium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 75, 149-164.
- Renouf, V., Lonvaud-Funel, A., Coulon, J., 2007c. The origin of *Brettanomyces bruxellensis* in wines: a review. *J. Int. Sc. Vigne Vin*, 41, 161-173.
- Renouf, V., Murat, M.L., 2008. L'utilisation de levains malolactiques pour une meilleure maîtrise du risque *Brettanomyces*. *Rev. Œnol.* 126, 11-15.
- Renouf, V., Delaherche, A., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., 2008. Correlation between indigenous *Oenococcus oeni* strain resistance and the presence of genetic marker. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35, 27-33.
- Romano, A., Perello, M.C., de Revel, G., Lonvaud-Funel, A., 2008. Growth and volatile compound production by *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis*. *J. Appl. Microbiol.* Publié en ligne.
- Walling, E., Gindreau, E., Lonvaud-Funel, A., 2001. La biosynthèse d'exopolysaccharides par des souches de *Pediococcus damnosus* isolées du vin: mise au point d'outils moléculaires de détection. *Le Lait* 81, 289-300.