

## FML - UN OUTIL POUR RÉDUIRE L'ACIDITÉ ET AMÉLIORER L'ARÔME DANS DES CONDITIONS CLIMATIQUES FROIDES

Maret DU TOIT<sup>1\*</sup>, Lynn ENGELBRECHT<sup>1</sup>, Elda LERM<sup>2</sup>, Doris RAUHUT<sup>3</sup>, Caroline KNOLL<sup>3</sup> et Sibylle KRIEGER-WEBER<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Institute for Wine Biotechnology & Department of Viticulture and Oenology, Université de Stellenbosch, Private Bag X1, 7602 Matieland, Afrique du Sud ; <sup>2</sup>Anchor Wine Yeast, PO Box 14, 7475 Epping Industria, Afrique du Sud ; <sup>3</sup>Department of Microbiology and Biochemistry, Université de Geisenheim, Von-Lade-Str.1, 65366 Geisenheim, Allemagne ; <sup>4</sup>Lallemand, In den Seiten 53, 70825 Korntal-Münchingen, Allemagne

\*Adresse électronique de l'auteur principal : M. du Toit, téléphone : +27 21 808 3772, fax +27 21 808 3771, courriel : [mdt@sun.ac.za](mailto:mdt@sun.ac.za)

### Introduction

Les fermentations, aussi bien alcoolique que malolactique, doivent être gérées de manière différente en fonction des conditions climatiques chaudes ou froides. En effet, les facteurs les plus importants dominants dans les moûts et ayant un impact sur la fonctionnalité des levures et des bactéries varient considérablement selon ces mêmes conditions.

La fermentation malolactique (FML), qui joue un rôle important dans la fermentation des vins, est utilisée pour diverses raisons en fonction de la région climatique. Dans les régions froides, l'impact le plus important de la FML consiste en la réduction de l'acidité pour améliorer le palais du vin. L'acidité totale dans les régions froides peut atteindre les 12 g/l, avec des taux d'acide malique de 6 à 8 g/l, alors que la moyenne de celui-ci dans les régions chaudes est de 2-3 g/l. Cette acidité élevée se traduit en un pH bas -entre 2,9 et 3,3- qui aura une incidence sur le type de bactéries lactiques (LAB) qui vont survivre sous ces conditions (Lerm et al., 2010; Du Toit et al., 2011).

L'élimination de l'acide malique en tant que source préférée de carbone dans des conditions de vinification apporte de la stabilité microbienne au vin à partir du développement d'autres bactéries lactiques, ce qui est essentiel dans les climats chauds où le pH dépasse les 3,6. Cela facilite également le développement de *Lactobacillus* et de *Pediococcus*, des LAB de décomposition typiques dans le vin.

La troisième raison justifiant la réalisation de la FML est l'amélioration de l'arôme, de la saveur et de la sensation en bouche du vin (Lerm et al., 2010; Du Toit et al., 2011; Knoll et al., 2011, 2012). Les vins ayant passé par une FML sont perçus comme étant plus complexes, mieux structurés et amples en bouche. Généralement, les vins peuvent être soit plus fruités ou moins végétaux, soit plus crémeux/beurré. L'impact sur l'arôme dépendra du type de LAB utilisées en tant que culture starter ou du moment de l'inoculation pour la FML.

Les bactéries lactiques associées le plus souvent au processus de vinification appartiennent aux genres *Oenococcus*, *Lactobacillus* et *Pediococcus*. Les espèces appartenant à ces genres peuvent dégrader l'acide malique à travers différents mécanismes, mais les deux espèces employées commercialement pour provoquer la FML sont *Oenococcus oeni* et *Lactobacillus plantarum*. *Oenococcus oeni* reste aujourd'hui l'espèce la mieux étudiée et adaptée aux conditions du vin, sans oublier *L. plantarum* qui est de plus en plus populaire en tant que co-inoculant dans des conditions de pH plus élevé. Les souches d'*Oenococcus oeni* peuvent fonctionner sous la plupart des

paramètres associés au vin tel qu'un pH bas (2,9 - 4,0), tolérer des niveaux d'éthanol jusqu'à 16 % et un dioxyde de soufre total (SO<sub>2</sub>) de 50 mg/l, et survivre à des basses températures. Toutefois, *O. oeni* augmentera légèrement l'acidité volatile puisqu'elle est obligatoirement hétérogermentaire. À contrario, *L. plantarum* préfère des niveaux de pH supérieurs à 3,4 et, par conséquent, luttera dans les régions au climat chaud. Ses niveaux de tolérance à l'éthanol, au SO<sub>2</sub> et à la température sont plus faibles. L'avantage d'*O. oeni* est que dans des conditions de vin, elle ne produit pas d'acide acétique et n'a donc pas d'impact sur l'acidité volatile. Étant donné que les deux espèces ont des génomes différents qui se traduisent par différents profils enzymatiques, cela a un impact sur le profil aromatique du vin, ce qui produit différents styles (Lerm et al., 2010; Du Toit et al., 2011).

Le moment de l'inoculation peut être utilisé soit pour surmonter certaines conditions de FML difficiles dans le vin, soit pour altérer le style du vin obtenu. Actuellement, les deux pratiques les plus largement utilisées sont l'inoculation séquentielle et la co-inoculation (Azzolini et al., 2010; Lerm et al., 2010). L'avantage de l'inoculation séquentielle est que la FML peut être contrôlée par le producteur afin d'assurer que toutes les conditions soient aussi optimales que possibles pour la souche de culture starter de FML choisie. Les facteurs ayant le plus grand impact sur le succès de la FML séquentielle sont les niveaux élevés d'alcool et les niveaux d'appauvrissement en nutriments. La co-inoculation permet de contourner les risques associés à la FML séquentielle en raison de l'absence d'éthanol ou de la présence de faibles taux de celui-ci et de la présence de quantités suffisantes de nutriments dans le moût pour les levures et les bactéries. Un autre avantage de la co-inoculation est que le vin peut être stabilisé plus tôt à travers l'ajout de SO<sub>2</sub>, puisque les deux fermentations s'achèvent normalement plus rapidement. Le risque associé à la co-inoculation se présente si la fermentation alcoolique n'est pas gérée correctement et s'arrête. C'est alors que la culture starter de la FML, particulièrement *O. oeni*, métabolisera le sucre, dans des conditions de pH élevé, et produira des niveaux élevés d'acide acétique qui empêchera la levure de fermenter.

### **Facteurs influençant la fermentation malolactique**

Les facteurs qui vont avoir un impact sur le développement des LAB et/ou le processus de FML sont le pH, le SO<sub>2</sub>, l'éthanol, la température, la concentration en acide malique, la souche de *Saccharomyces cerevisiae* utilisée pour la fermentation alcoolique, la teneur en nutriments de la matrice, les dépôts de fongicides, les propriétés du cultivar liées aux acides phénoliques et l'utilisation du lysozyme (Lerm et al., 2010; Du Toit et al., 2011). Les facteurs les plus importants pour les climats froids qui seront étudiés sont le pH, l'éthanol, le choix de la souche de levure du vin et la concentration en acide malique.

#### *Le pH et l'éthanol*

En tant que facteur, le pH est essentiel pour déterminer le développement de la FML dans le vin et sa cinétique. Un pH à 3,5 est un facteur déterminant pour le type de LAB qui seront présentes et la propriété de la FML. Un pH inférieur à 3,5 favorisera la survie d'*O. oeni* puisqu'elle est mieux adaptée à fonctionner dans des conditions de pH bas. La domination de cette espèce assurera une FML propre et augmentera les chances de réussite à cause de l'élimination de la concurrence d'autres LAB. D'autre part, un pH supérieur à 3,5 est favorable pour le reste des LAB associées à la vinification puisque le nombre de cellules de flore naturelle est plus important, ce qui peut provoquer une concurrence naturelle. Comme mentionné précédemment, en règle générale *L. plantarum* n'est

recommandée en tant que culture starter qu'en cas de pH supérieur à 3,4 puisque le nombre de leurs cellules diminue rapidement lorsqu'elles sont inoculées avec un pH inférieur à 3,4, ce qui provoque l'arrêt de la FML ou une FML incomplète. Le pH bas est une réalité qui exige une gestion prudente lorsque l'on travaille avec du raisin issu de régions froides, et qui justifie également la sélection de souches capables de supporter les conditions sévères. De plus, un pH bas intensifie l'impact du SO<sub>2</sub> et celui de l'éthanol, tel qu'expliqué ci-dessous

Il a été démontré, dans des travaux précédents, que l'éthanol et le pH agissent en synergie et que des niveaux faibles de pH et élevés d'éthanol sont inhibiteurs pour la FML. L'étude de Knoll et al. (2011) a montré qu'un pH de 3,2 et un éthanol à 15 % représentent des conditions difficiles et ne permettent qu'une FML partielle. Cela est directement lié à une baisse du nombre de cellules par rapport aux 10<sup>6</sup> cellules/ml inoculées. Un pH à 3,6 avec des taux élevés d'éthanol a encore eu des effets sur la réussite de la FML, mais un pH à 3,8 fait qu'un éthanol à 15 % ne soit pas un problème. À l'inverse, avec un éthanol à 12,5 %, typique des régions froides, le pH n'a pas d'importance dans la réussite de la FML (fig. 1). Par conséquent, dans les régions froides, la gestion de la maturité au moment de la vendange est essentielle pour garantir que le pH bas et les niveaux d'éthanol soient alignés afin d'assurer la meilleure réussite possible à la FML.

Les résultats obtenus dans l'étude de Knoll et al. (2011) ont montré que ces facteurs ont également eu un impact sur le profil aromatique du vin. Les conditions de pH bas ont été dominées par les esters éthyliques et celles de pH élevé par les esters d'acétate. Par conséquent, la gestion de ces facteurs et la sélection des souches peuvent être utilisées par le producteur pour stimuler un arôme et un style spécifiques du vin.

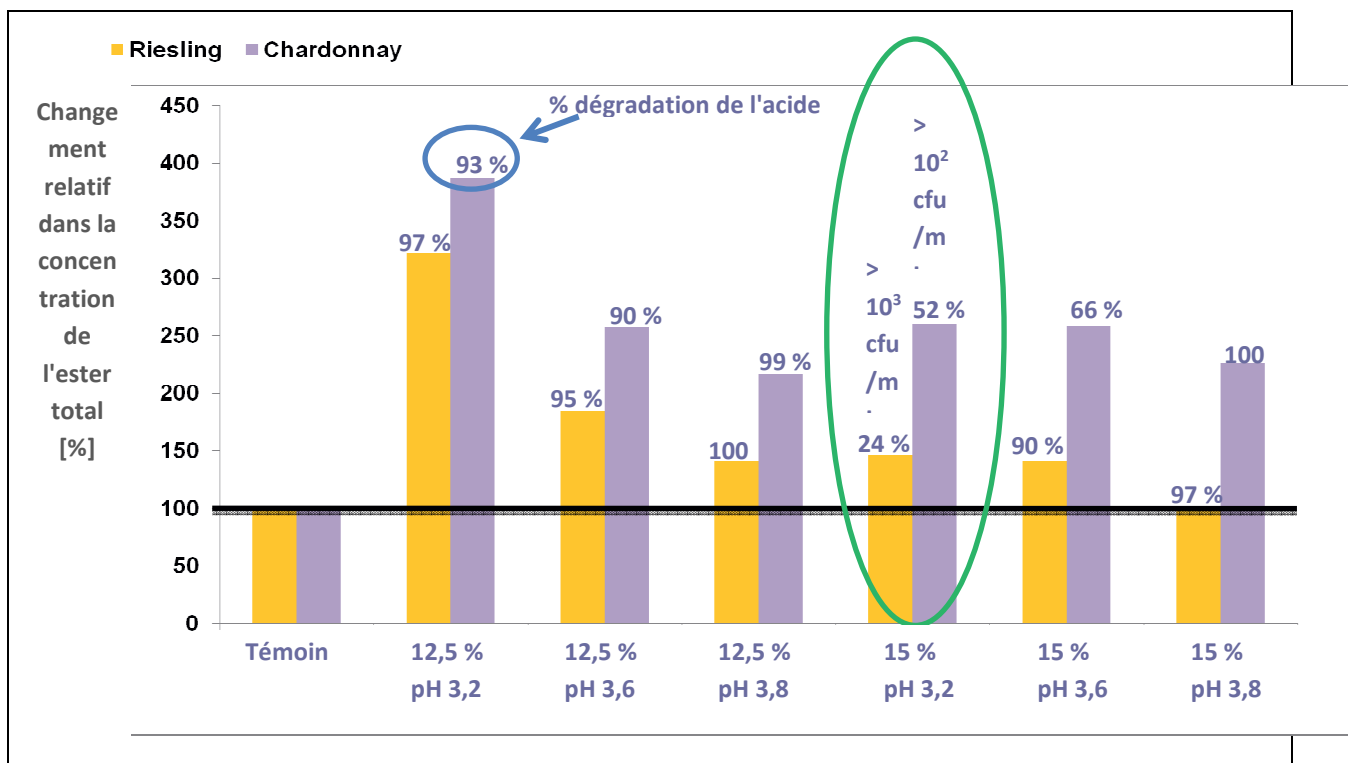


Figure 1 : Impact synergique du pH et de l'éthanol sur la fermentation malolactique séquentielle dans des vins Riesling et Chardonnay inoculés avec la souche R1105 d'O. oeni (Knoll et al., 2011)

### Concentration en acide malique

Les niveaux d'acide malique sont l'un des facteurs les moins pris en compte lors de la prise de décision concernant la FML, et dans de nombreux cas non mesuré en tant que paramètre standard. Le niveau d'acide malique est essentiel pour la régulation du gène malolactique. De plus, la quantité d'acide lactique produit devient toxique pour la cellule au-dessus de certains niveaux et, par conséquent, le nombre de cellules baissera jusqu'à des niveaux ne permettant pas assez d'enzymes pour convertir l'acide malique. Ces aspects dépendent de la souche. Ainsi, la sélection de la bonne souche pour la concentration d'acide malique existante est importante pour garantir la réussite de la FML. Cela est important dans les régions froides où les niveaux d'acide malique sont plus élevés et la FML a besoin d'être gérée avec prudence pour ce qui est de tous les autres facteurs tels que le pH, l'éthanol, le SO<sub>2</sub> et les nutriments afin d'en assurer la réussite. Les niveaux plus élevés d'acide malique prolongeront le temps nécessaire pour compléter la FML de trois à quatre fois dans la plupart des cas. Le tableau 1 montre les niveaux d'acide malique et l'impact qu'il peut avoir sur la réussite de la FML.

Tableau 1. L'impact des niveaux d'acide malique sur la FML

	Easy	Moderate	Difficult	Extreme
Initial level of malic acid (g/L)	2 - 4	4 - 5 or 1 - 2	5 - 7 or 0.5 - 1	>7 or <0.5

Une concentration d'acide lactique de 1,5 g/l est tolérée par la plupart des souches commerciales de FML, sauf si d'autres souches sont déjà affectées. La plupart des souches subissent des répercussions négatives à des niveaux de 3 g/l. La possibilité de que cela fonctionne et dégrade partiellement les niveaux d'acide malique est exceptionnel. Lallemand et IFV ont montré (fig. 2) que l'impact est directement lié à la baisse du nombre de cellules. La figure montre le comportement d'une souche sensible à 1,5 g/l et l'on peut observer qu'il y a d'abord une réduction de la viabilité des cellules et par la suite une récupération de la population, ce qui fait que la FML ne s'arrête pas complètement. Toutefois, à 3 g/l, la population baisse de façon régulière et ne se récupère jamais, ce qui provoque l'arrêt de la FML. Par conséquent, si l'on opère dans une plage de concentrations d'acide malique difficile, il faut choisir une souche plus résistante à la quantité potentielle d'acide lactique prévue.

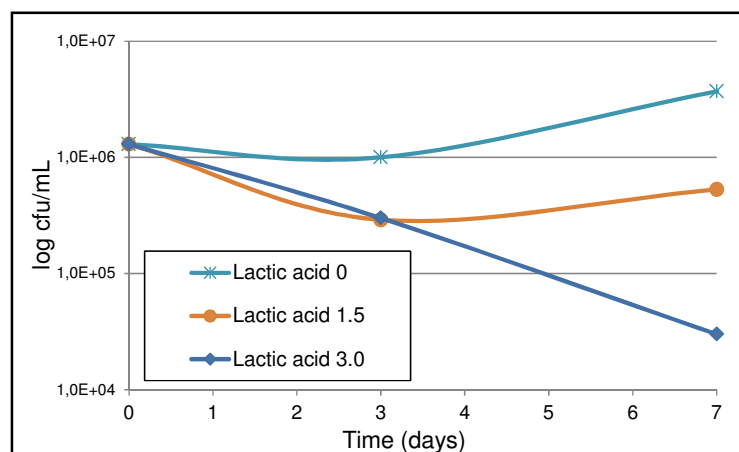


Figure 2 : L'impact de l'acide lactique sur la viabilité d'une souche commerciale de FML (Vincent Gerbaux International ML School Lallemand 2015).

### Impact de la souche de levure du vin

La souche de *S. cerevisiae* choisie pour la fermentation alcoolique peut avoir un impact majeur sur la réussite de la FML et devrait donc être choisie soigneusement, d'autant plus dans des conditions de climat froid où la FML est, dans la plupart des cas, un scénario difficile, voire extrême. Les souches de vin sont classées en trois catégories : stimulatrices, neutres et inhibitrices. La souche est capable d'être inhibitrice par rapport aux LAB en produisant des composés tels que l'éthanol, le SO<sub>2</sub>, les acides gras à chaîne moyenne et les protéines antibactériennes, ou en épuisant les nutriments nécessaires pour les LAB (Alexandre et al., 2004). Certaines souches de levures de vin peuvent également jouer un rôle positif pour stimuler la FML en détoxifiant le milieu de fermentation ou à travers la libération de nutriments pendant l'autolyse de la levure. Par conséquent, associer la meilleure levure de vin et la souche de FML est essentiel pour la réussite de celle-ci. Pour l'illustrer, un vin Chardonnay avec des niveaux d'acide malique de 4 g/l a montré que seule une paire sur quatre réussissait à permettre la FML (fig. 3).

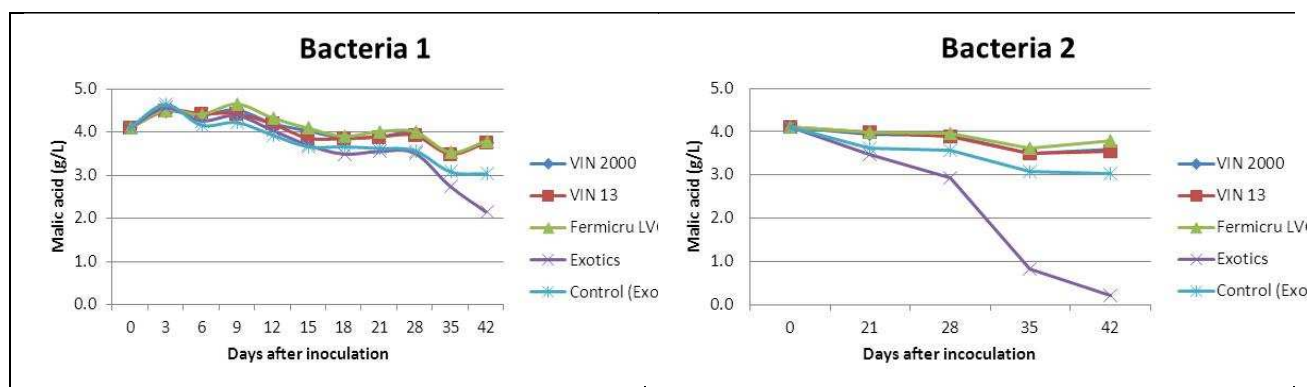


Figure 3 : Deux bactéries combinées à quatre levures différentes dans une co-inoculation de Chardonnay avec un pH de 3,3 et des AT de 9,3 g/l (Scholtz, 2013).

### Moments d'inoculation de la FML

Aujourd'hui, trois scénarios peuvent être utilisés pour induire la FML :

- co-inoculation lorsque la levure et les bactéries sont ajoutées ensemble au cours des premières 48 h de la fermentation ;
- durant la fermentation alcoolique, normalement au cours des derniers 50 g/l de sucre
- inoculation séquentielle après que la fermentation alcoolique soit complète

Tous ces scénarios ont leurs avantages et risques potentiels. En fonction donc des conditions du vin, la souche de levure utilisée entraînera le choix du moment de l'inoculation. La co-inoculation est entrée en jeu durant la dernière décennie en prouvant qu'elle peut être une solution pour rendre difficile la FML séquentielle, puisqu'un grand nombre des composés de levure rendant la matrice compliquée pour la FML est produit durant la dernière partie de la fermentation alcoolique. La co-inoculation donne également lieu à différents styles de vin puisque les activités des précurseurs et des enzymes ne sont pas les mêmes dans le moût que dans un vin fini. La co-inoculation permet aussi aux vins d'être stabilisés plus rapidement et, par conséquent, réduit le risque de détérioration microbienne. Knoll et al. (2012) ont montré que la co-inoculation est plus rapide en comparaison

avec l'inoculation séquentielle, ce qui a démontré que la bonne paire levure-bactérie dans la co-inoculation peut être obtenue dans les vins de climat froid avec un pH bas. Aucun impact n'a été enregistré sur la fermentation alcoolique en cas de gestion et de contrôle optimaux. Par ailleurs, aucune différence n'a été enregistrée dans les niveaux d'acide acétique en comparaison avec le témoin avec l'utilisation d'*O. oeni*. Par conséquent, la co-inoculation n'a pas à être redoutée. La co-inoculation a eu un impact différent sur les composés aromatiques volatils par rapport à l'inoculation séquentielle, avec des niveaux plus élevés d'éthyle et d'esters d'acétate. L'autre découverte importante est que les différences de souches ont été beaucoup plus importantes dans la co-inoculation en raison de la disponibilité de substrats et de précurseurs, en comparaison avec l'inoculation séquentielle où le profil aromatique des souches a été beaucoup plus proche (fig. 4).

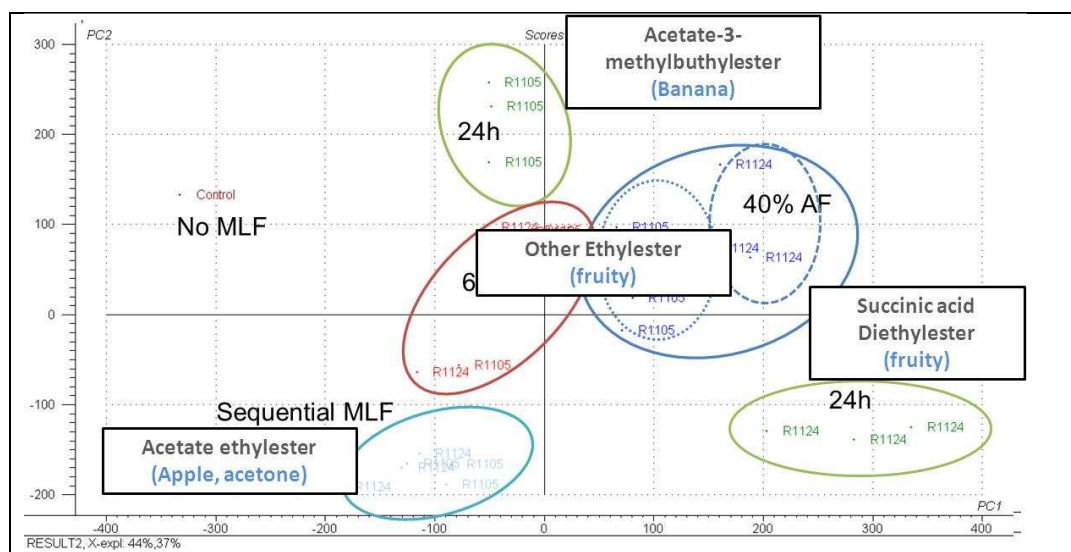


Figure 4 : Résultats de l'ACP des composés aromatiques en utilisant différents scénarios d'inoculation et deux différentes souches dans des vins Riesling au pH bas (Knoll et al., 2012).

## Conclusions

En conclusion, la réussite de la FML dans des climats froids dépend de quelques facteurs essentiels qui doivent être pris en considération lors de la sélection de la souche pour l'inoculation de la FML. Les deux facteurs ayant l'impact le plus important sur la croissance de la souche sélectionnée dans les climats froids sont un pH bas et des niveaux d'éthanol élevés. Par conséquent, il faut s'assurer de choisir la souche convenable qui survivra le mieux dans ces conditions. Plusieurs études ont montré que la combinaison levure-bactérie aide le processus de la FML dans les climats froids durs. Dès lors, la sélection de la levure doit être réalisée plus sérieusement pour assurer la meilleure compatibilité. Le moment de l'inoculation de la FML peut également aider tout au long de la FML. En effet, dans beaucoup de cas avec un faible pH, des températures basses et des niveaux d'alcool élevés, la fermentation tarderait des mois à se compléter si elle était réalisée de manière séquentielle, alors que la co-inoculation peut réduire de temps de moitié, ce qui réduit la possibilité de détérioration. Pour diversifier le style de vin et le profil aromatique, les producteurs peuvent utiliser le moment de l'inoculation ainsi que différentes souches ou même différentes espèces : *O. oeni* ou *L. plantarum* ou un mélange des deux.

## Références

- Alexandre H., Costello P.J., Remize F., Guzzo J., Guilloux-Benatier M. (2004). *Saccharomyces cerevisiae-Oenococcus oeni* interactions in wine: current knowledge and perspectives. *International Journal of Food Microbiology* 93, 141-154.
- Azzolini, M., Tosi E., Vagnoli P., Krieger S., Zapparoli G. (2010). Evaluation of technological effects of yeast-bacterial co-inoculation in red table wine production. *Italian Journal of Food Science* 3, 257-263.
- Du Toit M., Engelbrecht L., Lerm E., Krieger-Weber S. (2011). *Lactobacillus*: The Next Generation of Malolactic Fermentation Starter Cultures – An Overview. *Food Bioprocess Technology* 4, 876-906.
- Knoll C., Fritsch S., Schnell S., Grossmann M., Rauhut D., du Toit M. (2011). Influence of simulated stress on malolactic fermentation and volatile aroma compound composition in white wines. *LWT-Food Science and Technology* 44, 2077-2086.
- Knoll C., Fritsch S., Schnell S., Grossmann M., Krieger-Weber S., du Toit M., Rauhut D. (2012). Impact of different malolactic fermentation inoculation scenarios on Riesling wine aroma. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28, 1143-1153.
- Lerm E., Engelbrecht L., du Toit M. (2010). Malolactic fermentation: The ABC's of MLF. *South African Journal of Enology and Viticulture* 31, 186-212.
- Scholtz, M. (2013). Assessing the compatibility of mixed MLF starter cultures with different wine yeasts. Master thesis, Stellenbosch University.

## RÉSUMÉ

*La fermentation malolactique (FML) est souvent difficile à réaliser dans les vins à l'acidité élevée. C'est pourquoi il est important de développer des stratégies visant à favoriser la désacidification biologique et l'amélioration des arômes des vins au pH bas. Notre criblage de souches pouvant fonctionner dans des conditions de pH bas a clairement montré que cela était très spécifique à la souche et qu'il est directement lié au nombre de cellules. Les résultats des tests utilisant un Chardonnay avec un pH de 3,2 et un niveau d'acide malique de 4,3 ont montré que la combinaison de la levure et de souches bactériennes, pour les conditions de pH bas et d'acide malique élevé, était essentielle pour assurer d'abord la réussite de la FML, puis qu'elle a également une influence sur le potentiel aromatique des souches de FML, particulièrement les esters même si la FML a été partielle. Les résultats obtenus ont montré qu'*Oenococcus oeni* a fonctionné mieux que *Lactobacillus plantarum* puisqu'elle a atteint un nombre de cellules supérieur durant la fermentation. L'impact de différentes stratégies d'inoculation de la FML avec deux différentes souches d'*O. oeni* dans des vins Riesling de climats froids (pH 2,9-3,1) et l'arôme volatil du vin ont été analysés. Les traitements de co-inoculation ont eu un temps de fermentation total réduit par rapport aux inoculations séquentielles. Les résultats ont montré que les vins ayant subi une co-inoculation avaient tendance à avoir des concentrations plus élevées d'éthyle et d'esters d'acétate, notamment l'acide acétique ester phényle éthyle, l'acide acétique 3-méthylbutylester, l'acide butyrique éthylester, l'acide lactique éthylester et l'acide succinique diéthylester. Une autre étude utilisant des vins Riesling et Chardonnay et simulant les conditions de climat chaud et froid a montré que les conditions de pH bas (3,2) et d'alcool élevé (15 % v/v) représentaient le scénario de FML le plus difficile, mais que même la FML partielle sous ces conditions a eu un impact sur le profil aromatique du vin final, en particulier les esters. Les résultats ont également souligné que certains terpènes étaient produits à des niveaux plus élevés à un pH de 3,2 qu'à un pH de 3,8.*

**Mots clés :** Fermentation malolactique, climat froid, arôme du vin