

## INCIDENCES DES TENEURS EN ACIDE MALIQUE, EN ACIDE LACTIQUE, EN OXYGÈNE ET EN GAZ CARBONIQUE SUR LA RÉALISATION DE LA FERMENTATION MALOLACTIQUE D'UN VIN

PAR VINCENT GERBAUX ET CAROLE BRIFFOX  
IFV Unité de Beaune

**RÉSUMÉ :** Les conditions de la fermentation malolactique (FML) peuvent varier fortement avec des effets sur les bactéries lactiques. Pour un même pH (3,25), l'activité bactérienne est stimulée par la concentration en acide malique. Concernant le chardonnay et le pinot noir, la vitesse moyenne de dégradation de l'acide malique, à une température de 16° C, est de l'ordre de 250 mg/jour pour les concentrations les plus élevées. La dégradation de l'acide malique reste effective pour les concentrations basses (< 1 g/l). La présence initiale d'acide lactique inhibe la réalisation de la FML aussi bien pour le chardonnay que pour le pinot noir. Avec une teneur de 1,5 g/l, la population bactérienne inoculée ne se développe pas et la réalisation de la FML est languissante. Avec une teneur de 3 g/l, la population bactérienne régresse et la FML est bloquée. Les gaz dissous (oxygène et gaz carbonique) ont une incidence limitée sur la réalisation de la FML, notamment pour le vin rouge et n'engendrent pas de blocage, dans les conditions expérimentales. Parallèlement aux effets des acides organiques ou des gaz dissous, il est constaté un important effet de la souche de bactérie lactique considérée.

**MOTS CLÉS :** fermentation malolactique, bactéries lactiques, acide malique, acide lactique, gaz carbonique, oxygène

**ABSTRACT:** The conditions of the malolactic fermentation (MLF) can strongly vary, with effects on lactic acid bacteria. For a same pH (3.25), the bacterial activity is stimulated by the concentration in malic acid. Concerning the chardonnay and the pinot noir, the average speed of the malic acid degradation, at a temperature of 16° C, is about 250 mg/day for the highest concentrations. The malic acid degradation remains effective for a low concentration (< 1 g/l). The initial presence of lactic acid inhibits the realization of the FML as well for the chardonnay as for the pinot noir. With a content of 1.5 g/l, the inoculated bacterial population doesn't grow and the realization of the FML is sluggish. With a content of 3 g/l, the bacterial population decreases and the FML is stuck. The dissolved gases (oxygen and carbon dioxide) have a limited incidence on the realization of the FML, in particular for the red wine and don't lead to blockage, in the experimental conditions. At the same time as the effects of organic acids or dissolved gases, it is noticed an important effect of the strain of lactic acid bacteria.

**KEYWORDS:** malolactic fermentation, lactic acid bacteria, malic acid, lactic acid, carbon dioxide, oxygen

### INTRODUCTION

La réalisation de la fermentation malolactique (FML) dans un vin dépend de nombreux paramètres. Les effets du pH et du SO<sub>2</sub> sont bien connus. D'autres paramètres sont moins renseignés comme la présence d'acide lactique (associée à une FML bloquée ou à un ajout dans un cadre réglementaire) ou la quantité d'acide malique à dégrader. Parallèlement, les bactéries lactiques du vin, notamment *Enococcus oeni*, sont des germes anaérobies non-strictes, qualifiés

de micro-aérophiles. En fonction des opérations liées à la vinification et au délai de déclenchement de la FML, les teneurs en oxygène (O<sub>2</sub>) ou en gaz carbonique (CO<sub>2</sub>) dissous peuvent largement fluctuer avec un effet à préciser sur la réalisation de la FML.

### 1. MATÉRIELS ET MÉTHODES

Les travaux ont été réalisés en laboratoire avec des vins de chardonnay et de pinot noir conservés à 4°C depuis la fin de la fermentation alcoolique :

> Deux vins de chardonnay (dont un désacidifié par la technique du sel double afin de réduire sa teneur en acide malique à 0,75 g/l), ajustés à différentes concentrations en acide malique, en acide lactique, en O<sub>2</sub> ou en CO<sub>2</sub>.

> Deux vins de pinot noir ajustés à différentes concentrations en acide malique, en acide lactique, en O<sub>2</sub> ou en CO<sub>2</sub>.

L'acide malique utilisé est une référence pour usages microbiologiques de forme lévogyre (L) sauf pour un lot de pinot noir où le racémique DL a été ajouté afin d'observer un possible effet de la forme dextrogyre (D). L'acide lactique utilisé provient de différentes origines selon les expérimentations. Un produit pour usages biochimiques et trois préparations commercialisées pour l'œnologie ont été pris en compte.

Les paramètres constants pour toutes les modalités expérimentales sont les suivants :

> Degré alcoolique : 12,5 %v/v

> pH : 3,25 (ajustement après addition des acides organiques)

> Ac tartrique : 2 g/l

> Ac citrique : 0,5 g/l

> Température d'incubation : 16° C.

Tous les lots expérimentaux sont conditionnés en volumes de 750 ml. Les populations bactériennes sont déterminées en boîtes de Pétri avec un milieu gélosé spécifique. La dégradation de l'acide malique est suivie par le dosage enzymatique de l'acide L malique. La FML est initiée par un ensemencement en bactéries lactiques (To). Différentes préparations de bactéries lactiques commercialisées pour l'œnologie et adaptées au contexte expérimental ont été considérées.

### 2. RÉSULTATS

**INCIDENCE DE LA TENEUR INITIALE EN ACIDE MALIQUE SUR LA RÉALISATION DE LA FML.** Deux expérimentations ont été réalisées, une sur chardonnay et une sur pinot noir, avec pour chacune une gamme de concentration en acide malique (pH ajusté à 3,25). Pour chaque niveau, différentes biomasses bactériennes, six pour le chardonnay et cinq pour le pinot noir, sont inoculées pour déclencher la FML. Les résultats présentés considèrent les moyennes et écart-types pour les différentes biomasses (*Figures 1a et 1b*). La durée de la FML augmente logiquement avec l'élévation de la teneur initiale en acide malique. Cette augmentation n'est cependant pas linéaire. Le temps de latence avant l'enclenchement de la FML est sensiblement le même pour tous les lots. Pendant le déroulement de la FML, la vitesse de dégradation de l'acide malique augmente avec la teneur initiale, avec un effet important de la biomasse bactérienne considérée (*Tableau 1*). Dans les conditions expérimentales (pH3,25, 12,5 %v/v, 16° C), la vitesse maximale

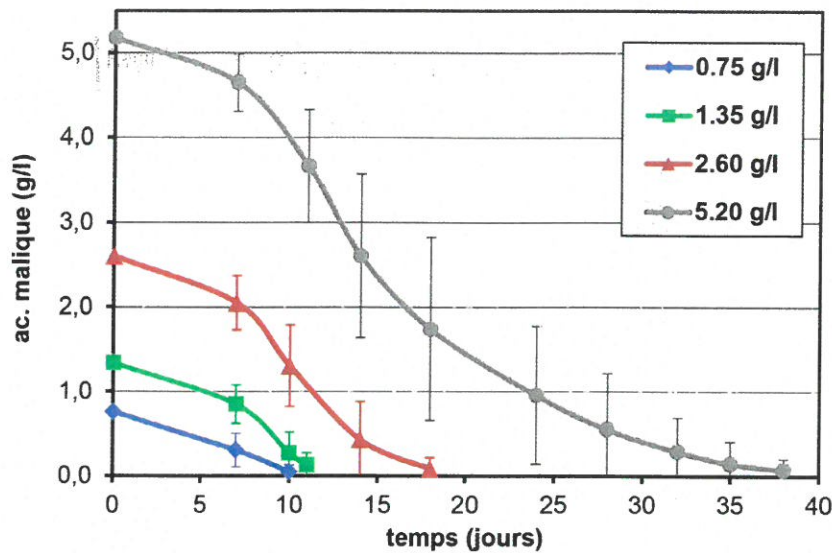


Figure 1a : Chardonnay ajusté à pH<sub>3,25</sub> - Incidence de la teneur en acide malique sur la réalisation de la FML (valeurs moyennes pour six biomasses bactériennes)

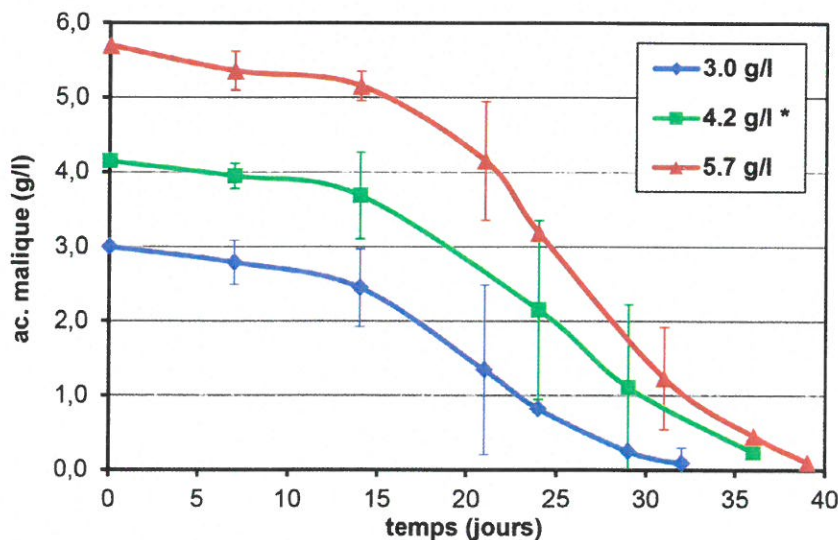


Figure 1b : Pinot noir ajusté à pH<sub>3,25</sub> - Incidence de la teneur en acide malique sur la réalisation de la FML (valeurs moyennes pour cinq biomasses bactériennes) (\*) Lot contenant également 1,8 g/l ac D malique

de dégradation de l'acide malique est, en moyenne, de l'ordre de 250 mg/jour. Pour les plus faibles teneurs en acide malique, la vitesse moyenne de dégradation est en dessous de 100 mg/jour, sans constater de blocage de la FML. Concernant l'expérimentation sur pinot noir, le lot médian (4,2 g/l d'acide L malique) contient aussi de l'acide D malique ajouté (1,8 g/l). Cette présence d'acide D malique uniquement pour ce lot, n'a pas d'effet notable sur la réalisation de la FML.

Acide L malique initial (g/l)	Chardonnay désacidifié / ajusté	Pinot noir ajusté
0.75	83 +/- 11*	
1.35	129 +/- 8*	
2.6	216 +/- 57*	
3.0		187 +/- 67*
4.2		226 +/- 52*
5.2	230 +/- 82*	
5.7		240 +/- 48*

(\*) écart-type pour les biomasses bactériennes considérées.

Tableau 1 : Vitesse moyenne de dégradation de l'acide malique entre 10 et 90 % de FML (en mg/jour)

**INCIDENCE DE LA TENUEUR INITIALE EN ACIDE LACTIQUE SUR LA RÉALISATION DE LA FML.** Deux expérimentations ont été réalisées avec une gamme de concentration en acide lactique : 0 (témoin), 1,5 et 3 g/l. L'ajout est réalisé avant l'enclenchement de la FML et avant l'ajustement du pH à 3,25. La première expérimentation, réalisée sur chardonnay, considère six biomasses bactériennes. La seconde, réalisée sur pinot noir, considère deux biomasses bactériennes et trois préparations d'acide lactique à usage œnologique. Les résultats montrent clairement que la présence initiale d'acide lactique inhibe le déroulement de la FML (Figures 2a et 2b, page suivante). Avec une teneur initiale en acide lactique de 1,5 g/l, la FML est fortement ralentie. Avec une teneur de 3,0 g/l, la FML est plus ou moins bloquée. La présence d'acide lactique inhibe le développement des bactéries lactiques (Figure 3a et 3b, page suivante). Dans les conditions expérimentales et en l'absence d'acide lactique initial, la population bactérienne croît après une phase de latence de quelques jours. Avec 1,5 g/l d'acide lactique, la population se stabilise à un niveau comparable à celui de l'ensemencement, de l'ordre de 1 million de cellules/ml, induisant une réalisation languissante de la FML. Avec 3 g/l d'acide lactique, la population régresse au cours du temps, expliquant alors le blocage de la FML. L'effet biomasse bactérienne doit également être considéré dans ces résultats. Les barres d'erreurs des Figures 2a et 3a,

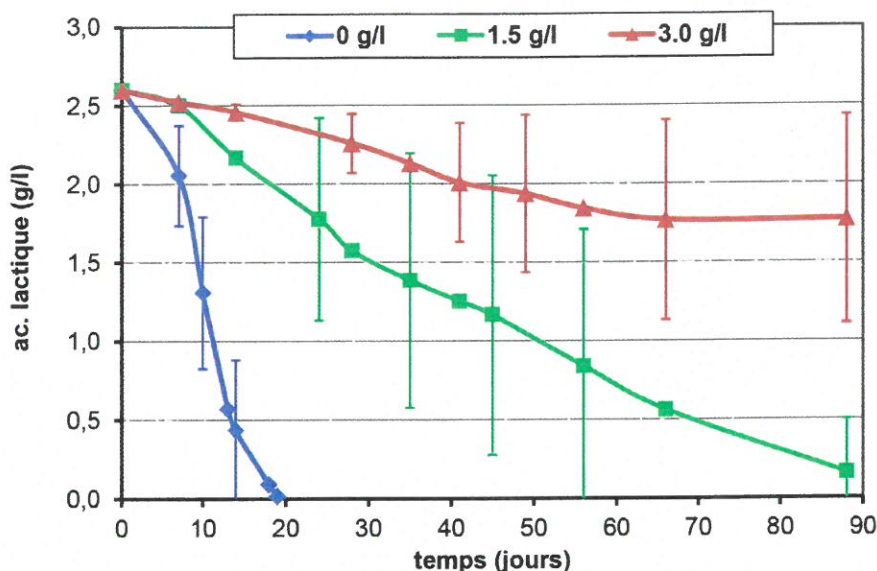


Figure 2a : Chardonnay ajusté à pH<sub>3,25</sub> - Incidence de la teneur initiale en acide lactique sur la réalisation de la FML. (valeurs moyennes pour six biomasses bactériennes)

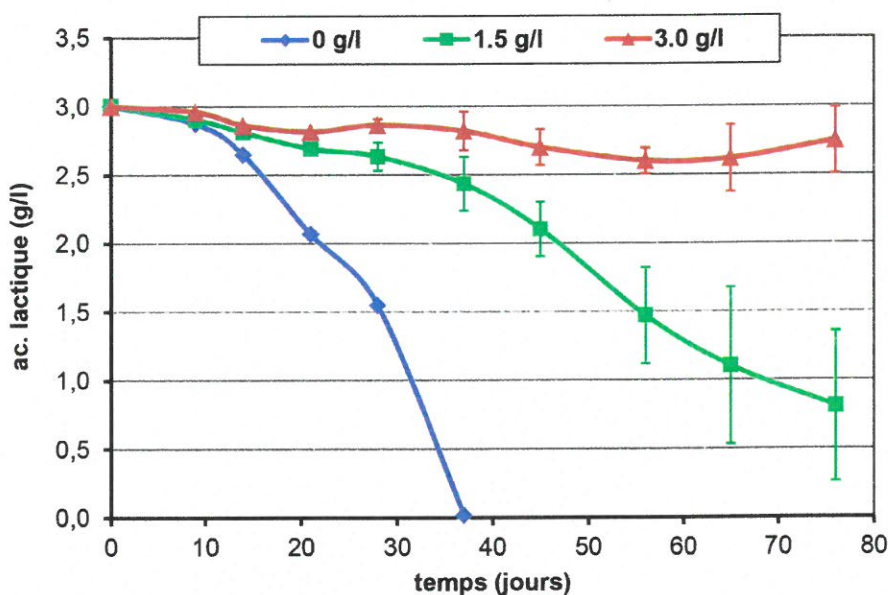


Figure 2b : Pinot noir ajusté à pH<sub>3,25</sub> - Incidence de la teneur initiale en acide lactique sur la réalisation de la FML. (valeurs moyennes pour deux biomasses bactériennes et trois préparations d'acide lactique pour l'aérogénologie)

représentant l'écart-type pour six biomasses, montrent que la sensibilité vis-à-vis de l'acide lactique est plus ou moins importante en fonction de la souche de bactérie lactique considérée.

**INCIDENCE DES TENEURS INITIALES EN OXYGÈNE ET EN GAZ CARBONIQUE DISSOUS SUR LA RÉALISATION DE LA FML.** Les lots expérimentaux sont ajustés, soit à moins de 1 mg/l d'O<sub>2</sub> dissous, soit à plus de 5 mg/l d'O<sub>2</sub> dissous, avant de procéder à l'ensemencement en bactéries lactiques sélectionnées (trois préparations différentes). L'évolution de l'O<sub>2</sub> dans les vins est suivie par le système de pastilles NomaSense (Sté Nomacorc). Pour les lots de pinot noir, l'O<sub>2</sub> décroît rapidement pour passer en dessous de 1 mg/l en une semaine (Figure 4). Pour les lots de chardonnay, l'O<sub>2</sub> décroît plus lentement pour passer en dessous de 1 mg/l en quatre semaines. Parallèlement, un ajustement initial des lots en CO<sub>2</sub> a été réalisé à 400, 800 et 1200 mg/l. Suite à l'ensemencement bactérien et parallèlement à la réalisation de la FML, la teneur en CO<sub>2</sub> augmente d'au moins 1000 mg/l.

Les teneurs en O<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub> dissous n'ont pratiquement pas d'impact sur la population bactérienne des lots de pinot noir (Figure 5a). Pour les lots de chardonnay, le niveau de population bactérienne est plus élevé pour les lots contenant peu d'O<sub>2</sub> (< 1 mg/l). Une teneur élevée en CO<sub>2</sub>, 1200 mg/l, tend également à favoriser la population bactérienne. L'effet souche de bactérie lactique doit aussi être pris en compte. Des pertes importantes de population bactérienne ont été constatées pour une des trois biomasses inoculées dans les lots de chardonnay avec des teneurs en O<sub>2</sub> élevées. Il apparaît que la présence d'O<sub>2</sub> tend à activer la réalisation de la FML (Figure 5b). Pour les lots de pinot noir, le gain de temps est faible, de l'ordre de 10 %. Les résultats sont plus contrastés pour les lots de chardonnay. La présence d'O<sub>2</sub> active la réalisation de la FML d'autant plus nettement que la présence de CO<sub>2</sub> est importante. Inversement, en l'absence d'O<sub>2</sub>, une forte présence de CO<sub>2</sub> tend à ralentir le déroulement de la FML. Les résultats concernant le niveau de population bactérienne suite à l'ensemencement et ceux

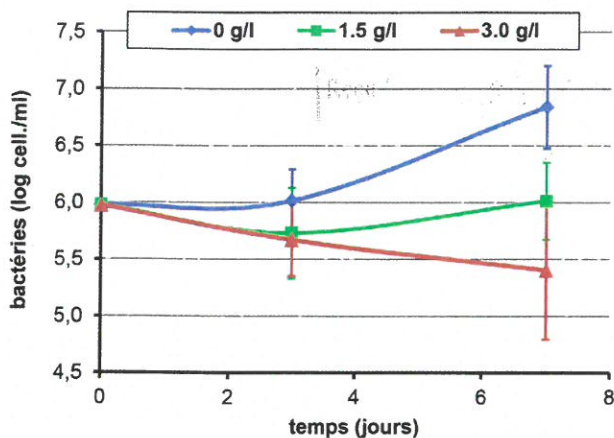


Figure 3a : Chardonnay ajusté à pH<sub>3.25</sub> - Incidence de la teneur initiale en acide lactique sur la population bactérienne. (valeurs moyennes pour six biomasses bactériennes)

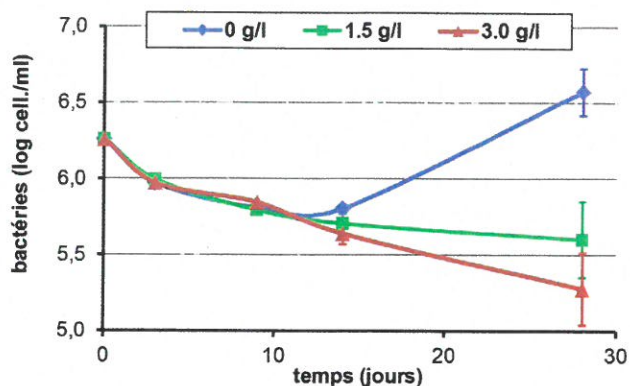


Figure 3b : Pinot noir ajusté à pH<sub>3.25</sub> - Incidence de la teneur initiale en acide lactique sur la population bactérienne. (Valeurs moyennes pour deux biomasses bactériennes et trois préparations d'ac. lactique pour l'aérogène)

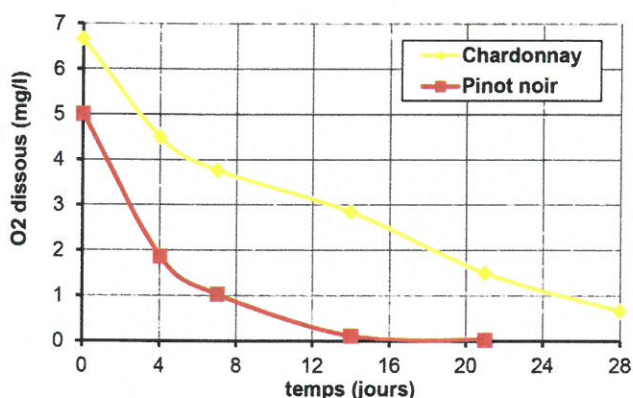


Figure 4 : Évolution moyenne de l'oxygène au cours du temps (lots ajustés à plus de 5mg/l à T<sub>0</sub>)

concernant la vitesse de FML apparaissent donc relativement contradictoires, notamment pour le chardonnay. L'explication est à chercher dans l'effet souche et dans la plus ou moins bonne reprise de croissance suite à l'ensemencement, le tout, dans le cadre d'une incidence limitée des teneurs en gaz dissous.

## CONCLUSIONS

L'acide malique favorise l'activité bactérienne. Le rendement de conversion lors de la FML augmente avec la teneur en acide malique, pour atteindre un seuil moyen de l'ordre de 250 mg par jour. Ce rendement est aussi dépendant de la souche de bactérie, de l'état physiologique de la biomasse et des conditions physico-chimiques. Il a été obtenu en considérant un pH initial de 3,25

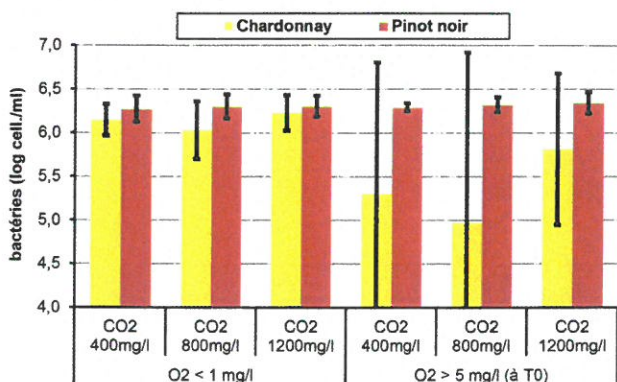


Figure 5a : Incidences des teneurs en gaz dissous sur la population bactérienne (valeurs moyennes pour trois biomasses et trois temps : 4, 7 et 14 jours)

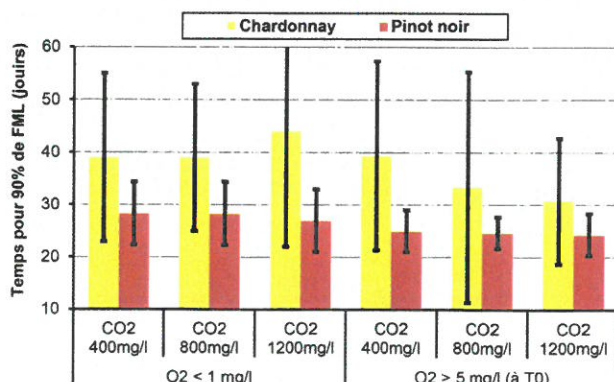


Figure 5b : Incidences des teneurs en gaz dissous sur le délai de la FML (valeurs moyennes pour trois biomasses)

et une température de 16° C. Dans les conditions de la pratique, une teneur en acide malique élevée est généralement associée à un pH bas, facteur fortement inhibiteur pour la réalisation de la FML. Une faible teneur en acide malique, inférieure à 1g/l, induit une vitesse de dégradation faible, inférieure à 100 mg/jour en moyenne, sans avoir constaté de FML languissante.

L'acide lactique apparaît être un inhibiteur important de l'activité bactérienne. Une teneur de 1,5 g/l d'acide lactique a un effet sur l'implantation et la croissance des bactéries lactiques, engendrant une FML languissante ou une non-réalisation. D'un point de vue pratique, le problème de l'enclenchement de la FML par ensemencement bactérien peut donc être posé pour les vins additionnés d'acide lactique ou pour les vins avec une FML partiellement réalisée. Dans ce dernier cas, ce n'est donc pas la faible quantité d'acide malique à dégrader qui peut constituer un problème, mais la présence d'acide lactique.

L'O<sub>2</sub> et le CO<sub>2</sub> dissous ont une incidence limitée sur la réalisation de la FML, notamment pour les vins rouges. Pour ces derniers, l'O<sub>2</sub> réagit rapidement avec les composés phénoliques et l'effet d'une aération est rapidement annulé. Les résultats sont plus contrastés pour les vins blancs. Globalement une présence d'O<sub>2</sub> dissous tend à favoriser la réalisation de la FML par rapport à une absence. L'incidence de la teneur en CO<sub>2</sub> (entre 400 et 1200 mg/l) sur le déroulement de la FML est également relativement faible. Les résultats montrent des écarts inférieurs à 30 % sur le délai de réalisation de la FML pour les différents niveaux d'O<sub>2</sub> et de CO<sub>2</sub> considérés. Ces résultats sont à moduler en fonction de la biomasse bactérienne.

## REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient la Société Lallemand pour le soutien apporté à ces travaux.