Flash Info Vendanges
Edition Spéciale Entreprises
La fermentation malo – lactique (I/II) – Octobre 2006

Sommaire

Microbiologie des vins en situation "classique"	Page 1
Les 5 groupes de points clefs de maîtrise de la FML	Page 3
Gérer une bonne FA	Page 3
Les rôles du SO_2	Page 4
Les mises au propre et l'oxygène	Page 5
La mise en œuvre	Page 5
Les actions après la FML	Page 7
Une méthode d'évaluation de la facilité de la FML	Page 8
Les cas difficiles	Page 9
Des options qui fonctionnent	Page 9
La co – inoculation	Page 9
Le levain 24 h	Page 11
La malo sous marc	Page 12
La question du coût	Page 13

L'Edition Spéciale Entreprises reprend certains points des Flashs Infos Vendanges diffusés aux œnologues conseil du Groupe ICV. C'est une synthèse pratique sur un des points clés des vinifications et des élevages des vins méditerranéens et rhodaniens. Les Flash Infos Vendanges déjà publiés sur les différents thèmes sont rappelés dans le texte au moment opportun. Tous les Flash sont téléchargeables à partir du site Internet de l'ICV : www.icv.fr

Ce document est largement basé sur une conférence donnée par l'ICV au Symposium de Microbiologie de l'Université de Fresno (Californie) en Avril 2006.

Flash Info Vendanges
Edition Spéciale Entreprises
La fermentation malo – lactique (I/II) – Octobre 2006

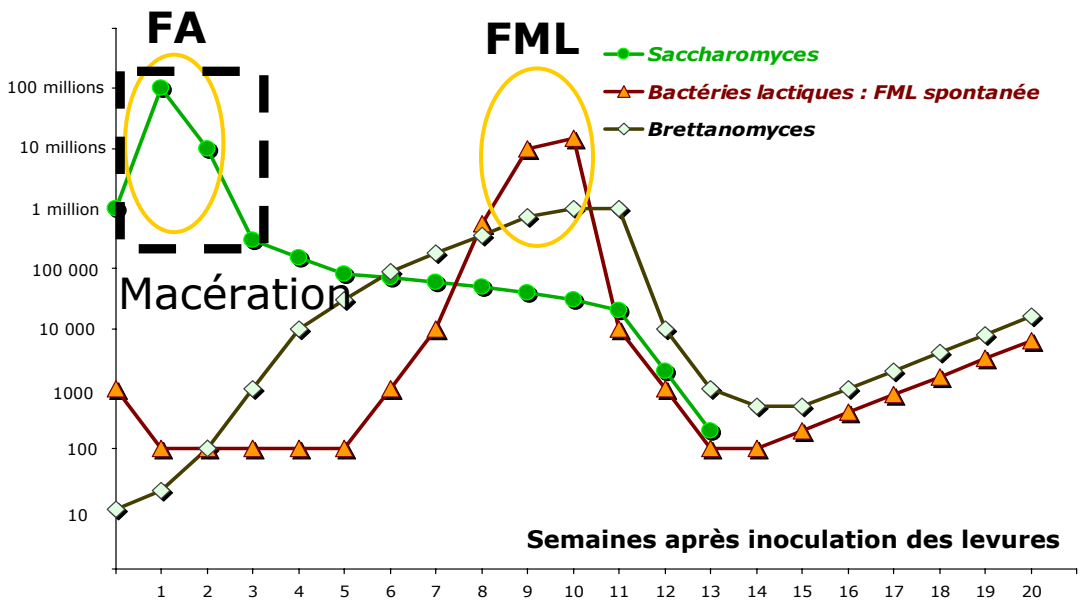
La fermentation malo – lactique (FML) est une étape de la vinification importante pour son impact sur le profil organoleptique et analytique du vin. Malgré ce, elle est le plus souvent laissée "entre les mains" des bactéries présentes dans le vin en fin de fermentation alcoolique.

Ce Flash Info Édition Spéciale Entreprises a pour objectifs de fournir quelques **clés** pour comprendre les mécanismes et les équilibres mis en jeu, de donner quelques **outils** méthodologiques d'analyse des situations et enfin de présenter des **résultats** validés pour gérer au mieux la FML.

Microbiologie des vins en situation "classique"

Les différentes fermentations qui s'enchaînent de manière spontanée ou contrôlée gagnent à être considérées du point de vue microbiologique si l'on veut comprendre ce qui se passe et ensuite raisonner les actions de contrôle qu'il est possible d'engager.

Schématiquement, la situation d'un vin rouge non ensemencé en bactéries lactiques est illustrée par le graphique ci – dessous :

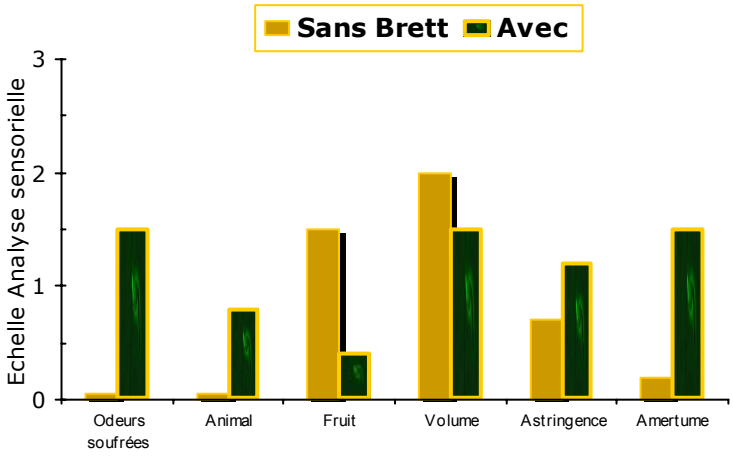


On assiste à une succession mais aussi à un chevauchement des populations. Quelques données importantes et quelques chiffres à retenir :

- les levures se multiplient pour atteindre des niveaux de population de l'ordre de 100 à 150 millions de cellules par mL, niveau variable en fonction des caractéristiques nutritives du moût, de l'ensemencement (et dans ce cas de la souche de levure utilisée), des conditions de FA (température, O_2, azote…),
- les bactéries lactiques, réduites par le sulfitage initial et maintenues à un niveau faible par la compétition avec les levures sont, en fin de FA, à des niveaux de population de quelques centaines à quelques milliers de cellules par mL. Leur multiplication jusqu'à des niveaux proches du million de cellules par mL est nécessaire avant le démarrage de la fermentation malo – lactique. En l'absence de SO_2 actif, la vitesse de cette multiplication dépend principalement de l'importance des sulfitages réalisés de la vendange à la fin de FA (cf. chapitre sur la gestion du SO_2), des conditions nutritives du milieu et de la température. La nutrition repose essentiellement sur la biodisponibilité des acides aminés résiduels et de ceux libérés lors de l'autolyse des levures fermentaires. De ce point de vue, *Oenococcus oeni* est exigeant et toutes les souches ne sont pas égales : certaines malos même

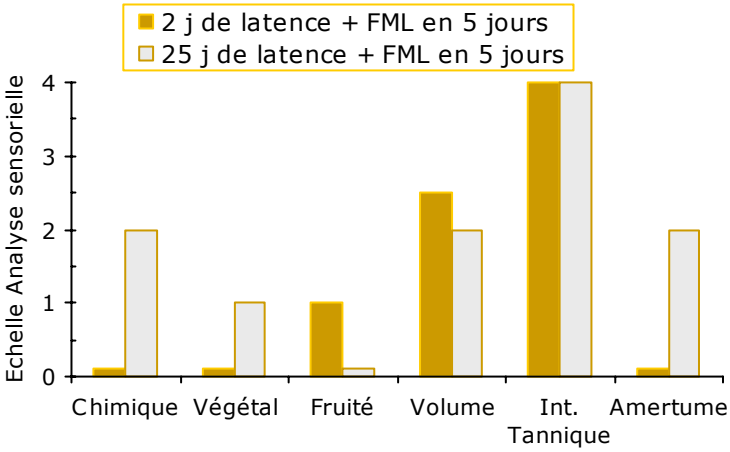
ensemencées ne se font pas, très probablement à cause de carences nutritives. Lorsque les conditions nutritives ne sont pas limitantes, à un pH > 3,5 et à 20°C, **le temps de génération (temps nécessaire au doublement de la population) est de l'ordre de 20 h**. Dans ces conditions et avec une population initiale comprise entre 100 et 1000 cellules par mL (cas de la FML non ensemencée), il faut 10 à 15 jours après la FA avant qu'une FML démarre. Au-delà de ce délai, si la FML ne démarre pas, il faut se poser des questions sur les risques pris, notamment par rapport aux microorganismes contaminants.

- les microorganismes contaminants sont peu affectés par le sulfitage initial et la compétition liée à la FA. On y retrouve principalement des bactéries lactiques dont certaines sont faiblement ou pas actives pour dégrader l'acide malique (Pédiocoques notamment), des bactéries acétiques et des levures (*Brettanomyces* essentiellement). Leur niveau dépend essentiellement des conditions d'hygiène (de la vigne au chai), de la maîtrise de la FA, des nutriments présents, de l'oxygène disponible et **surtout du temps qui leur est laissé pour se développer**. L'objectif minimaliste est de contrôler ce risque microbiologique qui entraîne des déviations organoleptiques (cf. essai R&D ICV ci – contre), la production d'amines biogènes et l'augmentation d'acidité volatile.



La situation d'un vin blanc ou rosé est très proche de celle d'un vin rouge, à deux différences près : les sulfitages réalisés en phase préfermentaire sont généralement plus importants que pour les rouges et les pH sont souvent plus bas. La conséquence générale est une baisse importante, voire une quasi disparition des levures contaminantes et des bactéries lactiques, ce qui explique la difficulté des FML spontanées pour les blancs ou les rosés.

Dans ces conditions écologiques, le vinificateur doit agir pour favoriser la bonne succession des populations et des temps de latence les plus courts possibles entre les 2 fermentations, quand elles sont recherchées. Le graphique ci – contre, résultat d'un essai de la R&D ICV où l'on a allongé la phase de latence en utilisant le froid et un ensemencement décalé, illustre l'impact d'un maintien passif d'un vin rouge sur ses lies (malgré les 2 soutirages "classiques" de fin de FA des procédures de la R&D) pendant un peu plus de 3 semaines après fin de FA.



Cependant, l'intérêt de réduire le temps de latence est discutable, notamment lorsqu'on souhaite microoxygéner entre FA et FML. On n'est alors plus dans le cas d'un maintien passif sur les lies. L'adaptation à ce type de situation conduit donc à remplacer l'exigence

d'enchaînement rapide des deux fermentations par une autre : si on veut une FML décalée pour pouvoir microoxygéner, il faut réduire les risques de développement des microorganismes contaminants sous peine de voir les effets positifs attendus de la microoxygénation complètement annulés.

Les 5 groupes de points clefs de maîtrise de la FML

La maîtrise de la FML commence à la vigne notamment avec l'état sanitaire du raisin, porteur plus ou moins important de microorganismes contaminants mais aussi, en cas d'attaques de vers de la grappe ou de *Botrytis*, source de nutriments facilement disponibles pour les microorganismes présents sur les matériels de récolte, à la réception et dans le chai. Ceci conduit fréquemment à augmenter les doses de SO_2 qui, même si elles ne se retrouvent pas en fin de FA, ont un impact sur le déroulement de la FML.

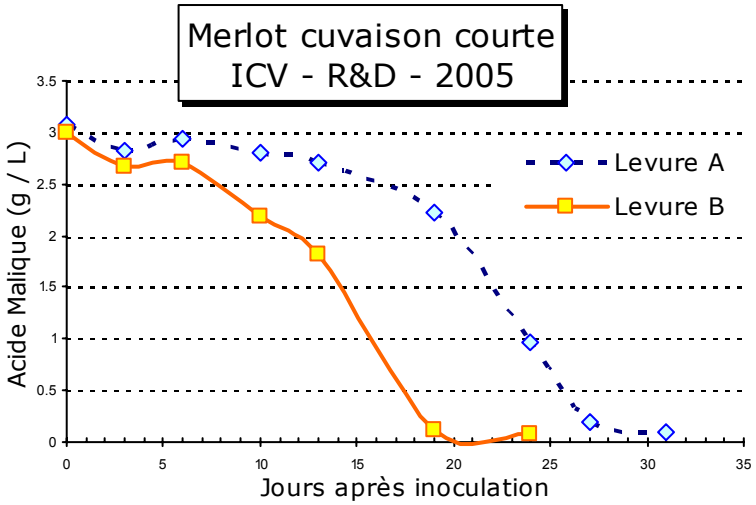
Un autre point souvent oublié est le niveau de maturité : dans les situations normales de maturation, l'élévation du pH est un facteur favorable à la réussite de la FML mais l'élévation du degré alcoolique et la baisse de la concentration en acide malique sont deux facteurs défavorables. Récolter "très mûr" implique donc une approche plus fine de l'ensemble des paramètres de la vinification, notamment de la mise en œuvre de l'ensemencement en bactéries.

> En dehors des cas particuliers (mais de plus en plus fréquents) de concentration sur souche, le choix de la bonne maturité n'est pas anodin : est – il toujours nécessaire d'attendre une maturité pelliculaire complète ? De nombreux objectifs de produits, associés à une bonne maîtrise des extractions et des vinifications ne rendent pas cette exigence nécessaire.

Gérer une bonne FA

La bonne gestion de la FML passe d'abord par une bonne gestion de la FA. C'est en effet une étape pendant laquelle la plupart des nutriments sont disponibles pour les microorganismes d'altération : la FA doit être **régulière et complète** pour limiter les risques. Les outils sont connus : la levure et ses capacités fermentaires, son adaptation aux moûts méditerranéens et rhodaniens, la qualité du levurage (dose, maîtrise de la réhydratation…), la mise à disposition des sucres (foulage, enzymes, extractions…), la maîtrise des températures…

Le danger est de voir démarrer une FML sur sucres avec des incidences souvent fortes sur l'acidité volatile ou de laisser se multiplier des *Brettanomyces* qui non seulement entraînent des déviations organoleptiques mais entrent aussi en concurrence avec les bactéries lactiques et retardent voire empêchent la FML.



Par ailleurs, la phase de latence de la FML est en partie dépendante de la levure utilisée pour la FA, probablement fonction de sa vitesse d'autolyse, de sa production de SO_2, de son impact sur le pH. Des durées de FML significativement plus longues sont d'ailleurs constatées pour certaines levures (+ 10 à + 15 jours par rapport aux "meilleures"). Le graphique ci – contre illustre un cas concret du

millésime précédent, avec ensemencement.

Ce que l'on remarque d'abord c'est que l'effet se fait sentir sur la phase de latence mais pas sur la cinétique de dégradation de l'acide malique, une fois qu'elle a commencé. L'autre remarque concerne les conditions de l'essai : ici on a ensemencé, c'est-à-dire introduit 1 million de bactéries lactiques par mL. On s'est affranchi de la multiplication nécessaire dans les conditions d'une FML spontanée. Le temps de latence est donc ici un temps d'adaptation et de redémarrage de la bactérie.

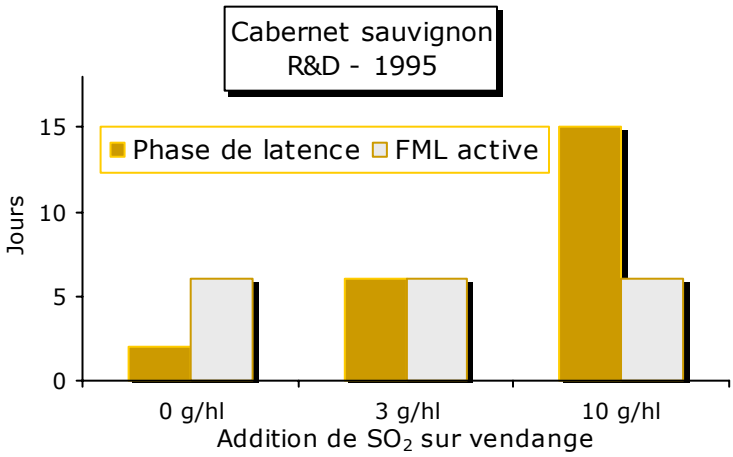
Dans des essais comparatifs, en l'absence d'inoculation, les écarts de temps de latence sont doublés : la hiérarchie entre les levures reste identique mais leur impact s'accentue nettement.

Les rôles du SO_2

Le SO_2 est un antimicrobien qui agit sur les bactéries lactiques comme sur les autres microorganismes *via* sa forme active mesurée dans nos laboratoires à partir du niveau de SO_2 libre, du pH et du degré alcoolique. Dans la plupart des situations, le SO_2 libre (et souvent le total) est quasi nul en fin de FA même si les additions sur vendange ont été importantes.

Pourtant le SO_2 a potentiellement 2 effets négatifs sur la FML :

- Il réduit la population initiale de bactéries lactiques. C'est un point important quand il n'y a pas d'ensemencement pratiqué. À 20°C, dans des conditions favorables de pH et d'alimentation aminée, il faut environ 3 jours pour que la population bactérienne se multiplie par 10. Si le SO_2 initial réduit d'un facteur 100 la population, il y aura donc environ une semaine de plus de latence, en l'absence d'inoculation.
  Il faut donc être attentif au SO_2 apporté sur la vendange, au SO_2 apporté en fin de FA sur les macérations longues mais aussi au choix de **la combinaison process – levure – type d'alimentation azotée**. Par exemple, une levure peu favorable à la FML, sur jus clair de thermo, FA à 14°C et phosphate diammonique comme seule source d'azote peut produire du SO_2 jusqu'à 50 mg / L (SO_2 total) dans ces conditions. En relevant légèrement la température, avec du FermaidE® comme source d'azote et de l'oxygène aux stades adéquats, on revient à des valeurs très basses de SO_2 total (< 20 mg / L) et dans la pratique, les FML se font dans des délais classiques.



- Les sulfates et les composés soufrés ont un impact sur la phase de latence. Même si aucune étude physiologique exhaustive n'a mis en évidence les mécanismes d'action, les essais comme l'expérience de terrain confirment ce fait. Le cas ci – contre en est la parfaite illustration : le SO_2 total en fin de FA était en dessous du seuil de détection (pour mémoire, la levure était la D254®). Ici encore, malgré l'inoculation, c'est l'allongement de la phase de latence qui traduit la difficulté pour les bactéries à s'adapter au milieu. On peut considérer que l'atome de soufre présente une forme de toxicité pour les bactéries lactiques, quelle que soit la molécule dans laquelle il est présent, plus forte pour le SO_2 que pour les sulfates bien sûr. Sans l'avoir précisément étudié,

on peut supposer que ces effets seront encore plus marqués dans le cas de vins non ensemencés puisqu'il faut ajouter la diminution de la population initiale de bactéries indigènes et l'impact sur la multiplication nécessaire.

Les mises au propre et l'oxygène

Après le décuvage et en fin d'alcoolique, l'ICV conseille depuis des années sur vins rouges au moins 2 mises au propre à 48 heures d'intervalles.

Contrairement aux craintes de certains vinificateurs, qui imaginaient que l'on appauvrissait le vin en bactéries lactiques, ces mises au propre sont efficaces pour plusieurs raisons :

- On diminue le niveau d'odeurs soufrées en limitant le tassement des lies qui en relarguent en quantité, donc des molécules qui sont responsables de temps de latence importants (cf. ci – dessus). Pour éliminer efficacement ces lies végétales, il est souvent nécessaire de dégazer lors des soutirages en passant par un baquet. Ce dégazage permet aux lies lourdes de sédimenter plus rapidement pour un second soutirage plus efficace.
- On oxygène le vin. Un apport lors d'un soutirage à l'air bien fait représente environ 4 mg / L d'O_2. Cet oxygène diminue les odeurs soufrées et peut être assimilé par les bactéries lactiques. On sait aujourd'hui qu'*Oenococcus oeni* est micro – aérophile, ce qui signifie qu'elle tire avantage de faibles quantités d'oxygène dissous pour son développement et son activité. En outre, on constate sur le terrain que la pratique de la microoxygénation, en dépit de certains discours il y a quelques années, favorise la FML très certainement pour les raisons évoquées.

Techniquement, sachant que les temps de latence sont de l'ordre de 5 à 10 jours et qu'on peut microoxygéner tant que le malique est > 0,8 g / L, il est cohérent d'ensemencer au début de la dernière semaine de microoxygénation.

La pratique de la **microoxygénation** n'est donc pas un frein à la FML ni à l'ensemencement en bactéries lactiques, bien au contraire. L'objectif est d'apporter, en un temps donné, une dose donnée pour atteindre les objectifs organoleptiques voulus.

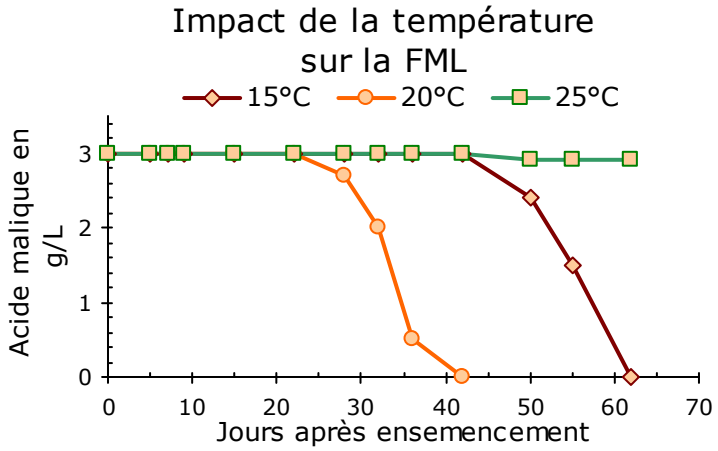
D'autre part, et même en l'absence d'odeurs soufrées, le constat du terrain est que les mises au propre favorisent la FML comme la netteté aromatique. Il est probable que les mouvements du vin accélèrent le relargage des composés issus de l'autolyse des levures mortes ayant réalisé la FA et donc l'alimentation des bactéries lactiques. Ceci a été démontré par l'INRA au cours de l'élevage en barrique : il n'y a pas de raison évidente pour que ce ne soit pas le cas aussi en cuve en fin d'alcoolique.

Rappelons que les soutirages n'éliminent qu'une partie des levures. Il en reste plus de 50 millions par mL après 2 soutirages. Les mises au propre ne sont donc pas incompatibles avec l'élevage sur lies, bien au contraire.

La mise en œuvre

Lorsqu'on ne réalise pas d'ensemencement bactérien, les seuls paramètres sur lequel on peut agir après les mises au propre sont la température et l'acidité.

Pour ce qui concerne la **température**, les résultats comparatifs montrent que la plage idéale se situe autour de **20°C – 22°C**, à cause de l'alcool contenu dans le vin et des pH pas toujours favorables.



Dans la pratique, il est préférable de se tenir vers les valeurs basses de la fourchette pour les vins à forte teneur en alcool et vers le haut de la fourchette pour les autres.

Les essais conduits par l'ICV en 2005 sur des vins ne faisant pas spontanément leur FML en cave ont confirmé l'importance cruciale de la température : à la R&D, les témoins non ensemencés ont quasiment tous fait leur FML spontanément. Deux différences essentielles avec la cave : un soutirage de plus (le prélèvement) et une température parfaite c'est-à-dire 20°C, homogène pour l'ensemble du volume de vin et constante (pas de variations d'un jour à l'autre).

Le **pH** est un autre facteur sur lequel on peut agir en désacidifiant. En dessous de 3,4 les conditions sont difficiles pour toutes les bactéries lactiques et spécialement *Oenococcus oeni*. On considère que le pH n'est plus un facteur limitant au-delà de 3,6. Il est donc parfois nécessaire de désacidifier, en suivant la Réglementation. Le seul outil valable pour calculer la dose à ajouter est le pH – mètre.

Lorsque la FML traîne au-delà de 4 semaines, nettoyer le milieu par une centrifugation et une filtration puis ensemencer avec ajout de nutriments (Optimalo+® à l'ICV a accéléré la FML sur les essais en blanc de mai 2005) est le minimum pour **espérer** réaliser la FML.

Dans le cas de l'ensemencement, il est important de s'assurer que les conditions sont réunies pour une FML réussie : **l'ensemencement n'est pas une assurance tous risques**. Par ailleurs, **tout vin qui n'a pas démarré spontanément sa FML 2 à 3 semaines après FA et sans sulfitage doit être suspect** : soit le niveau de populations de bactéries lactiques indigènes est insuffisant, soit la concurrence d'autres microorganismes est trop forte, soit les conditions nutritives sont défavorables aux bactéries lactiques.

En outre, ces éléments peuvent se combiner : il ne faut pas laisser croire que l'ensemencement va automatiquement régler le problème. La bactérie lactique tout terrain n'est pas encore sélectionnée, même si on y travaille.

Ensemencer est un **acte tactique d'occupation du terrain** par un microorganisme connu et maîtrisable qui limite les possibilités de développement des Lactobacilles, Pédiocoques et *Brettanomyces*. Ces contaminants sont responsables de la "fermeture aromatique" des vins, de la production de composés soufrés, d'acidité volatile et d'amines biogènes.

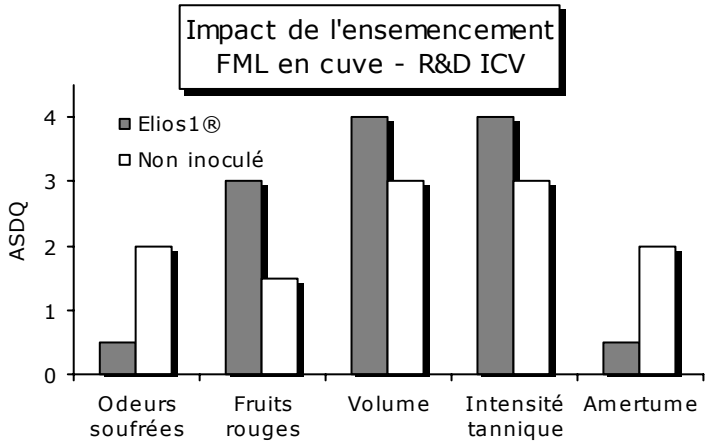
Un des chapitres qui suit propose une méthode d'évaluation du niveau de difficulté qui doit vous aider à répondre aux situations de terrain. Un autre chapitre aborde les techniques alternatives qui ont prouvé leur efficacité à la R&D et qui sont en cours de validation en situation de terrain.

De manière générale, les bactéries lactiques sélectionnées ont des besoins équivalents aux bactéries indigènes : il faut aussi régler les questions de mise au propre, de SO_2, de température, de pH…

L'ensemencement peut se faire en phase liquide comme sous marc en prenant ses précautions pour ne pas disséminer les bactéries sur des cuves qui n'ont pas achevé leur FA.

Flash Info Vendanges
Edition Spéciale Entreprises
La fermentation malo – lactique (I/II) – Octobre 2006

Le choix de **l'ensemencement** (outre les aspects économiques directs) est un **choix commercial et organoleptique** (cf. graphique ci – contre) :



- Commercial parce qu'un vin prêt plus tôt et plus net est souvent mieux vendu
- organoleptique parce que la réduction de la phase de "macération" passive sur lies, la réduction significative du temps laissé aux microorganismes contaminants pour se développer, comme la bactérie choisie ont un impact sur le profil du vin, au-delà des amines biogènes, même pour une FML en barrique.

Les actions après la FML

Quel que soit le choix de la cave, une fois la FML achevée, les bactéries lactiques doivent être éliminées. L'acide malique n'est pas le seul substrat qu'elles consomment, même si c'est le premier à être dégradé : les sucres et l'acide citrique sont eux aussi consommés et conduisent à la production d'acide acétique. En 3 jours, sous marc et sans sulfitage, l'acidité volatile peut facilement monter de plus de 0,2.

Le lysozyme n'a aucune efficacité sur les bactéries acétiques ou sur les *Brettanomyces*. Son utilisation en fin de FML vise à diminuer les niveaux de SO_2 utilisés. Le lysozyme est plutôt considéré comme intéressant en utilisation préventive.

Une technique possible d'élimination des bactéries lactiques est l'ajout de lysozyme (généralement combiné à un sulfitage d'au moins 3 g / hL). Rappelons que le lysozyme est une enzyme, donc vendu à des prix proches de 150 € / kg. Les doses de traitement efficaces (résultats ITV) sont supérieures à 20 g / hL, le plus souvent proches de 50 g / hL. Le coût est donc conséquent.

En fonction du niveau de pH, de l'historique de la vinification et du niveau d'hygiène de la cave on conseille un sulfitage qui permettra d'avoir entre 0,5 et 1 mg / L de SO_2 actif.

En rouge, le sulfitage se fait juste après le soutirage qui permet d'éliminer les lies lourdes, à la fois refuge possible de microorganismes de contamination et fixatrices de SO_2.

En blanc ou en rosé, on préfèrera sulfiter d'abord pour établir une protection par le SO_2 libre lors du soutirage qui suit.

Document rédigé par Daniel Granès, Directeur scientifique, Lucile Blateyron, Responsable R&D, Caroline Bonnefond, Chargée de Mission Biotechnologies et les membres du Groupe Biotechnologies de l'ICV : Agnès Piperno, Myriam Rouanet, Christophe Roux, Éric Bru, Édouard Médina, Céline Romero, Thomas Oui, François Boudou.