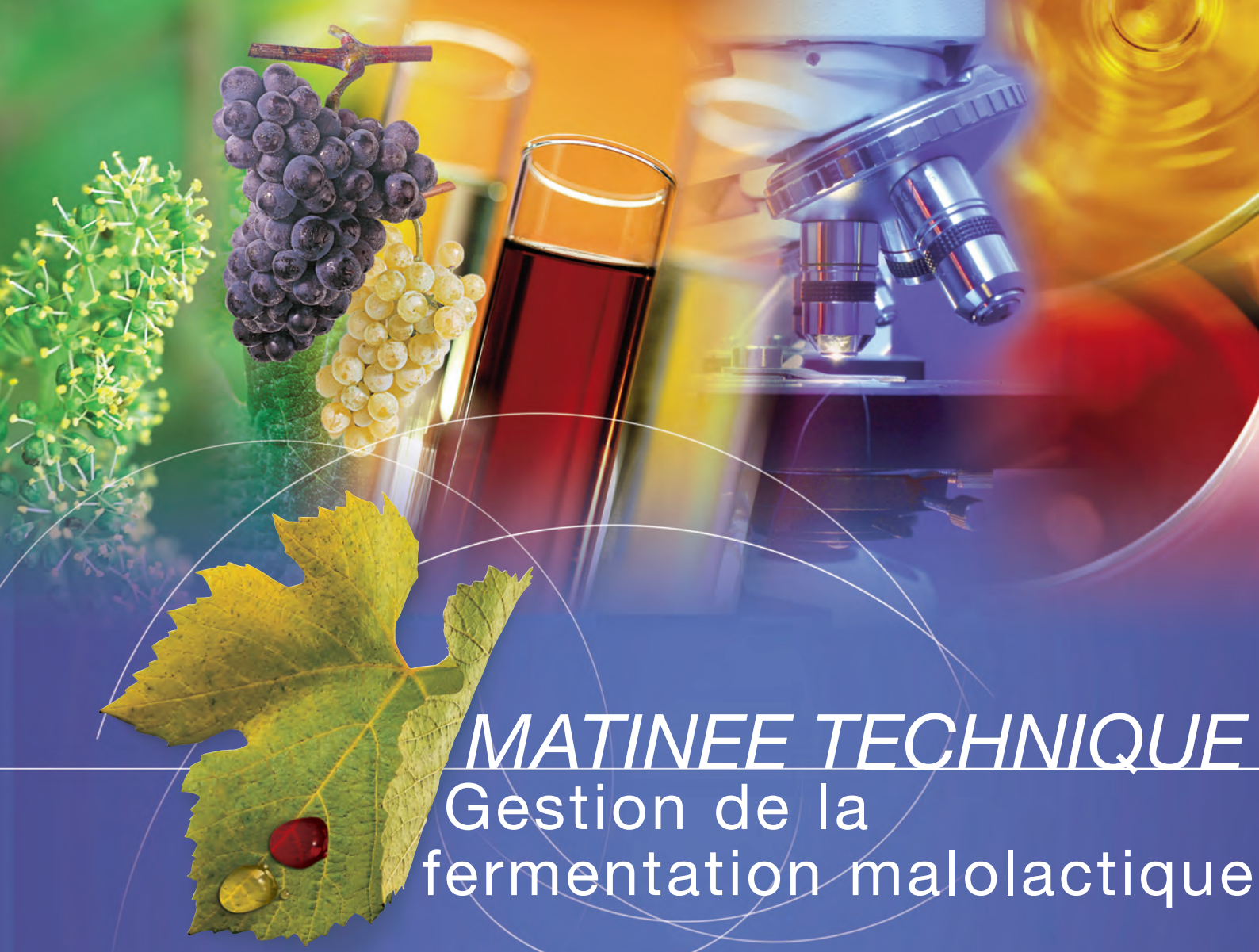


MATINEE TECHNIQUE

Gestion de la fermentation malolactique

Février 2010

BOURGOGNES

Bureau Interprofessionnel des Vins de Bourgogne

SOMMAIRE

LA CO-INOCULATION LEVURES / BACTERIES LACTIQUES : INTERÊTS ET MISES EN ŒUVRE ……..…….…….....p 1

LA MAÎTRISE DE LA FERMENTATION MALOLACTIQUE : LES ENJEUX .....p 2

LA MAÎTRISE DE LA FERMENTATION MALOLACTIQUE : PROBLEMATIQUE OENOLOGIQUE.....p 2

FERMENTATION MALOLACTIQUE RAPIDE = PREVENTION DES RISQUES DE DEVIATIONS ?.....p 2

- Prévention des risques microbiologiques.....p 2
- Eviter la production d'amines biogènes .....p 3
- Vins blancs : prévention des risques d'oxydation prématurée du Chardonnay .....p 3
- Vins rouges : ne favorise pas la stabilisation de la couleur.....p 4
- Risques de piqûre lactique ? .....p 4

MOMENT DE L'ENSEMENCEMENT BACTERIEN .....p 5

***APPLICATION PRATIQUES DE LA CO-INOCULATION LEVURES / BACTERIES POUR L'ELABORATION DES VINS ROUGES (PRIMEURS)*…… p 5**

ESSAIS SUR GAMAY .....p 5

BILAN DES EXPERIMENTATIONS EN GRANDS VOLUMES SUR VINS PRIMEURS.....p 7

***APPLICATION PRATIQUES DE LA CO-INOCULATION LEVURES / BACTERIES POUR L'ELABORATION DES VINS BLANCS (ACIDES)*…… p 8**

LE FACTEUR SO_2 .....p 8

LE FACTEUR TEMPERATURE .....p 9

LE FACTEUR pH.....p 10

FACTEURS COMBINES .....p 11

IMPACT DU MOMENT DE L'ENSEMENCEMENT BACTERIEN SUR LA DUREE DE LA FERMENTATION MALOLACTIQUE.....p 12

***CONCLUSIONS*……p 14**

MISE EN ŒUVRE DE L'ENSEMENCEMENT BACTERIEN PRECOCE (CO-INOCULATION OU PENDANT LA FERMENTATION ALCOOLIQUE) .....p 14

INTERET ŒNOLOGIQUE DE L'ENSEMENCEMENT BACTERIEN PRECOCE (CO-INOCULATION OU PENDANT LA FERMENTATION ALCOOLIQUE) .....p 14

BACTERIES MALOLACTIQUES : DE NOTRE PRODUCTION A VOTRE PRODUIT…… ……..……..…….....p 1

LES BACTERIES DU VIN .....p 17

***LES ETAPES DE DEVELOPPEMENT D'UN FERMENT MALOLACTIQUE*……p 14**

SCHEMA D'ETUDE D'UNE SOUCHE.....p 17

ISOLEMENT / COLLECTION .....p 19

SPECIFICITE DU PROCESS DE PRODUCTION MBR® (BACTERIES A INOCULATION DIRECTE .....p 21

LES TYPES DE PRODUITS EXISTANTS .....p 23

- « Standard »..... p 23
- MBR ou « Microbes be ready » ou inoculation directe ..... p 23
- One step ..... p 24

***LES INTERACTIONS LEVURES / BACTERIES*…….…… p 24**

INHIBITION DES BACTERIES LACTIQUES PAR LES LEVURES .....p 25

STIMULATION DES BACTERIES LACTIQUES PAR LES LEVURES .....p 27

LA CO-INOCULATION LEVURES / BACTERIES LACTIQUES : INTERÊTS ET MISES EN OEUVRE

Vincent Gerbaux
Institut Français de la Vigne et du Vin – Unité de Beaune

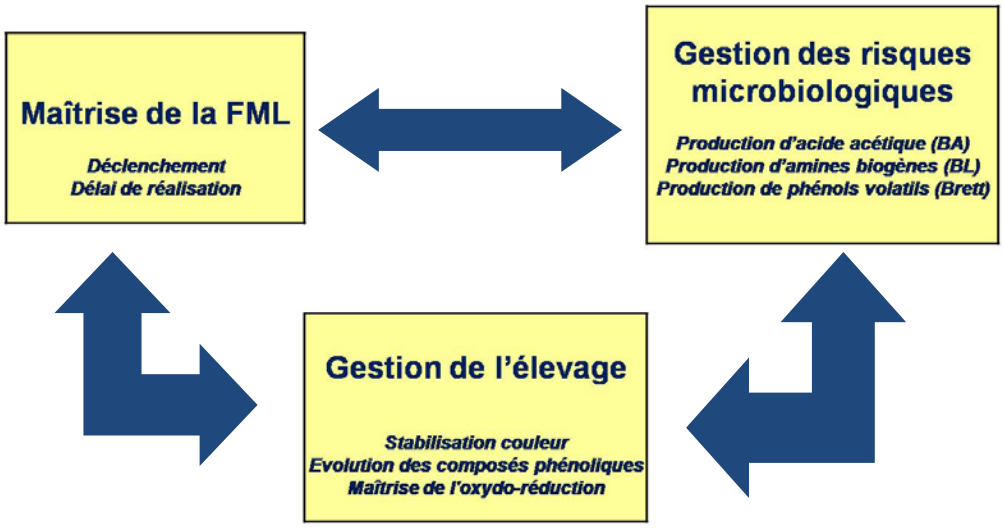
Les résultats des recherches présentés sont issus d'un travail collaboratif de Vincent Gerbaux et Carole Briffox (IFV Beaune), Valérie Lempereur (IFV Villefranche sur Saône).

LA MAÎTRISE DE LA FERMENTATION MALOLACTIQUE : LES ENJEUX

Les deux enjeux principaux de la gestion de la fermentation malolactique sont :

- Réduire les coûts et les délais de production des vins
- Préserver les qualités sensorielles et hygiéniques des vins.

LA MAÎTRISE DE LA FERMENTATION MALOLACTIQUE : PROBLEMATIQUE OENOLOGIQUE

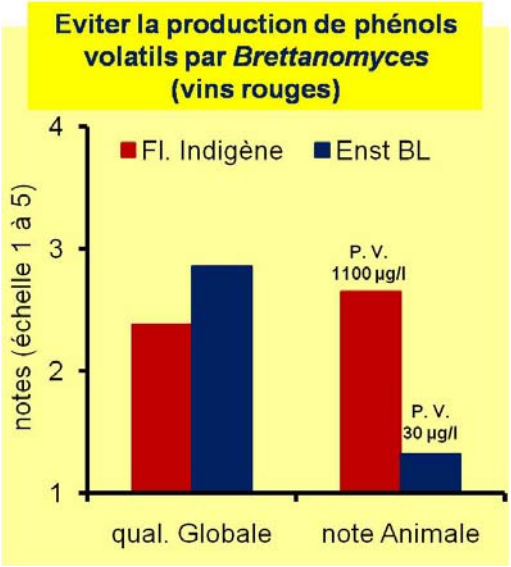


La gestion de la FML est en interaction avec la gestion des risques biologiques et la gestion de l'élevage. Il est nécessaire de la raisonner en fonction des ces autres paramètres.

FERMENTATION MALOLACTIQUE RAPIDE = PREVENTION DES RISQUES DE DEVIATIONS ?

Prévention des risques microbiologiques :

On peut penser qu'une fermentation malolactique rapide peut permettre de prévenir les risques microbiologiques.
Les résultats d'essais confirment cette tendance.
Lors des dégustations, les vins ensemencés en bactéries lactiques sélectionnées sont mieux notés que les vins ayant fait leur fermentation malolactique naturellement, avec des bactéries indigènes, surtout en raison du caractère animal du vin résultant de la présence de phénols volatils. Cela est directement lié à la durée de la fermentation malolactique. En effet, diminuer sa durée, c'est limiter l'accumulation de phénols volatils en ne laissant pas la possibilité aux *Brettanomyces* de se développer entre la fermentation alcoolique et la fermentation malolactique.



Eviter la production d'amines biogènes :

De plus, une fermentation malolactique rapide permet d'éviter la production d'amines biogènes. Ces composés sont fabriqués par les bactéries lactiques indigènes à partir des acides aminés naturellement présents dans le vin. Les plus connues sont la tyramine et l'histamine qui sont réputées allergisantes quand elles sont présentes dans les produits agroalimentaires.
Les bactéries lactiques sélectionnées perdent cette capacité à produire des amines biogènes au cours du processus de sélection car cette activité est instable. Les bactéries sélectionnées ne produisent donc pas ou peu d'amines biogènes.

Eviter la production d'amines biogènes par les bactéries lactiques indigènes (vins rouges et blancs)

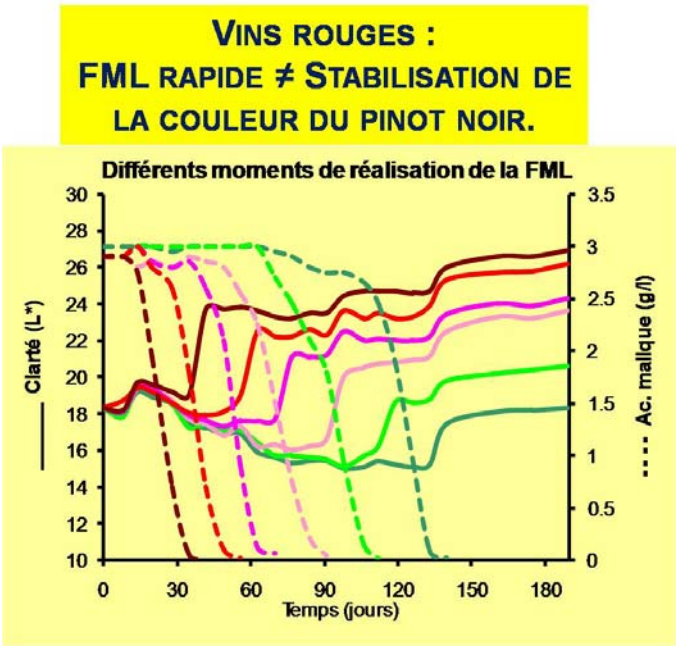
mg/l	Histamine	Tyramine
Enst BL	< 1	
Fl. Indigène	13.9	4.6

Vins blancs : prévention des risques d'oxydation prématurée du Chardonnay :

Une fermentation malolactique rapide sur vins blancs permet de stabiliser les vins rapidement par le sulfitage post-fermentation et évite de laisser le vin longtemps sans protection contre l'oxygène, et limitant ainsi les risques d'oxydation.

Vins rouges : ne favorise pas la stabilisation de la couleur

Des mesures de clarté sur des vins ensemencés en bactéries lactiques sélectionnées à différents moments, montrent que l'ensemencement bactérien précoce n'est pas favorable à la stabilisation de la couleur des vins de Pinot Noir. La clarté est inversement proportionnelle à l'intensité colorante : plus un vin a une valeur de clarté importante, moins il coloré.



Sur ce schéma apparaît l'évolution de la clarté du vin et la disparition de l'acide malique au cours de la fermentation malolactique.

Dans le cas d'une fermentation malolactique tardive, de nombreuses combinaisons entre les tanins en les anthocyanes se créent, ce qui permet de renforcer et stabiliser la couleur. L'ajout de SO_2 entraîne toujours une décoloration mais elle est moins importante que dans le cadre d'une fermentation malolactique rapide.

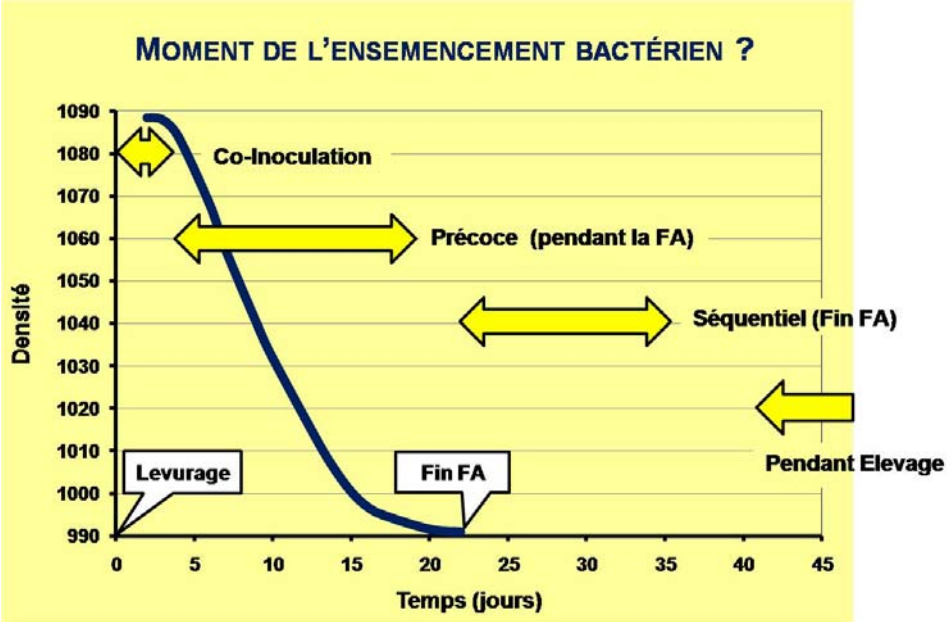
Risque de piqûre lactique ?

Les sucres résiduels ne sont dégradés massivement par les bactéries lactiques qu'après épuisement total de l'acide malique (et citrique).

En dessous d'un pH de l'ordre de 3,3, la population de bactéries lactiques régresse naturellement en fin de fermentation.

Donc, pour qu'il y ait une piqûre lactique, il est nécessaire qu'il y ait des sucres résiduels, que la fermentation malolactique soit terminée et que le pH soit supérieur à 3,3. Cela nécessite donc des conditions particulières. Le remède peut être l'utilisation de lysozyme qui permet la lyse des parois des bactéries lactiques et donc leur disparition.

MOMENT DE L'ENSEMENCEMENT BACTERIEN



La co-inoculation stricte : les levures et les bactéries lactiques sélectionnées sont ajoutées en même temps dans le moût. On parle également de co-inoculation quand on ajoute les bactéries un ou deux jours après levurage.

Ensemencement bactérien précoce : l'ajout de bactéries lactiques se fait pendant la fermentation alcoolique.

Ensemencement séquentiel : l'ensemencement en bactéries lactiques est réalisé en fin de fermentation alcoolique, c'est la technique classiquement utilisée.

Ensemencement pendant l'élevage : c'est une méthode curative. L'ensemencement est réalisé très tardivement si la FML ne se déclenche pas. Il n'y a cependant pas de maîtrise possible et les conditions ne sont pas forcément propices à l'implantation des bactéries et à la réussite de l'ensemencement.

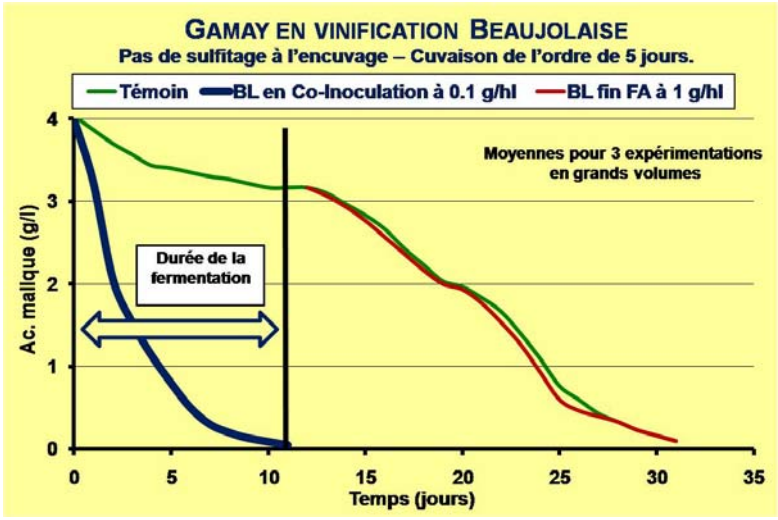
APPLICATIONS PRATIQUES DE LA CO-INOCULATION LEVURES / BACTERIES LACTIQUES POUR L'ELABORATION DES VINS ROUGES (PRIMEURS)

ESSAIS SUR GAMAY

La co-inoculation n'est pas forcément adaptée au Pinot Noir en raison de la perte de couleur engendrée par cette technique. Cependant, dans le cadre de la mise sur le marché de vins primeurs ou des besoins de livraison à des dates prédéfinies, ce peut être une bonne option. Des essais ont été menés par l'IFV de Villefranche sur Saône sur Gamay.

Dans le cadre d'une vinification beaujolaise :

- Encuvage de vendange entière donc très peu de jus en fond de cuve
- Sans SO_2

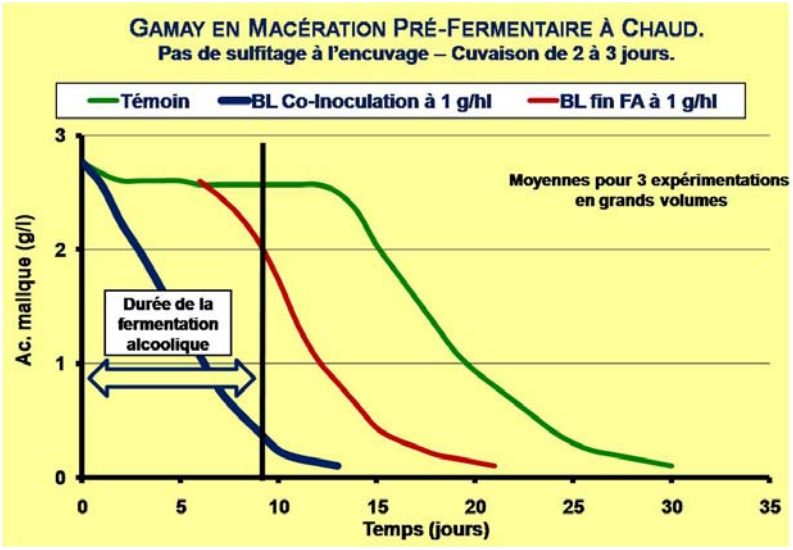


Ces conditions sont très favorables aux bactéries lactiques et aux levures.
Pour une co-inoculation stricte, la durée de la fermentation malolactique est calée sur celle de la fermentation alcoolique, soit environ 12 jours.
Par contre, il est nécessaire de diminuer la dose de bactéries ajoutées. En effet, la dose classique est de 1g/hl, ici une dose de 0,1 g/hl a été utilisée car les conditions sont tellement favorables qu'avec une dose normale, la FML se déroulerait trop vite avec un risque important de piqûre lactique.
Dans le cas d'un ensemencement séquentiel avec une dose classique, l'ensemencement n'apporte rien et la fermentation malolactique se déroule comme dans le témoin.

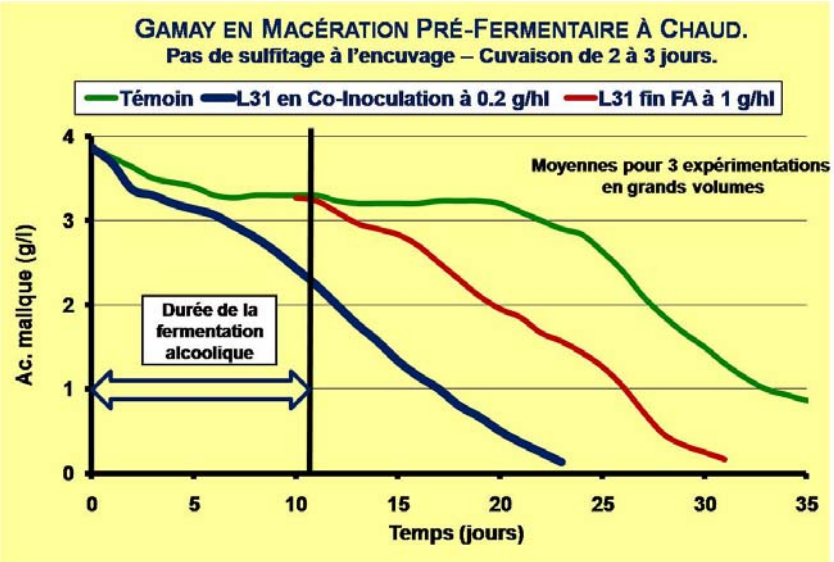
Dans le cas d'une vinification de Gamay avec macération pré-fermentaire à chaud :

- Chauffage de la vendange à 65 °C pendant 12 heures
- Refroidissement et levurage
- Sans SO_2

Cette technique permet une extraction importante de jus et des polyphénols. La cuvaison est donc raccourcie à une durée de 2 ou 3 jours.



Pour une co-inoculation avec une dose normale à 1g/hl, la fermentation malolactique se déroule de façon rapide (quelques jours de plus que la fermentation alcoolique). L'ensemencement séquentiel en fin de fermentation alcoolique permet également de réduire la durée de la FML par rapport au témoin.



Par contre, si les doses de bactéries sont diminuées, le gain de temps est bien moindre et l'intérêt de l'ensemencement est réduit.

BILAN DES EXPERIMENTATIONS EN GRANDS VOLUMES SUR VINS PRIMEURS

Les résultats sont issus de 3 vinifications beaujolaises et 6 macérations pré-fermentaires à chaud.

	Témoin	Co-Inoculation	BL fin FA
FA (jours)	10	10	10
FML (jours)	**30**	**13**	**24**
Degré alc. (%v/v)	12.4	12.4	12.4
Sucres (g/l)	**0.7**	**0.8**	**0.7**
pH	3.46	3.43	3.45
Ac. Totale (g/l H2SO4)	3.9	4.1	4.0
Ac. Volatile (g/l H2SO4)	**0.21**	**0.20**	**0.21**
Intensité colorante /1cm	5.7	5.9	5.8
Note d'ensemble /20	**11.8**	**11.8**	**12.1**

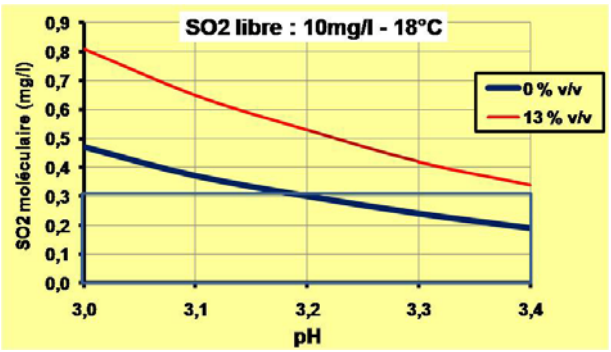
Il n'y a pas de différence d'un point de vue analytique entre les vins témoins et ceux ensemencés en bactéries lactiques. De plus, les notes attribuées en dégustation sur la qualité globale du vin sont également très proches et ne présentent pas de différence significative.
Seule la durée de la fermentation alcoolique diffère selon le but recherché.

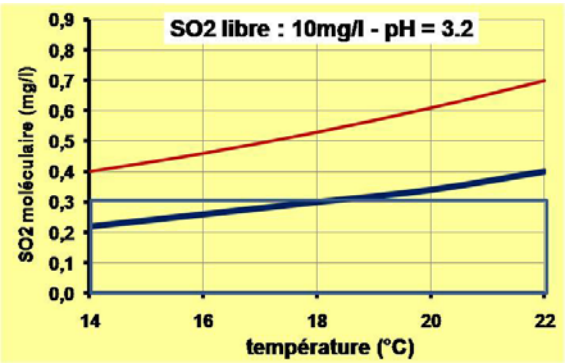
APPLICATIONS PRATIQUES DE LA CO-INOCULATION LEVURES / BACTERIES LACTIQUES POUR L'ELABORATION DES VINS BLANCS (ACIDES)

Plusieurs facteurs influencent la viabilité des bactéries lactiques et donc la bonne réalisation de la fermentation malolactique dans les vins blancs.

LE FACTEUR SO_2

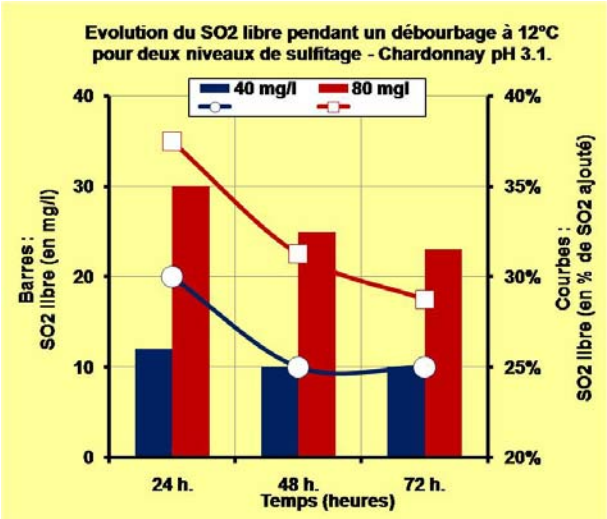
Environ 30 % du SO_2 ajouté reste sous forme libre. La fraction la plus active, le SO_2 actif ou moléculaire dépend du pH, du degré alcoolique et de la température.
Pour une concentration donnée de SO_2 libre, la quantité de SO_2 moléculaire peut aller du simple au double en fonction du pH. La température a également un effet important.



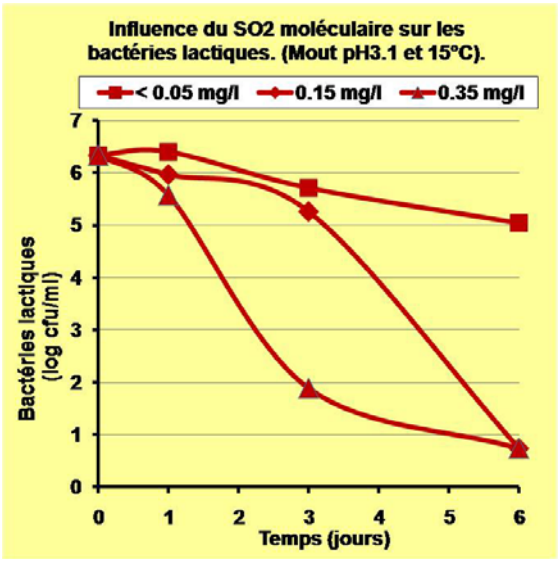


SO2 (mg/l)		SO2 moléculaire (mg/l) à 18°C				
ajouté	libre	pH3.0	pH3.1	pH3.2	pH3.3	pH3.4
20	6	0.28	0.22	0.18	0.14	0.11
30	9	0.42	0.34	0.27	0.21	0.17
40	12	0.56	0.45	0.36	0.29	0.23
50	15	0.70	0.56	0.45	0.36	0.29
60	18	0.84	0.67	0.54	0.43	0.34

En théorie, la limite acceptable pour les bactéries lactiques est de 0,3 mg/l de SO_2 moléculaire.
Par exemple : avec un sulfitage à 5 g/hl soit environ 15 mg/l de SO_2 libre si le vin a un pH inférieur à 3,4, les bactéries lactiques ne survivent pas.



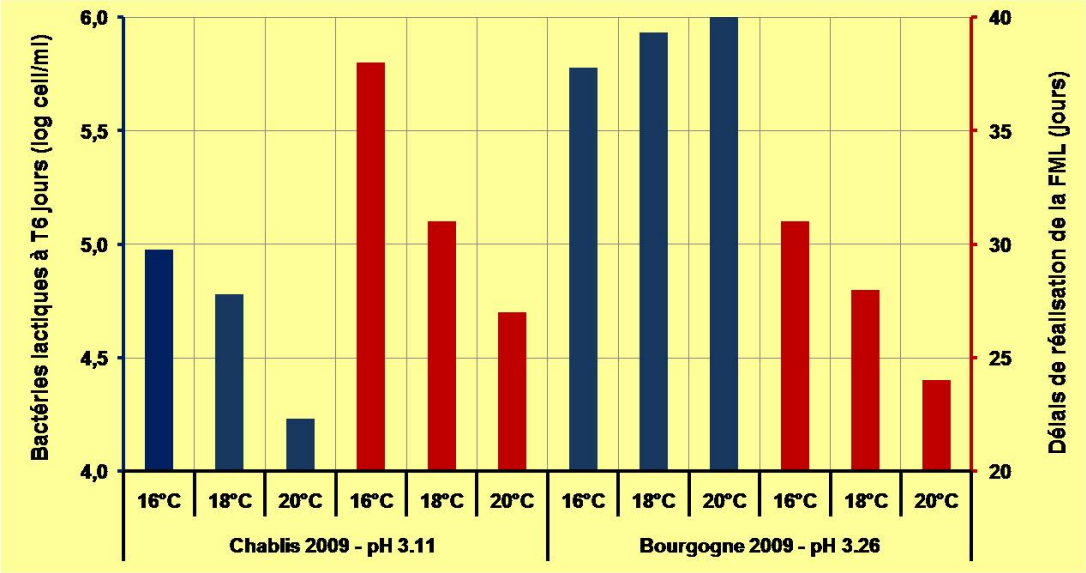
Le SO_2 libre dépend du débourbage et de la quantité de SO_2 ajoutée au départ. Dans cet exemple, le sulfitage initial est de 4 g/hl et 8 g/hl. Post débourbage, il reste 25 % du SO_2 ajouté sous forme libre dans le cas du sulfitage à 4 g/hl et 28 % du SO_2 ajouté dans l'autre cas (8 g/hl).



Le SO_2 moléculaire a donc un impact direct sur la viabilité des bactéries lactiques même à des doses inférieures à 0,3 mg/l.
A 0,05 mg/l de SO_2 moléculaire, les bactéries se maintiennent.
A une dose de 0,35 mg/l de SO_2 moléculaire, les bactéries déclinent fortement.
A une concentration de 0,15 mg/l, contrairement à ce qu'on pourrait penser, les bactéries lactiques se maintiennent au départ puis déclinent fortement.

LE FACTEUR TEMPERATURE

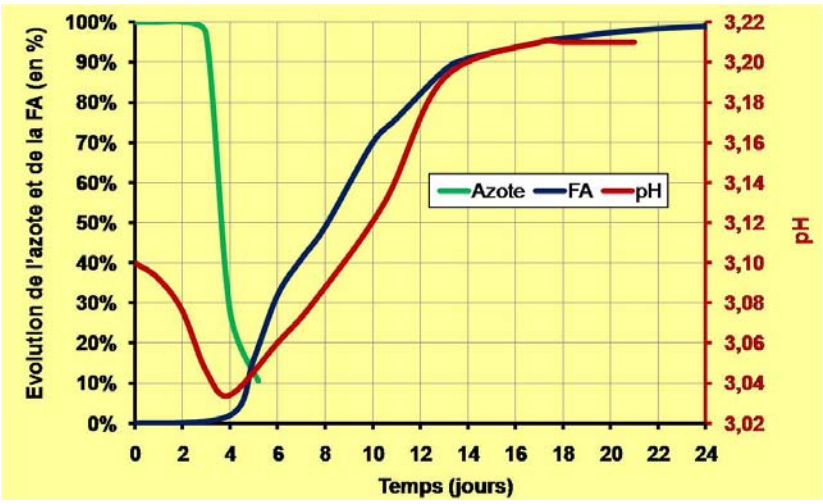
Plusieurs lots (un Chablis et un Bourgogne) sont ensemencés en bactéries lactiques en cours de fermentation alcoolique, à une densité comprise entre 1020 et 1030 et à des températures différentes. La population de bactéries ajoutée est de 10^6 bactéries/ml et elle est mesurée 6 jours après ensemencement.



Pour le vin de Chablis, avec un ensemencement à 20 °C, la population bactérienne présente au bout de 6 jours est inférieure à celle mesurée avec un ensemencement à 16 °C. L'influence de la température sur l'implantation des bactéries lactiques est importante car en faisant varier la température de 2 °C, la population présente est très différente. Les bactéries lactiques s'implantent mieux à une température fraîche dans le cas d'un moût acide. Cependant, si une température fraîche est maintenue par la suite, leur activité sera ralentie. Dans le cas où le pH est plus élevé, l'effet est inversé (exemple du Bourgogne 2009 avec un pH de 3,26).

LE FACTEUR pH

Ce dernier facteur est très important également.
L'évolution du pH au cours du temps est suivie sur un moût de Chardonnay. Le pH initial sur moût débourbé est de 3,10.

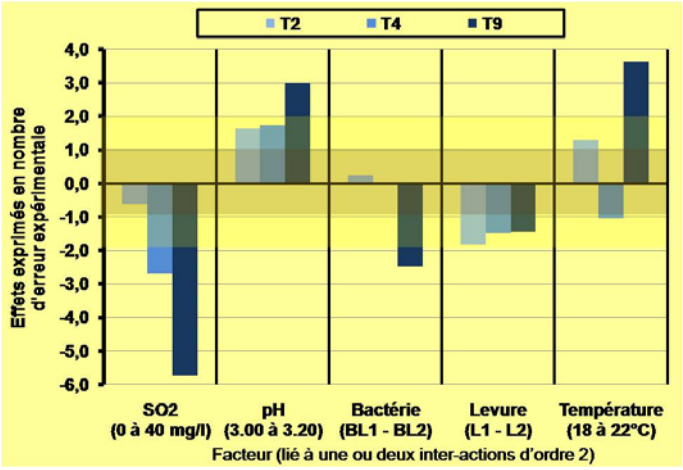


Suite au levurage, le pH diminue jusqu'à 3,03, puis il remonte pour atteindre 3,20 en fin de fermentation alcoolique.
La diminution de pH correspond à la phase de croissance et de multiplication des levures. Elles consomment les composés azotés présents dans le milieu, ce qui entraîne une diminution du pH. Puis, l'apparition d'éthanol engendre un phénomène chimique (modification des équilibres ioniques) provoquant une augmentation du pH.

Cette variation du pH au cours de la fermentation alcoolique a été montrée dans la thèse de H. Akin (directeur : P.Strehaino).

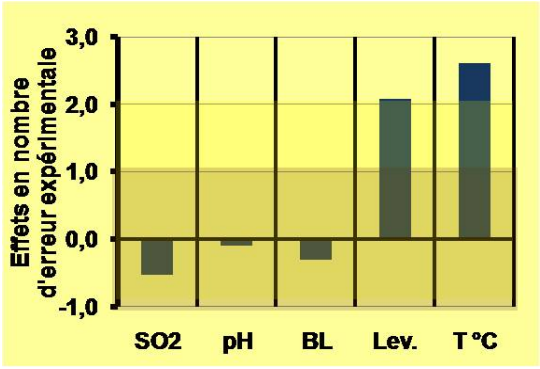
FACTEURS COMBINES

Sur un moût de Chardonnay, les effets de différents facteurs sur la population bactérienne ont été suivis au cours du temps.



L'effet du SO_2 sur la diminution de la population bactérienne est net et augmente selon les concentrations et au cours du temps.
Le pH a un impact important également sur la population de bactéries lactiques.
Un autre facteur influant est la souche de bactérie. En effet, les souches ne se comportent pas de la même façon et sont plus au moins bien adaptées aux conditions du vin. De plus, la synergie avec la souche de levure a des conséquences sur le niveau de population de bactéries.
Comme démontré précédemment, une température « élevée » est néfaste dans un premier temps pour l'implantation des bactéries mais elle est ensuite bénéfique pour le déroulement de la fermentation malolactique.

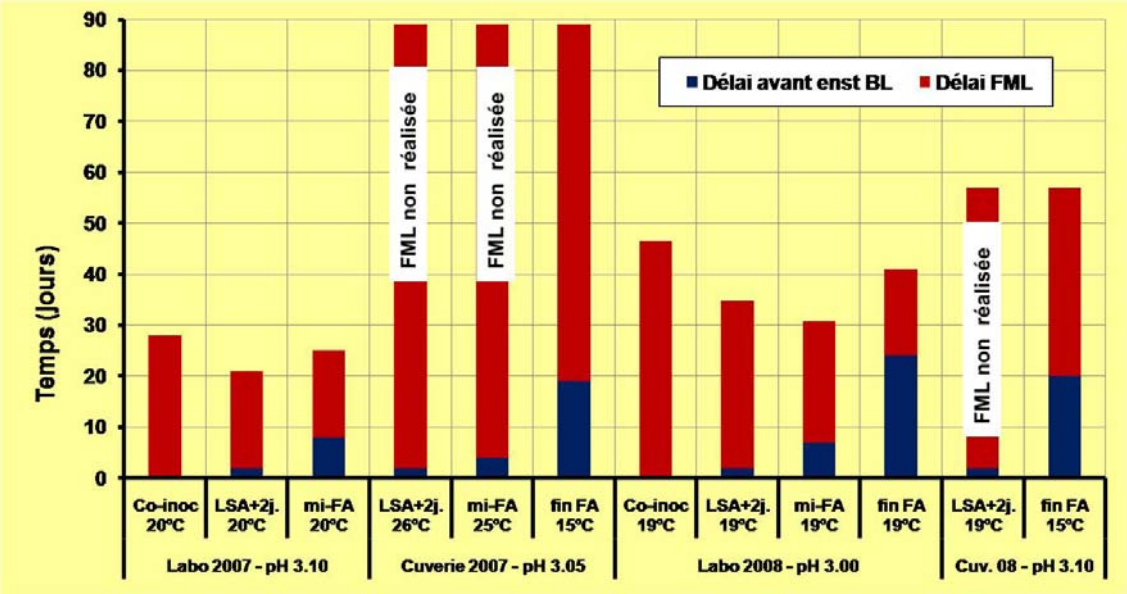
Effets de différents facteurs sur l'avancement de la fermentation malolactique à 9 jours



IMPACT DU MOMENT DE L'ENSEMENCEMENT BACTERIEN SUR LA DUREE DE LA FERMENTATION MALOLACTIQUE

Une expérimentation a été menée sur différents moûts de Chardonnay en 2007 et 2008 au laboratoire (petits volumes) et en cuverie expérimentale pour connaître les délais d'obtention de la fermentation malolactique en fonction du moment de l'ensemencement bactérien. Les moûts ont été sulfités au pressurage à 40 mg/l sauf pour l'expérimentation en cuverie en 2007 où le sulfitage a été de 50 mg/l.

Les moûts ont été ensemencés en co-inoculation stricte, deux jours après levurage, à la moitié de la fermentation alcoolique et en séquentiel à la fin de la fermentation alcoolique.

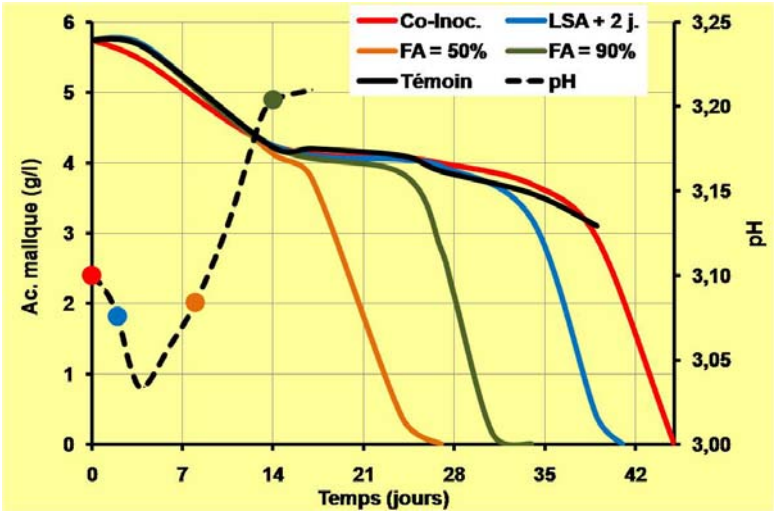


Toutes les expérimentations réalisées en laboratoire (donc en petits volumes) ont fonctionné : les fermentations malolactiques se sont réalisées.
Lors du passage en plus gros volumes, en cuverie expérimentale, seul l'ensemencement séquentiel a permis d'obtenir une fermentation malolactique du vin, les deux autres modalités d'ensemencement (2 jours après levurage et à la mi-FA) ont échoué.
Les raisons sont un pH très bas, beaucoup de SO_2 libre et une température d'ensemencement trop élevée en raison de l'absence de régulation thermique à cette époque en cuverie.

En 2008, le constat est identique. Alors qu'un ensemencement bactérien deux jours après levurage permettait d'obtenir les meilleurs résultats au laboratoire, la fermentation alcoolique ne s'est pas faite en cuverie expérimentale. En effet, ce type d'ensemencement correspond au moment où le pH diminue dans le vin et donc les conditions deviennent moins favorables pour l'implantation des bactéries.

Il faut attendre que le SO_2 libre soit combiné par les levures et la remontée de pH pour que les conditions soient propices à l'implantation des bactéries, ou attendre la fin de la fermentation alcoolique…

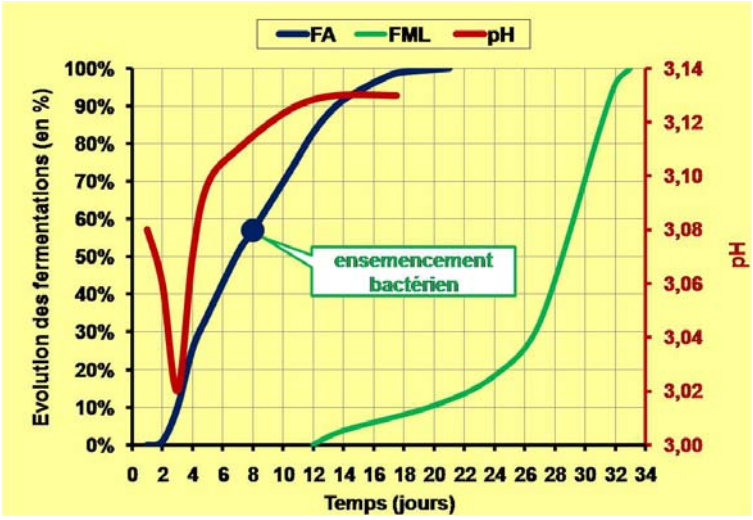
Pour confirmer cette observation sur le pH, des ensemencements bactériens ont été réalisés à différents moments et le pH a été suivi en parallèle, en 2009.



Dans les conditions de laboratoire, l'ensemencement bactérien à la moitié de la fermentation malolactique apparaît comme la modalité la plus efficace, alors que les ensemencements plus précoces ont moins réussi.
Le positionnement de l'ensemencement bactérien est très important pour la réussite de la fermentation malolactique.

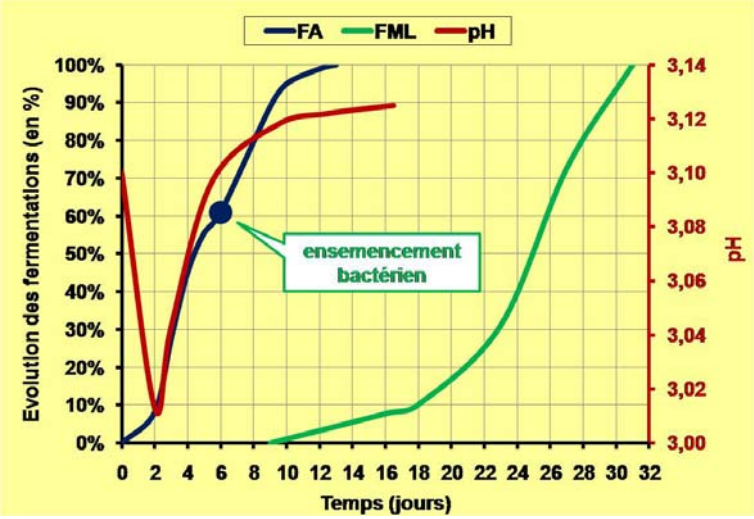
Le même protocole expérimental a été transposé en cuverie sur un Hautes Côtes de Beaune 2009 et un Chablis 2009. Les vins ont été sulfités à 40 mg/l et la régulation thermique a été maintenue à 18 °C.

Chardonnay – Hautes Côtes de Beaune 2009



La diminution puis la remontée du pH sont clairement visibles sur le graphique. L'ensemencement bactérien a été réalisé à 60 % de la fermentation alcoolique, c'est-à-dire entre le 12ème et le 14ème jour. La fermentation malolactique s'est ensuite faite en un mois. Les deux fermentations se sont déroulées parallèlement.

Chardonnay – Chablis 2009



Les mêmes observations ont été faites pour ce vin. En maîtrisant la température et le sulfitage ainsi que le positionnement dans le temps de l'ajout des bactéries, l'ensemencement bactérien pendant la fermentation alcoolique est efficace sur vins blancs.

CONCLUSIONS

MISE EN ŒUVRE DE L'ENSEMENCEMENT BACTERIEN PRECOCE (CO-INOCULATION OU PENDANT LA FERMENTATION ALCOOLIQUE)

- Moûts favorables aux bactéries : peu ou pas de SO_2, pH élevé, vinification en rouge.
  - ➔ La co-inoculation et l'ensemencement précoce sont envisageables.
  - ➔ Adapter la dose de bactéries en fonction de la situation.

- Moûts défavorables aux bactéries : SO_2 à la dose normale, pH bas, vinification en blanc.
  - ➔ Choisir une biomasse bactérienne adaptée aux conditions.
  - ➔ Inoculer les bactéries entre la moitié et les trois quarts de la fermentation alcoolique.
  - ➔ Réguler la température à environ 18 °C pendant la fermentation malolactique et 16 °C ensuite.

INTERÊT ŒNOLOGIQUE DE L'ENSEMENCEMENT BACTERIEN PRECOCE (CO-INOCULATION OU PENDANT LA FERMENTATION ALCOOLIQUE)

OUI pour :
- Vins primeurs : mise en marché dans un délai imparti.
- Vins rouges à risques microbiologiques importants : préservation des qualités sensorielles et hygiéniques du vin.
- Vins blancs : prévention des phénomènes d'oxydation et préservation des qualités sensorielles.

NON pour :

- Vins rouges à risques microbiologiques modérés : l'ensemencement après décuvage, associé à une température fraîche, est alors conseillé. L'intérêt d'une première phase d'élevage sans SO_2 est préservé, en assurant une maîtrise des risques microbiologiques.

LE CHOIX DE LA BIOMASSE BACTERIENNE A UTILISER EST ESSENTIEL

L'Institut Français de la Vigne et du Vin sélectionne des souches de bactéries lactiques et développe des biomasses en partenariat avec les fabricants et distributeurs.
Les biomasses utilisées pour les travaux présentés sont : Lalvin 31, Vitilactic F et FML Expertise S pour les rouges ; et Vitilactic H^+ pour les blancs.

BACTERIES MALOLACTIQUES : DE NOTRE PRODUCTION A VOTRE PRODUIT

Sybille Krieger-Weber
Magali Déléris-Bou
Lallemand

LES BACTERIES DU VIN

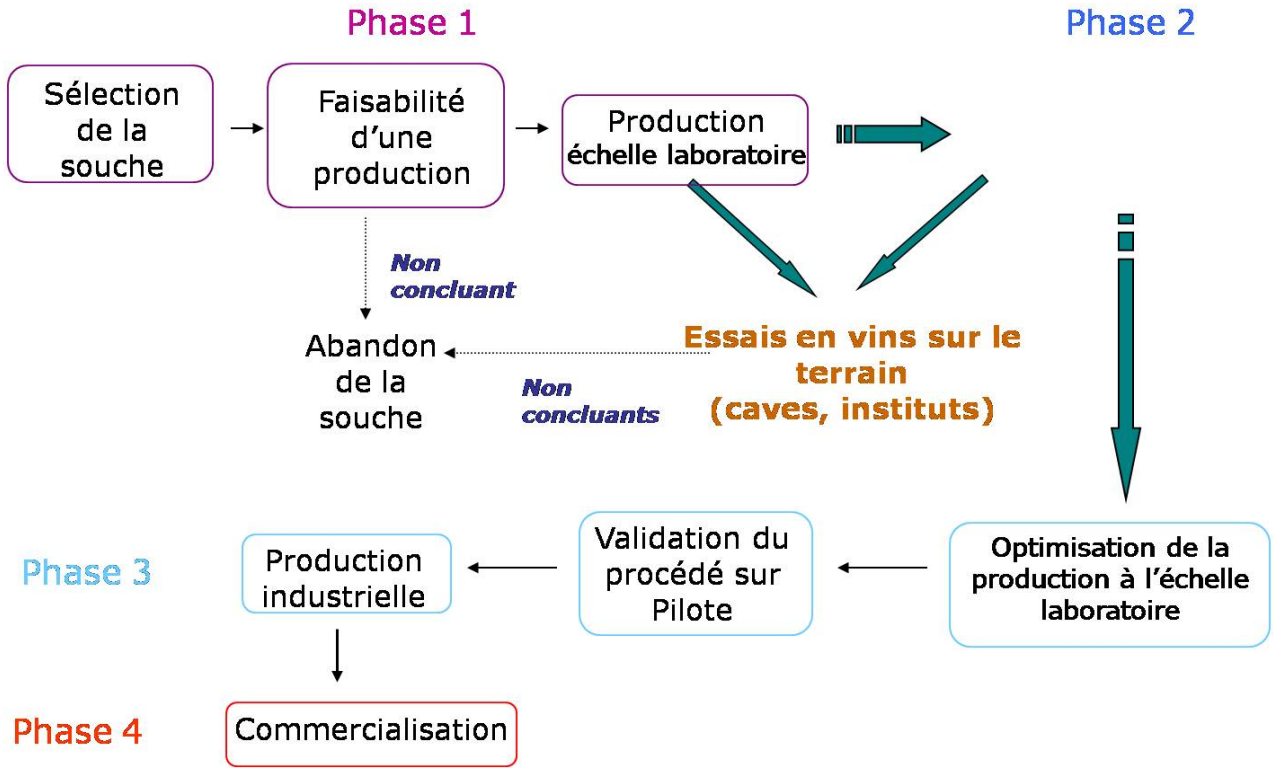
Les bactéries lactiques présentes dans le vin sont nombreuses. On dénombre 4 genres et 9 espèces identifiées (Wibowo et al., 1988, Davis et al., 1988).

Genre	Espèces
Oenococcus	*Oenococcus oeni*
Pediococcus	*Pediococcus damnosus* *Pediococcus pentosaceus* *Pediococcus parvulus*
Leuconostoc	*Leuconostoc mesenteroides*
Lactobacillus	*Lactobacillus brevis* *Lactobacillus hilgardii*
	Lactobacillus casei *Lactobacillus plantarum*

La bactérie la mieux adaptée pour la réalisation de la fermentation malolactique est *Oenococcus oeni* qui est la souche commercialisée.

LES ETAPES DE DEVELOPPEMENT D'UN FERMENT MALOLACTIQUE

SCHEMA D'ETUDE D'UNE SOUCHE



Il y a tout d'abord un travail très important de sélection de la souche. L'IFV, par exemple, sélectionne une souche de bactéries puis elle est envoyée au laboratoire où elle subit un test de lyophilisation pour évaluer la faisabilité d'une production industrielle de cette souche. A ce stade, de nombreuses souches sont écartées car il est impossible de les produire à grande échelle.

Si le test est concluant, la souche est produite à l'échelle du laboratoire. Elle est ensuite testée sur vins en caves et avec des instituts partenaires. Cela permet de confirmer l'efficacité de la souche.

- Fermenteur de 2 litres
- Dose obtenue correspondant au traitement d'un volume de vin de 5 à 10 hl.
- Premiers essais de terrain (instituts / universités / caves)

Si l'efficacité de la souche est avérée, la production en laboratoire est optimisée puis la production passe en plus grand volume sur un procédé pilote.

- Fermenteur de 80 litres
- Dose obtenue correspondant au traitement d'un volume de vin de 250 à 400 hl.
- Essais de terrain plus larges (instituts / universités / caves)

Enfin, la production industrielle permet la commercialisation de la souche.

- Fermenteur de 20 000 litres
- Production industrielle
- Process d'adaptation à l'environnement

- Centrifugation en continu

Le but de cette étape de centrifugation est de concentrer la biomasse afin de la récupérer.

- Lyophilisation

Le but de cette étape de lyophilisation est de sécher la biomasse pour obtenir une poudre stable facile à réhydrater et permettant un stockage dans le temps.

La sélection de souches est faite par des partenaires de la société Lallemand :

- L'IFV de Beaune avec les souches : Vitlactic F, Vitilactic H +, Expertise S, Lalvin 31….
- Université San Michele en Italie : Extraflore R

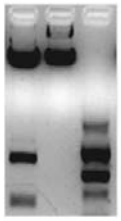
Lallemand a également participé au programme européen CRAFT (1999-2001) et possède une collection de 90 souches d'*Oenococcus oeni.* Environ une quinzaine de souches sont commercialisées, ex : Lalvin VP41, Enoferm Beta

ISOLEMENT / COLLECTION

Il s'agit d'une étape importante où la caractérisation génétique de la souche est réalisée afin de vérifier que celle-ci n'est pas déjà présente en collection. Si tel n'est pas le cas, la souche est mise en collection. Elle est conservée sous forme de cryotubes à - 80 °C et dans des ampoules lyophilisées conservées à 4 °C.

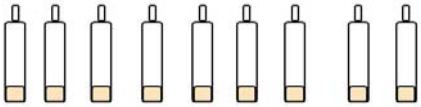
Isolement

Culture en milieu nutritif



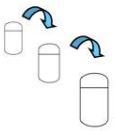
Profil génétique
RAPD-PCR (M13 ou M14)
ECP (*ApaI*, *NotI*, *SmaI*)

Cryotubes -80°C

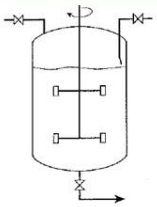


Ampoules lyophilisées 4°C

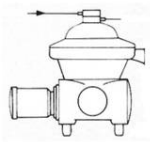
Les bactéries sont produites sous forme lyophilisée selon un process particulier.



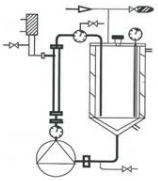
Fermentation



Séparation/ concentration



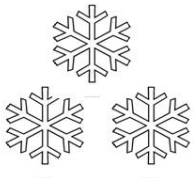
centrifugation



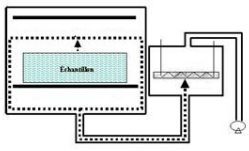
microfiltration

Cryo et lyo protection

Congélation



Lyophilisation



SPECIFICITE DU PROCESS DE PRODUCTION MBR® (BACTERIES A INOCULATION DIRECTE)

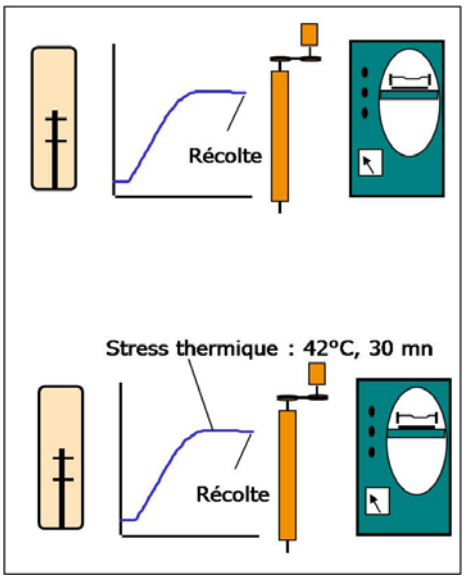
Le procédé de fabrication joue un rôle essentiel sur l'efficacité des bactéries dans le vin.

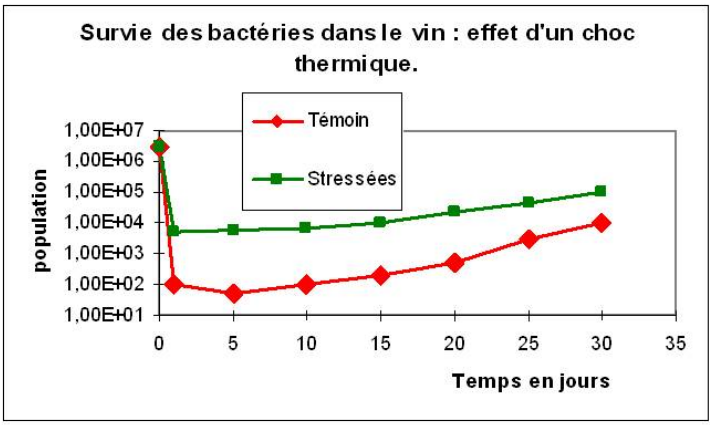
Le vin est un milieu défavorable aux bactéries lactiques :

CONDITIONS DU VIN	CONDITIONS OPTIMALES DE CROISSANCE
pH : 2,9 à 3,7	pH : 4,5 à 5,5
Alcool : 10 à 15% (v/v)	Alcool : 0% (v/v)
SO_2 Total : 0 à 100 mg/l	SO_2 Total : 0

La solution est d'acclimater les bactéries pendant leur production. L'application d'un stress pendant la phase de production entraîne des modifications au niveau cellulaire, ce qui permet aux bactéries de s'adapter aux conditions du vin.

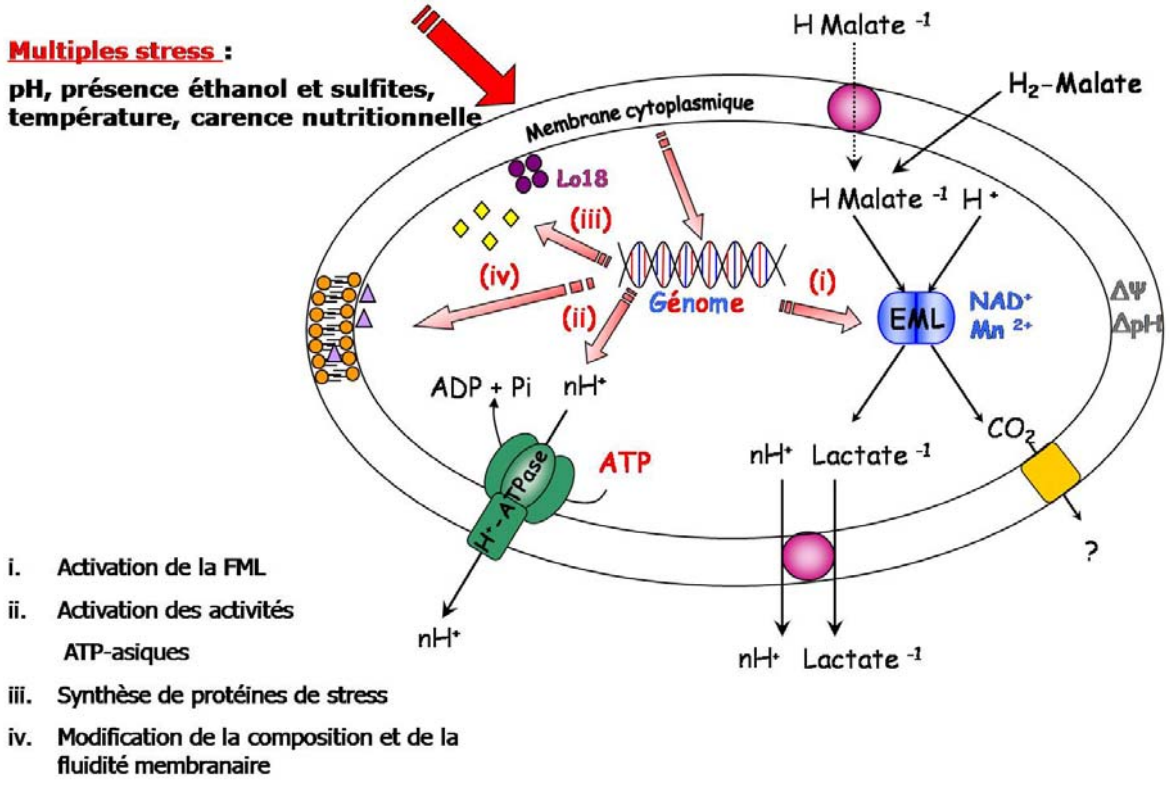
<u>Effet d'un stress thermique pendant la production des bactéries sur leur survie ensuite dans le vin :</u>



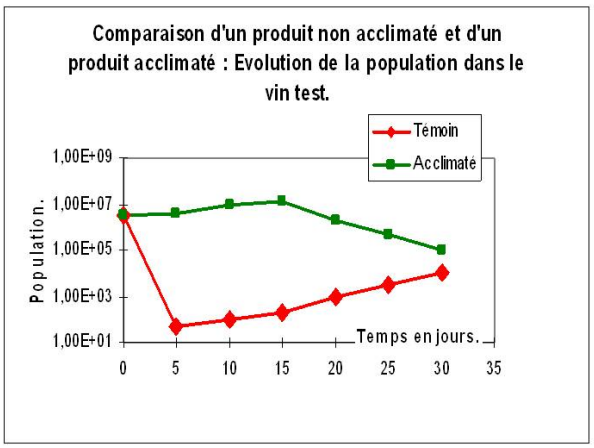


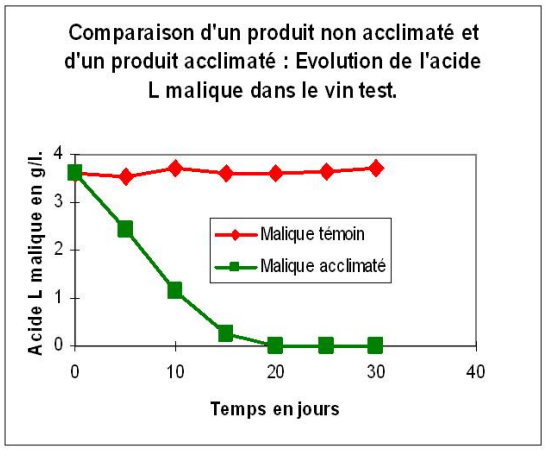
Les bactéries soumises à un stress thermique pendant leur production s'adaptent mieux dans le vin et les niveaux de population mesurés au cours du temps sont supérieurs à ceux des bactéries produites sans stress. L'implantation et la survie des bactéries sont donc meilleures.

Mécanismes impliqués dans la réponse au stress de *Oenococcus oeni* :
(Desroche et al. – 2004 - Université de Bourgogne)



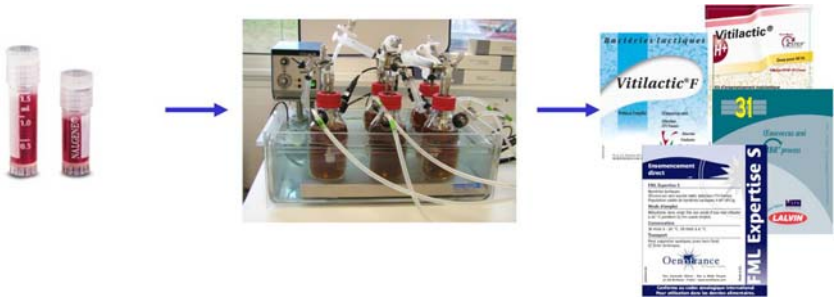
Pour avoir la meilleure acclimatation possible, une combinaison de stress est appliquée aux bactéries durant la phase de production. Les bactéries issues de ce process ont une très bonne viabilité dans le vin et permettent une fermentation malolactique rapide.





Pour permettre la production industrielle de ce type de bactéries, une étude de faisabilité industrielle est faite. Un screening en petits volumes (500 ml) est réalisé et les critères suivis sont la productivité / activité malolactique après lyophilisation.

Toutes les souches ne peuvent pas être produites selon ce procédé pour ensemencement direct. Environ 60 % des souches peuvent être produites ainsi.

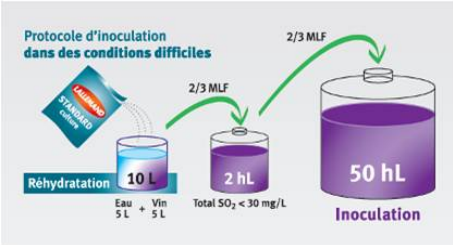


LES TYPES DE PRODUITS EXISTANTS

Il existe différentes formes de ferments malolactiques sur le marché :

« Standard »

	Atouts	Contraintes
Standard	■ Adapté aux conditions physico-chimiques très difficiles ■ Coût moindre	■ Mise en œuvre contraignante ■ Peu de souches disponibles



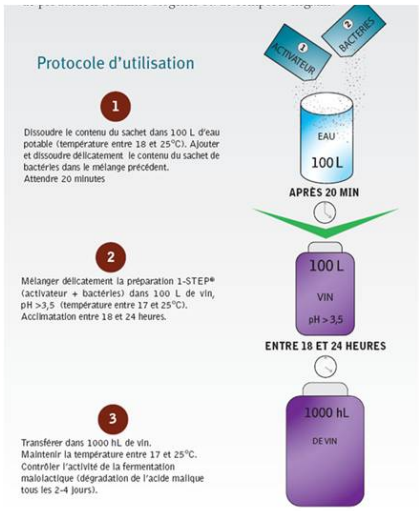
MBR ou « Microbes be ready » ou inoculation directe

	Atouts	Contraintes
MBR ®	■ Utilisable en co-inoculation ■ Diversité des souches disponibles et des apports sensoriels ■ Facilité d'utilisation	■ Spécifiques à chaque souche ■ Coût plus élevé que les 2 autres formes. ■ Peut ne pas convenir aux cas les plus difficiles.

- Peut être adaptée aux températures basses (13 à 24 °C) et aux pH bas.
- Et aux forts degrés alcooliques.

One step

Issue d'un process de production simplifié, la préparation se compose d'un sachet de bactéries lyophilisées et d'un activateur. Ces bactéries finissent leur acclimatation en cave grâce à une phase de réhydratation en présence de l'activateur. C'est une solution à mi-chemin entre la forme standard et la forme MBR. Elle est également intermédiaire en termes de coût, de facilité d'utilisation et d'adaptation aux conditions difficiles.



	Atouts	Contraintes
1-Step ®	■ Adapté aux conditions difficiles ■ Facilité de mise en œuvre ■ Utilisable en co-inoculation ■ Coût moindre que le MBR®	■ Dernière étape d'acclimatation à effectuer en cave

La société Lallemand dispose de 3 sites de production de bactéries dans le monde dont un en France : Montréal (Canada), Milwaukee (USA) et Saint-Simon-Aurillac (France).

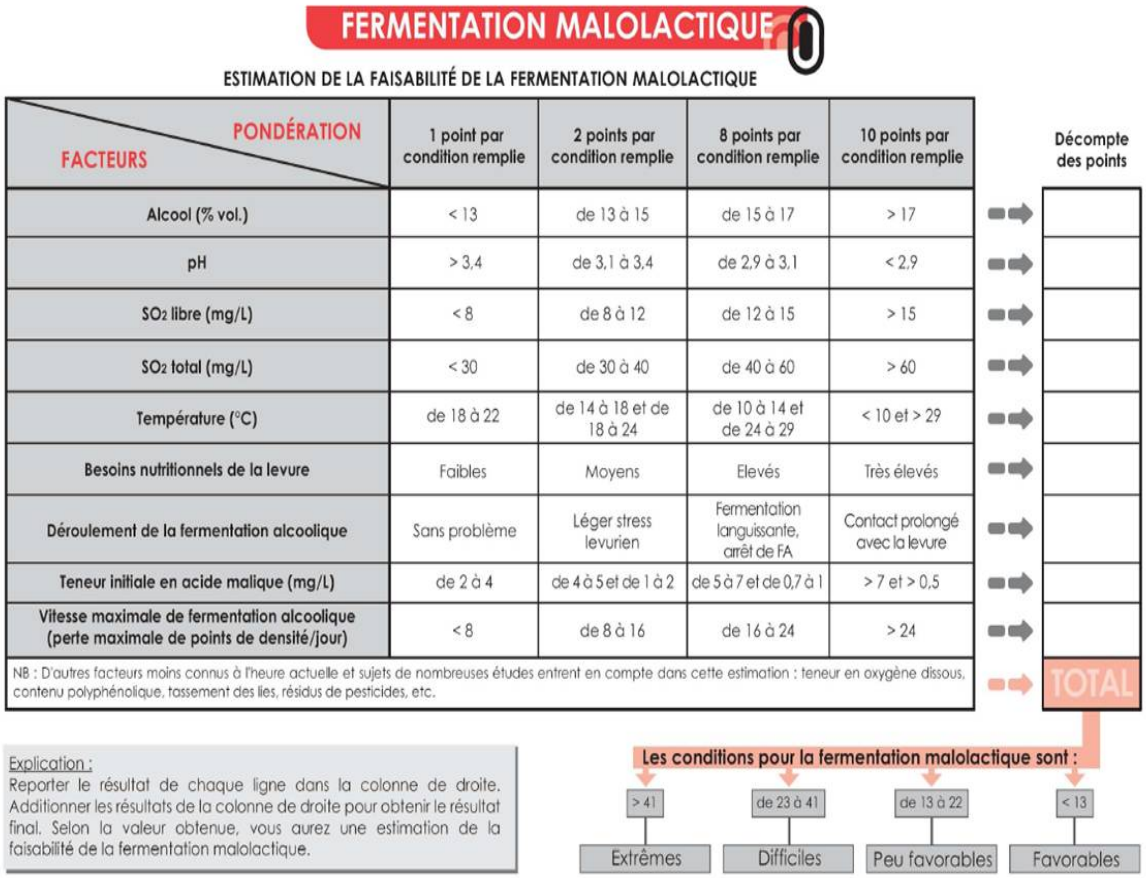
Toutes les informations, les types de ferments commercialisés et les process de fabrication sont accessible sur le site de la société :
http : //stsimon.lallemand.com/ tour_coeno.htm

LES INTERACTIONS LEVURES / BACTERIES

Il est nécessaire d'évaluer la faisabilité de la fermentation malolactique en fonction des conditions du milieu afin de pouvoir correctement choisir la souche de bactéries.

Pour ce faire, Lallemand a développé une grille de notation.

Il y a deux types de facteurs influençant la fermentation malolactique : les facteurs environnementaux et les facteurs liés à la levure et au déroulement de la fermentation alcoolique.



FERMENTATION MALOLACTIQUE

ESTIMATION DE LA FAISABILITÉ DE LA FERMENTATION MALOLACTIQUE

FACTEURS / PONDÉRATION	1 point par condition remplie	2 points par condition remplie	8 points par condition remplie	10 points par condition remplie	Décompte des points
Alcool (% vol.)	< 13	de 13 à 15	de 15 à 17	> 17	
pH	> 3,4	de 3,1 à 3,4	de 2,9 à 3,1	< 2,9	
SO_2 libre (mg/L)	< 8	de 8 à 12	de 12 à 15	> 15	
SO_2 total (mg/L)	< 30	de 30 à 40	de 40 à 60	> 60	
Température (°C)	de 18 à 22	de 14 à 18 et de 18 à 24	de 10 à 14 et de 24 à 29	< 10 et > 29	
Besoins nutritionnels de la levure	Faibles	Moyens	Elevés	Très élevés	
Déroulement de la fermentation alcoolique	Sans problème	Léger stress levurien	Fermentation languissante, arrêt de FA	Contact prolongé avec la levure	
Teneur initiale en acide malique (mg/L)	de 2 à 4	de 4 à 5 et de 1 à 2	de 5 à 7 et de 0,7 à 1	> 7 et > 0,5	
Vitesse maximale de fermentation alcoolique (perte maximale de points de densité/jour)	< 8	de 8 à 16	de 16 à 24	> 24	
NB : D'autres facteurs moins connus à l'heure actuelle et sujets de nombreuses études entrent en compte dans cette estimation : teneur en oxygène dissous, contenu polyphénolique, tassement des lies, résidus de pesticides, etc.					TOTAL

Explication :
Reporter le résultat de chaque ligne dans la colonne de droite. Additionner les résultats de la colonne de droite pour obtenir le résultat final. Selon la valeur obtenue, vous aurez une estimation de la faisabilité de la fermentation malolactique.

Les conditions pour la fermentation malolactique sont :

> 41	de 23 à 41	de 13 à 22	< 13
Extrêmes	Difficiles	Peu favorables	Favorables

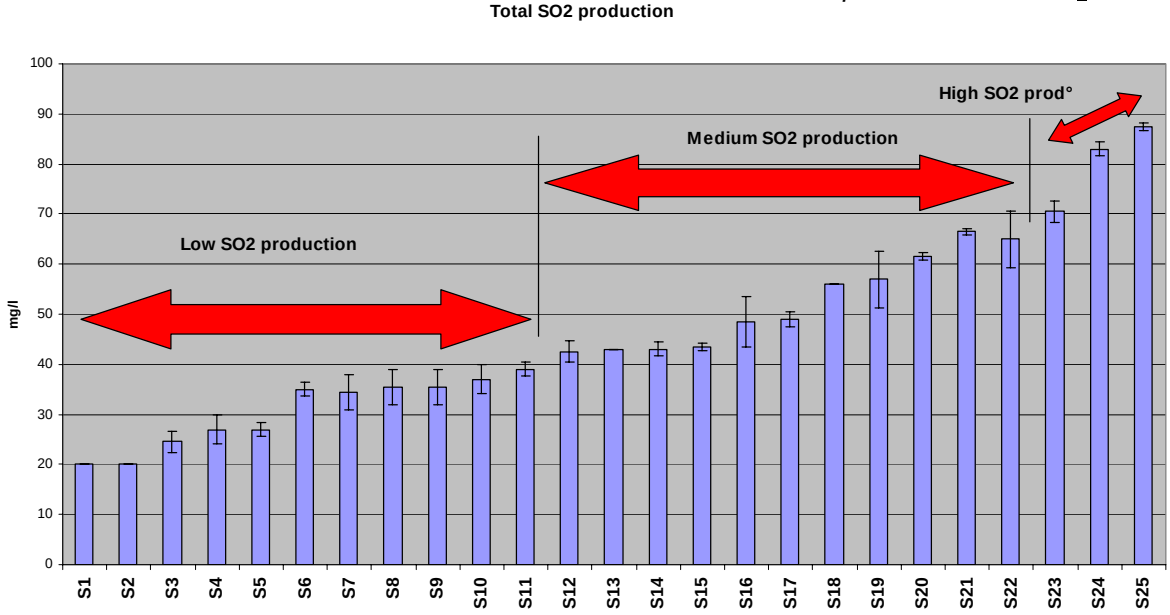
INHIBITION DES BACTERIES LACTIQUES PAR LES LEVURES

Bon nombre de composants produits par les levures empêchent le développement des bactéries lactiques :

- L'éthanol

- Le SO_2
  - Le niveau de SO_2 dans les vins vient des apports effectués dans le moût et de la production de SO_2 par les levures. La quantité de SO_2 produite dépend de la souche de levure et des conditions.
  - Le SO_2 est décrit comme un des facteurs majeurs de l'inhibition de la fermentation malolactique (Henick-Kling and Park, 1994).
  - La plupart des souches de levures produisent des niveaux de SO_2 inférieurs à 30 mg/l bien que certaines souches puissent en produire plus de 100 mg/l (Rankine and Pocock, 1969 ; Eschenburg, 1974, Dot et al., 1976 ; Suzzi et al., 1985)

Classification des levures Lallemand en fonction de la production de SO_2



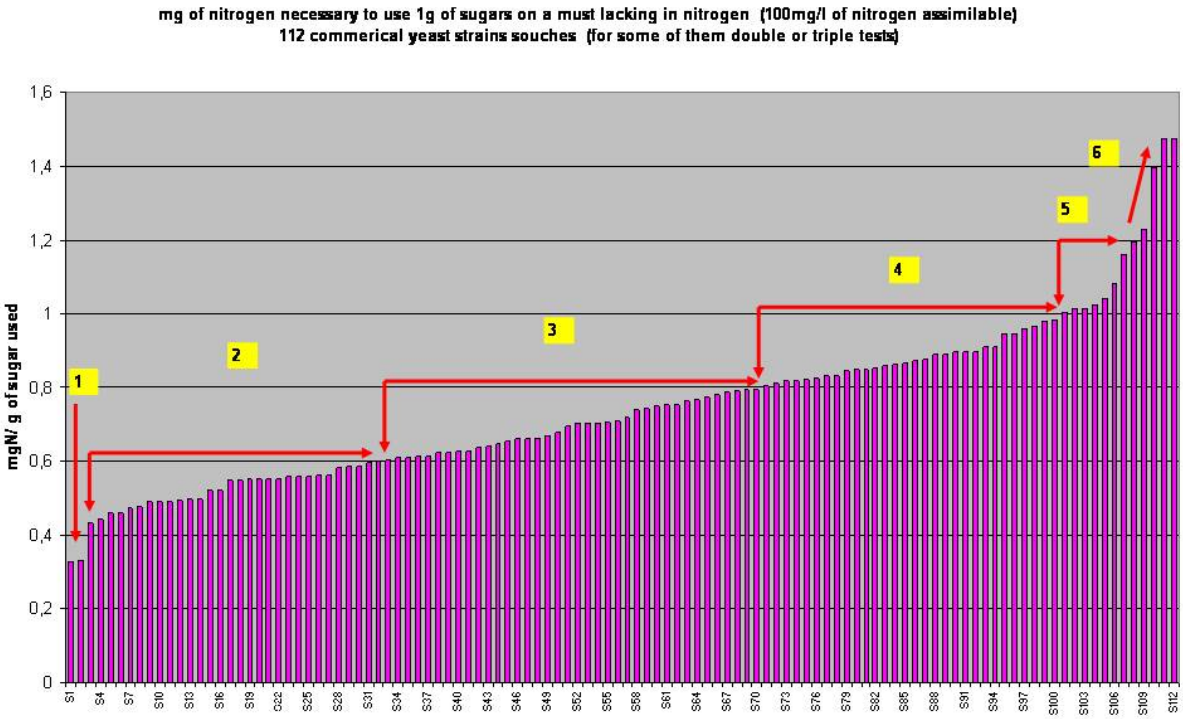
- Les acides gras à moyennes chaînes (C10, C12)
  - Ces acides gras sont toxiques pour les bactéries lactiques.
  - Ils limitent la croissance bactérienne.
  - Ils réduisent la capacité des cellules bactériennes à métaboliser l'acide malique.

- Les peptides ou protéines antibactériens
  - Isolement de deux protéines cationiques de *Saccharomyces cerevisiae* inhibitrices des bactéries lactiques (Dick et al, 1992)
  - Inhibition des bactéries malolactiques par un composant produit par *Saccharomyces cerevisiae* sensible à la température et à une protéase (Etude de Comitini et al, 2005).
  - Inhibition de la fermentation malolactique par une substance (peptide) sensible à une protéase (Osborne et al., 2006)
  - Impact of the co-culture of *Saccharomyces cerevisiae – Oenococcus oeni* on malolactic fermentation and partial characterization of a yeast-derived inhibitory peptidic fraction (N. Nayme, F. Mathieu, P. Taillandier, Université de Toulouse, 2010)

- D'autres facteurs moins connus comme le 2-phénylethanol, l'acide succinique
  - 2-phénylethanol : inhibiteur de la FML ? C'est un alcool supérieur produit par la levure en quantités très variables et dépendantes de la souche de levure (entre 20 et 208 mg/l (Wagner et Rapp, 1999). Sa production est élevée chez les levures cryotolérantes (*Saccharomyces cerevisiae uv*.) (Carridi and Corte, 1997).
  - Acide succinique : inhibiteur de la FML ? Les levures cryotolérantes ont une production élevée (Carridi and Corte, 1997). En combinaison avec le 2-phénylethanol, il peut être responsable de la difficulté à induire la fermentation malolactique dans des vins fermentés avec des levures cryotolérantes.

Une étude est en cours sur ces facteurs à l'Université de Dijon (IUVV – Michèle Guilloux Bénatier / Hervé Alexandre).
De plus, les levures pour leur développement épuisent le milieu en nutriments tels que les acides aminés ou les vitamines.

Classification des levures Lallemand en fonction de leur besoin en azote.



STIMULATION DES BACTERIES LACTIQUES PAR LES LEVURES

Les levures n'ont pas qu'un effet négatif sur les bactéries lactiques, elles peuvent également les stimuler.

Elles augmentent le niveau d'azote (acides aminés et peptides), grâce à leur capacité autolytique et leurs activités protéases. Ce paramètre dépend de la souche de levure (Feuillat et al., 1985 ; Henschke and Jiranek, 1993).

Elles produisent des macromolécules (mannoprotéines et glucanes) qui adsorbent les acides gras à moyennes chaînes. Elles protègent également contre les structures polyohénoliques fortes. De plus, l'hydrolyse des mannoprotéines par les bactéries lactiques permet d'enrichir le milieu en nutriments.

Classement des souches de levures Lallemand en fonction de leur compatibilité avec les bactéries lactiques.

CATÉGORIE	NIVEAU COMPATIBILITÉ FML
1 (--)	Non recommandé
2 (-)	Plutôt défavorable
3 (+/-)	Neutre
4 (+)	Favorable
5 (++)	Très favorable

BOURGOGNES

Bureau Interprofessionnel des Vins de Bourgogne

Pôle Technique et Qualité du BIVB
CITVB
6 rue du 16e chasseurs
21 200 Beaune

Tél. : 03 80 26 23 74 - Fax : 03 80 26 23 71
technique@bivb.com