LA BIBLIOTHEQUE R&D DEMPTOS
www.demptos.fr
Publications scientifiques et techniques

ETUDES SUR LA FERMENTATION MALOLACTIQUE DES VINS ROUGES EN BARRIQUES ET EN CUVES

N. VIVAS 1, L. BELLEMERE 2, Aline LONVAUD-FUNEL 2, Y. GLORIES 2, Monique AUGUSTIN 2
1) Tonnellerie DEMPTOS détaché à l'Institut d'œnologie, Université de Bordeaux II. 351 cours de la libération, 33405 TALENCE
2) Institut d'œnologie Université de Bordeaux II, 33405 TALENCE

Texte d'un exposé présenté à Santiago (Chili) pour le VI° congrès Latino-Americano de viticulture et d'œnologie, (21-25 novembre 1994)

La fermentation malolactique (FML) est une étape microbiologique normale de la vinification en rouge [1], elle se déroule après la fermentation alcoolique sous l'action de bactéries lactiques ; Dans les vins elle est généralement réalisée par *Leuconostoc œnos*, coque hétérofermentaire [2]. Au cours de la FML l'acide malique est décarboxylé en acide lactique sous l'action de l'enzyme malolactique [3]. L'acide citrique est également plus ou moins dégradé, conduisant à de l'acide acétique et à des composés acétoïniques [4, 5]. Il résulte de cela, essentiellement, une diminution de l'acidité totale due à la transformation d'un diacide en monoacide carboxylique, et à une légère augmentation de l'acidité volatile. L'ensemble des transformations aboutit à un assouplissement du vin à la fois par la perte du caractère acerbe de l'acide malique, par la diminution de l'acidité et la libération de polysaccharides pariétaux (glycoprotéines, [6]). Egalement, on constate une modification importante des caractères aromatiques [7, 8] et gustatifs [6] des vins. La FML conduit donc à de profondes modifications de la composition et de la qualité des vins rouges.

Actuellement, on a coutume de réaliser la FML soit en cuves soit en barriques. Mais l'origine de ces deux techniques reste intimement liée à la connaissance du processus de FML et à son assimilation dans les pratiques œnologiques courantes. Ainsi, avant les années 60 la fermentation malolactique passait inaperçue, elle était inconnue et se déclenchait le plus souvent au printemps à la faveur d'un réchauffement des chais, on disait que "le vin travaille".

De plus, les conclusions de Pasteur, à la suite de ses études sur le vin [9], considérant que les levures font le vin et les bactéries le détruisent, ont longtemps constitué un frein au progrès scientifique dans ce domaine [10]. Après les années 60, les travaux de la Station Agronomique et Œnologique de Bordeaux ont permis de montrer que la FML est un phénomène spontané, qu'il convient de déclencher le plus tôt possible après l'achèvement de la fermentation alcoolique, indispensable à la production des vins rouges de garde [10, 11, 12]. Simultanément, à la même époque, se sont développées les cuves en béton et en acier, puis plus tard des cuves inox et en matière plastique. Dans le même temps, les conditions d'hygiène se sont généralisées avec l'avènement d'une microbiologie œnologique et la maîtrise du sulfitage [10]. Ainsi on a séparé les processus fermentaires des étapes d'élevage des vins rouges.
Dans le Bordelais la FML se déroulait le plus souvent en cuve de grande capacité. Le vin n'était entonné qu'après achèvement complet de ces processus fermentaires et après ajustage de la teneur en SO_2 libre. Cependant dans d'autres régions viticoles françaises la FML en barrique a perduré. C'est le cas de la Bourgogne, pour laquelle la petite taille des propriétés, donc le plus faible volume de vin, a permis de conserver cette tradition, tout en appliquant un contrôle rigoureux de chacune des barriques au cours de la FML.

La comparaison organoleptique des vins rouges issus de la FML en cuves et en barriques a donné des résultats souvent en faveur des FML en barriques [13].
Ces caractères, confirmés après 2 ou 3 ans de conservation en bouteilles, ont suscité ces dernières années un engouement pour cette technique, prenant actuellement une place de plus en plus importante dans la production de vins rouges de différentes appellations du Bordelais. On retrouve dans d'autres pays viticoles le souhait de l'appliquer pour des vins de haut de gamme ; parmi ces pays les Etats-Unis (Californie, Orégon), le Chili, l'Afrique du sud (le Cap) et l'Espagne (Rioja, Ribero de douero) sont en bonne place. C'est donc pour répondre à ce nouveau problème que des travaux ont débuté dans ce domaine. Les résultats des dégustations montrent généralement qu'à la suite d'une FML en barriques le vin parait plus souple, plus gras, plus ample, ses caractéristiques aromatiques ont été modifiées, le vin est totalement restructuré et parait mieux adapté à l'élevage ultérieur en barriques. Le vin évolue plus lentement se charpente et s'arrondi, et les caractères asséchants perceptibles dans les premiers mois de barriques sont largement atténués.
Ces observations empiriques suggèrent que les bactéries ne jouent pas seulement un rôle de désacidifiant naturel, mais qu'elles interviennent également sur les éléments responsables de la saveur et des propriétés gustatives des vins que sont les composés phénoliques.

C'est à Saraïva [14] que l'on doit les premiers travaux sur les relations entre les bactéries lactiques, les levures et les composés phénoliques des vins. Il a été montré que les composés phénoliques, tel que les acides phénols et les procyanidines, inhibent le développement des bactéries, au contraire de la malvidine qui semble être stimulante. Feuillat *et al.* [15] mettent à jour une relation négative entre le nombre de cellules viables d'une population de bactéries lactiques et la concentration en

composés phénoliques. Augustin [6], étudie l'influence de la FML sur les composés phénoliques des vins rouges, et montre en particulier que la FML augmente la teneur en combinaison tanins-anthocyanes des vins, diminue leur astringence et modifie sensiblement leur couleur. Nous possédons peu de travaux sur les interactions entre les composés phénoliques du vin et les bactéries lactiques. De plus, à notre connaissance les interactions entre les bactéries lactiques et les ellagitanins, solubilisables au cours de la FML en fûts neufs, n'ont jamais été étudiées.

Ce travail se propose d'étudier l'influence du contenant (bois ou inox) sur le déroulement de la FML et sur la composition des vins et d'analyser les interactions entre les bactéries lactiques et les composés phénoliques (du raisin, du vin et du bois de chêne).

Matériel et méthodes

1 Matériel

Essais dans les chais

Les essais de FML sont réalisés en vraie grandeur sur des cuves de 50 et 100 hl en inox et en barriques neuves (barriques Bordelaise 225 l, chêne Allier, séchage naturel 24 mois, chauffe moyenne), dans des vignobles du Médoc (Cabernet Sauvignon, Merlot noir) et de St Emilion (Merlot noir). Les barriques sont disposées dans le même local que les cuves, et la température est maintenue au dessus de 19°C jusqu'au déclenchement de la FML. Elle se déroule avec les populations bactériennes indigènes. Les analyses sont pratiquées 15 jours après achèvement de la FML.

Essais au laboratoire

Les études d'interaction sont pratiquées au laboratoire, en conditions contrôlées sur *Leuconostoc oeno* souche IOEB 8413

Origine des extraits végétaux

Les extraits de pellicules sont issus de Cabernet Sauvignon et obtenus par macération de pellicules fraîches dans une solution hydroalcoolique. L'extrait obtenu est délipidé par extraction à l'hexane. La fraction contenant les anthocyanes libres a été purifiée sur colonne de pvpp dans les conditions décrites par Glories [16]. L'extrait est utilisé sous forme lyophilisée.

L'extrait de pépin est obtenu dans les mêmes conditions que pour l'extrait de pellicules. Cependant on n'utilise pas de colonne de PVPP, la fraction procyanidine étant isolée par extraction à l'acétate d'ethyle [16].

Les extraits de bois de chêne sont obtenus dans les conditions décrites par Vivas *et al.* [17].

Origine des composés phénoliques purs

La malvidine monoglucoside a été purifiée au laboratoire par HPTLC, son aglycone provient du commerce (Sarsynthèse). Les différents acides phénols utilisés sont fournis par Sigma. La castalagine et la vescalagine ont été purifiées au laboratoire par HPTLC [17] et le pentagalloylglucose nous a été fourni par Scalbert (INRA/INA Paris-Grignon).

2 Milieux et conditions de culture

Milieux de culture

Milieu utilisé pour la culture des bactéries (casamino acid, 5g; extrait de levure, 4g; KH_2PO_4, 0.55g; KCl, 0.425g; $CaCl_2$, 0.125g; $MnSO_4$, 0.025g; $MgSO_4$, 0.125g; glucose, 5g; acide DL malique, 10g; Tween 80, 1ml; pH 4.5-4.8; H_2O qsp 1000ml), milieu "A" utilisé pour le dénombrement des bactéries (extrait de levure, 5g; néopeptone, 5g; acide DL malique, 10g; $MgSO_4$, 0.05g; $MnSO_4$, 0.02g; jus de tomate, 250ml; pH 4.5-4.8; H_2O qsp 1000ml), vin déféqué utilisé pour la culture des bactéries (vin rouge de Cabernet sauvignon contenant 2.85 g d'acide malique/l et traité à raison de 8g/l de noir animal, puis filtré sur filtre sans cendre), milieu pour étudier la survie des populations bactériennes en présence de différents substrats (tampon phosphate, KH_2PO_4 0.15 M pH= 4.5). Le milieu de culture est stérilisé à l'étuve 15 min à 120 C et le vin déféqué par filtration stérile 0.45 µm.

Conditions de culture

Les cultures sont conduites en milieu calme à 25°C et à l'obscurité

3 Méthodes

Dénombrement des bactéries lactiques

Les bactéries sont dénombrées sur gélose nutritive: le milieu nutritif constitué de "A" est additionné à volume égal de gélose DIFCO (20g/l). La croissance des levures est éliminée par addition de pimaricine (0,2ml d'une solution à 5mg/ml par boîte de 10ml). La croissance des bactéries peut être suivie par mesure de la densité optique à 600nm (1 unité de DO = 1,3 . 10^9 bact./ml). Les boîtes de Petri sont incubées 5 jours à 25°C dans des jarres en anaérobiose.

Préparation de cellules non proliférantes

La biomasse nécessaire (de l'ordre de 10^9 bact./ml) est obtenue par centrifugation du milieu de culture (10 min, 10000 tpm, 4°C), elle est lavée par 10 ml de tampon phosphate et centrifugée à nouveau. La population bactérienne est ensuite reprise par 10 ml de tampon phosphate supplémenté par différents substrats phénoliques. Le nombre de bactéries viables est estimé après 1 et 2 jours d'incubation à 25°C, par comptage sur gélose.

Dosage de l'acide malique et du glucose

L'acide malique et le glucose sont dosés par voie enzymatique (Boehringer, Manheim)

Activités enzymatiques de *L. œnos*

Les activités exocellulaires totales de *L. œnos* 8413 sont révélées sur APIZYM™ (ref: 2 520 0) à partir de 65 µl d'une suspension contenant 5 . 10^9 bact./ml à pH = 5,4.

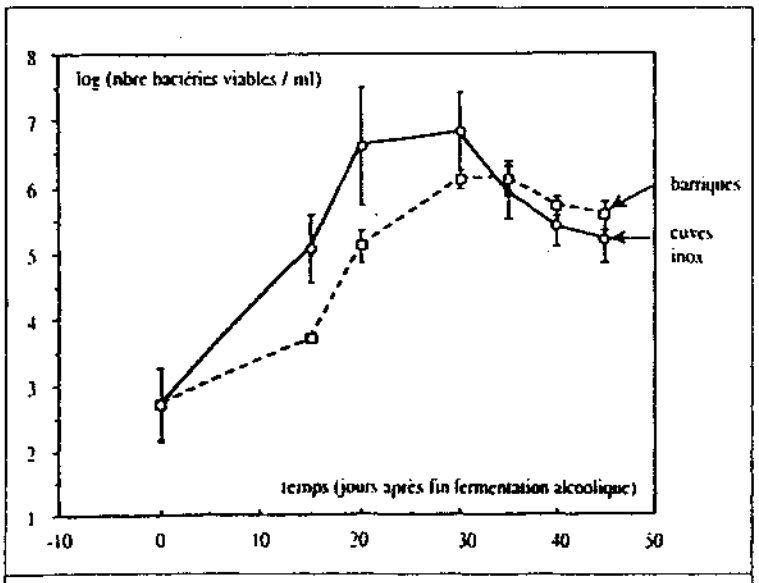


Figure n° 1 : incidence de la nature du récipient sur la croissance des bactéries lactiques indigènes des vins rouges au cours de la FML

Dosage des composés phénoliques

Nous utilisons les méthodes mises au point par Glories [16, 18]. Les composés phénoliques totaux sont estimés par la mesure de la DO 280nm [19].

Identification des produits de transformation des composés phénoliques purs

Les produits intermédiaires pouvant être libérés dans les milieux de culture sont séparés par HPLC [20, 21] ou par HPTLC [17]. L'identification se fait par comparaison des temps de rétention des produits de référence et de leurs spectres UV (250-350 nm).

Dosages classiques des vins

Les méthodes recommandées par l'OIV sont utilisées (Alcool, Acidité totale et volatile, pH, Sucres réducteurs)

Dosage des polysaccharides

Les polysaccharides acides et neutres sont isolés et dosés dans les conditions décrites par Vivas et Glories [22].

Résultats et discussion

1 Croissance des bactéries lactiques en cuves et en barriques : influence sur la composition et les qualités gustatives des vins rouges

1- Incidence de la nature du récipient sur la croissance des bactéries lactiques

Nous avons suivi sur un lot de vin de Cabernet-Sauvignon, en cuve et en barriques neuves, la population viable des bactéries lactiques après achèvement de la fermentation alcoolique. Les résultats sont rassemblés sur la fig. 1. Il convient de noter que les populations initiales moyennes sont pratiquement identiques pour les deux modes de FML.

En cuve la phase de croissance exponentielle des bactéries lactiques est plus précoce et plus rapide qu'en barriques. Egalement, la population maximale est plus élevée dans les cuves que dans les barriques. La viabilité des populations bactériennes en cuves, diminue rapidement après épuisement de l'acide malique ; au contraire en barriques les bactéries demeurent viables plus longtemps, mais la fin de la FML est aussi plus tardive. Ces résultats sont significatifs, malgré un écart à la moyenne parfois important.

Des essais réalisés sur des cuves inox de 3 hl, comparable en capacité aux barriques, montrent que les différences enregistrées, et en particulier le prolongement de la phase stationnaire en barriques, ne sont pas dues au seul "effet volume". Ces observa-

tions suggèrent l'intervention de composés du chêne solubilisés dans le vin, mais également la moins bonne inertie thermique en petit volume doit être prise en compte.

2- Influence de la FML sur la composition des vins

Le tableau 1 montre les traits classiques de la modification de composition d'un vin à la suite d'une FML en cuves et en barriques : une diminution de l'acidité totale, une augmentation du pH, une disparition complète de l'acide malique, également une légère diminution des sucres résiduels (utilisés comme source d'énergie), enfin une augmentation de l'acidité volatile probablement issue de la dégradation d'une partie de l'acide citrique. Les différences entre cuves et barriques ne sont pas significatives.

3- Incidence de la FML sur la couleur des vins et les composés phénoliques

Dans le tableau 2 sont regroupées les caractéristiques chromatiques des vins avant et après FML en cuves ou en barriques. Le témoin (avant FML) a été prélevé et analysé à l'écoulage, l'oxygénation importante du vin lors de la manipulation explique que l'intensité colorante (IC*) est plus élevée que dans les vins qui ont effectué leur FML. La FML en barriques, conduit par rapport à la cuve à une IC* plus forte (1,37 cuves< 1,44 barriques) qui se caractérise par une part de bleu plus importante (11% cuves < 13% barriques). L'analyse de l'origine de la couleur rouge (tableau 2) montre que la FML diminue sensiblement la part initiale des anthocyanes libres à la DO 520 (40% avant FML contre 25% en cuves et 16 % en barriques après FML).

La FML en cuve provoque (tableau 3) une diminution de la teneur en phénols totaux (d280), du résultat du dosage des tanins (procyanidines) et des anthocyanes. On observe également une baisse de l'astringence des tanins (indice de gélatine) et une augmentation très nette des combinaisons tanins anthocyanes (indice de pvpp). Ces résultats suggèrent que, lors de la FML, une partie des composés phénoliques précipitent ou sont dégradés (diminution de la d280 et des anthocyanes) et une autre partie subit une modification de structure.

La structure des tanins et leurs états dans le vin, est plus nettement modifiée en barriques qu'en cuves, cela se traduit par une augmentation du degré de condensation des tanins (indice d'HCl), un accroissement de leur état colloïdal (indice de dialyse) et une diminution, plus forte qu'en cuves de leur réactivité à l'égard des protéines (indice de gélatine). Enfin, on note une stabilisation plus importante en barriques qu'en cuves de la matière colorante, par combinaison des anthocyanes avec les tanins.

Tableau n° 1: Incidence de la fermentation malolactique en cuves et en barriques sur la composition des vins

	Avant FML	Après FML	
	cuves	cuves	barriques
TAV (% vol.)	12,4	12,55	12,55
pH	3,65	3,98	3,95
sucre réducteur (g/l)	1,6	1,3	1,4
Acidité totale*	3,95	2,87	2,85
Acidité volatile*	0,19	0,32	0,36
Acide malique (g/l)	2,2	0	0

*en g H_2SO_4/l

Tableau n° 2 : Influence de la FML en cuves et en barriques sur les caractéristiques chromatiques des vins

	Avant FML	Après FML	
	cuves	cuves	barriques
couleur			
IC* (1)	1,48	1,37	1,44
Teinte (2)	0,51	0,56	0,53
d420% (3)	30	34	32
d520% (4)	60	56	55
d620% (5)	10	11	13
origine de la couleur rouge			
DO 520	0,59	0,77	0,79
dA1% (6)	40	25	16
dTA% (7)	33	44	50
dTAT% (8)	27	31	34

1 : DO420 + DO520 + DO620, 2 : DO420/DO520, 3 : % de jaune, 4 : % de rouge, 5 : % de bleu dans IC*, 6 : contribution des anthocyanes libres à la DO520, 7 : contribution des combinaisons tanins-anthocyanes decolorables par SO_2 à la DO520, 8 : contribution des combinaisons tanins-anthocyanes non decolorables par SO_2 à la DO520

Tableau n° 3 : Incidence de la FML en cuves et en barriques sur les composés phénoliques des vins

	Avant FML	Après FML	
	cuve	cuve	barrique
dosage des composés phénoliques			
phénols totaux (d280)	54	51	55
procyanidines (g/l)	2,4	2,1	2,3
ellagitanins (mg/l)	-		89
anthocyanes (mg/l)	872	786	772
structure des tanins du vin			
indice de gélatine (1) (%)	54	50	45
indice HCl (2) (%)	14	17	23
indice de dialyse (3) (%)	15	15	19
état de la matière colorante			
indice de pvpp (4) (%)	46	52	56

1 : tanins astringents, 2 : degré de condensation des tanins, 3 : état colloïdal, 4 : combinaison tanins-anthocyanes

Tableau n° 4 : Incidence de la FML en cuves et en barriques sur la teneur en polysaccharides neutres (PN) et acides (PA) des vins

	Récipient de FML	
	cuves	barriques
PN libres	435	505
PN combinés	203	392
PN totaux (PNT)	638	897
% PN combinés	32	43
PA libres	72	68
PA combinés	240	227
PA totaux (PAT)	312	295
% PA combinés	77	77
PNT/PAT	2	3

(Résultats en mg/l eq. glucose pour PN et mg/l eq. ac. galacturonique pour PA)

4- Incidence de la FML en cuves et en barriques sur la teneur en polysaccharides des vins

Par rapport à une FML en cuves, la FML en barriques entraîne une augmentation de la teneur en polysaccharides neutres totaux (tableau 4), liée pour l'essentiel à l'augmentation des polysaccharides neutres combinés. Des recherches conduites par ailleurs nous ont révélé que les polysaccharides du bois de chêne solubilisables en milieu aqueux ou hydroalcoolique (10 à 15% vol d'éthanol) sont des polysaccharides neutres essentiellement sous forme combinés (PN libre : 20%: PN combiné : 80%). Dans les mêmes conditions d'extraction, les polysaccharides levuriens et bactériens sont sous forme libre [23].

Ces résultats semblent suggérer l'apport de polysaccharides du bois de chêne dans les vins au cours de la FML et plus généralement pendant l'élevage. L'apport des polysaccharides neutres libres par les lies paraît plus limité.

Les polysaccharides acides, issus du raisin évoluent peu (tableau 4) ; ils sont très largement sous forme combinés (PA combinés : 80%). Dans le cas de FML en barriques, une partie des polysaccharides acides combinés sont précipités.

Ainsi, en barriques, la FML conduit à une augmentation des polysaccharides neutres combinés (provenant du bois de chêne) et libres (provenant du bois de chêne et des lies de bactéries et de levures) et à une plus faible diminution des polysaccharides acides combinés (éliminés par précipitation) : dans ces conditions le rapport PNT/PAT passe de 2 en cuve à 3 en barrique.

5- Incidence de la FML en cuves et en barriques sur la qualité des vins

Dans la majorité des essais réalisés, les vins issus de FML en barrique sont préférés à ceux de FML en cuves. Les préférences restent identiques après 1, 2 et 3 ans de conservation en bouteilles : les différences organoleptiques apportées par la FML en barriques sont donc stables et durables.

On retrouve toujours les mêmes commentaires pour décrire la FML en barrique: les vins sont parfois plus colorés, souvent plus sombres, les tanins sont souples, lisses et ronds, le vin paraît plus gras et ample, le boisé et les arômes de fruits sont en équilibre, le bouquet du vin est harmonieux.

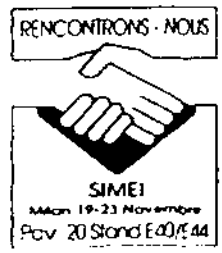
RÉSUMÉ :

La fermentation malolactique (F.M.L.) est une étape normale de la vinification des vins rouges de garde. L'étude de sa réalisation en cuves et en barriques nous a permis de montrer que la nature du récipient induisait de profondes modifications de la composition phénolique des vins entrainant un changement sensible de leurs caractères gustatifs. Les différentes dégustations réalisées ont généralement permis de classer les vins issus de FML en barriques en premier. Ces résultats suggèrent d'une part, l'intervention du bois de chêne et de ces composants solubles sur le déroulement de la FML et d'autre part, l'influence des bactéries lactiques sur les composés phénoliques des vins. Il a été possible de mettre en évidence l'amélioration de la viabilité et de l'activité malolactique des populations bactériennes en présence d'acide gallique et d'anthocyanes libres et un effet inhibiteur des procyanidines de pépins et des ellagitanins de bois de chêne.

MOTS CLÉS : Bactéries lactiques, vins rouges, fermentation malolactique, composés phénoliques, interactions

La deuxième partie de cet article ainsi que les références bibliographiques seront publiées dans notre prochain numéro.

■

REVÊTEMENTS DES CUVES PEINTURES D'ENTRETIEN, D'HYGIÈNE ET ANTIMOISISSURE

ADRESSEZ-VOUS À DES SPÉCIALISTES