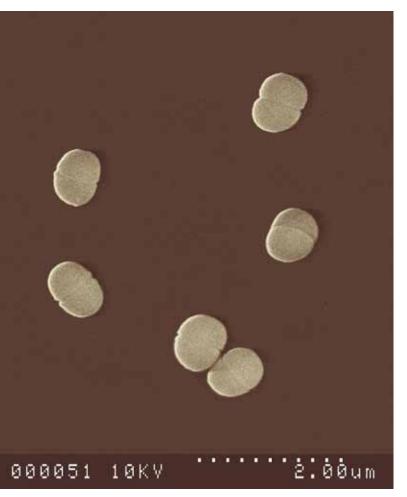
Incidence de la fermentation malolactique sur le taux de composés carbonylés et le SO₂ combiné

Marilyn CLÉROUX¹, Arnaud PERNET¹, Anik RIEDO¹, Muriel MERTENAT¹, Nick JACKOWETZ² et Ramón MIRA DE ORDUÑA HEIDINGER¹

¹Haute Ecole spécialisée de Suisse occidentale, CHANGINS | Haute Ecole de viticulture et œnologie, 1260 Nyon, Suisse ²Constellation Brands, Canandaigua, NY 14424, Etats-Unis

Renseignements: Ramón Mira de Orduña Heidinger, e-mail: ramon.mira@changins.ch, tél. +41 22 363 40 86, www.changins.ch



En dehors de l'acide malique, les bactéries lactiques hétérofermentaires *Oenococcus oeni* peuvent métaboliser d'autres substrats, dont des composés carbonylés. (Micrographie prise par le D' Nicolas Terrade au microscope électronique à balayage.)

Introduction

Deux publications récentes dans cette revue ont présenté les principaux composés carbonylés du vin (Henriet et al. 2014) ainsi que l'effet des paramètres de vinification et de la fermentation alcoolique sur les résidus du composé carbonylé le plus important dans la combinaison avec le SO₂, l'acétaldéhyde (Cléroux *et al.* 2015). Ces études permettent de mieux gérer les vinifications pour réduire les taux de SO₂ combiné dans les vins. En moyenne, les vins rouges contiennent 50 % de moins d'acétaldéhyde que les blancs, soit 20 mg/l au lieu de 40 (Henriet *et al.* 2014). Ce fait est fortement corrélé avec l'application généralisée de la fermentation malolactique (FML) dans la vinification en rouge. En 1976 déjà, des chercheurs suisses avaient constaté que la FML réduisait le besoin en SO₂ (Mayer *et al.* 1976) et d'autres publications ont étudié l'effet de la FML sur les composés carbonylés (Flamini *et al.* 2002; Osborne *et al.* 2000).

La réduction successive des taux légaux de SO_2 total dans les vins exige de mieux maîtriser la formation et la dégradation des composés carbonylés dans le vin. Cependant, le métabolisme des souches modernes n'est pas suffisamment étudié, ainsi que sa cinétique.

Le but de ce travail était d'étudier le métabolisme des composés carbonylés des bactéries lactiques commerciales. Au lieu de mesurer ces composés uniquement avant et après la FML, la cinétique des concentrations a été suivie étroitement pour corréler le métabolisme des composés carbonylés avec le processus principal de la FML, la dégradation de l'acide malique.

Matériel et méthodes

Le vin de base a été produit avec la fermentation d'un moût de Riesling par Saccharomyces cerevisiae CY3079 (Lallemand Inc.). Après fermentation, le vin a été stabilisé pendant cinq jours à 4°C et filtré stérile (0,45 μ m). Aucun SO₂ n'a été ajouté, mais les concentrations des composés carbonylés ont été ajustées. Le profil analytique du moût et du vin avant FML est donné dans le tableau 1.

Les douze souches commerciales de bactéries lactiques hétérofermentatives *O. oeni* utilisées ont été obtenues par la société Lallemand (Montréal). Les bactéries ont été propagées dans un milieu MRS (BD Science) stérile et inoculées dans le vin à 1% (v/v) après lavage et concentration de la biomasse (~1,0 x 108 ufc/ml). Toutes les incubations (250 ml) et analyses réalisées à échelle de laboratoire ont été dupliquées et les valeurs présentées sont des moyennes.

Pour éviter la formation de composés carbonylés par oxydation, toutes les fermentations ont été réalisées en chambre anaérobie et l'absence d'oxygène confirmée par la mesure de l' ${\rm O_2}$ dissous dans les fermentations. L'oxygène dissous a été mesuré non invasivement par fluorescence (Presens, Germany). L'acidité titrable a été dosée par titrage acide-base colorimétrique et l'azote assimilable par méthode NOPA (Dukes et Butzke 1998).

Les composés carbonylés ont été analysés par hydrolyse des hydroxy-sulfonates en milieu basique suivie d'une dérivatisation à la dinitrophénylhydrazine (DNPH) en milieu acide et d'une analyse par chromatographie liquide (Jackowetz et Mira de Orduña 2013).

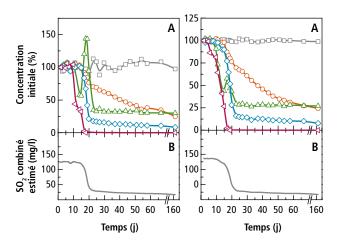


Figure 1 | Cinétiques (A) des concentrations de l'acide malique (\triangleleft), acide galacturonique (\square), acide α -cétoglutarique (\bigcirc), acide pyruvique (\triangle) et acétaldéhyde (\triangleleft) pendant la fermentation malolactique d'un Riesling inoculé avec *O. oeni* R1105 (gauche) et R1106 (droite). Les taux de SO $_2$ combiné (B) ont été calculés sur la base d'un vin stabilisé à 30 mg/l de SO $_2$ libre.

lésumé ■

La concentration en SO, total nécessaire pour stabiliser un vin peut être réduite si l'on arrive à abaisser la teneur en composés carbonylés qui se combinent au SO₃. Il est connu que la fermentation malolactique (FML) peut diminuer le besoin en SO, d'un vin. Le but de cette étude était d'évaluer la cinétique du métabolisme de l'acide malique et des composés carbonylés de plusieurs souches de bactéries lactiques commerciales. Douze souches d'Oenococcus oeni ont été étudiées pendant et après la FML d'un Riesling. Certaines présentaient des différences dans le taux de dégradation, mais leur capacité de dégrader les composés carbonylés était similaire. Aucune des souches n'a pu dégrader l'acide galacturonique, tandis que l'acide α-cétoglutarique l'a été partiellement par toutes les bactéries (48 % trois semaines après la FML). L'acétaldéhyde et l'acide pyruvique l'ont été en grande partie (87 et 85 % trois semaines après la FML) mais de façon différée par rapport à l'acide malique. Si une réduction significative des composés carbonylés est souhaitée, il est recommandé de stabiliser les vins seulement sept à dix jours après l'épuisement de l'acide maligue. Une telle approche peut faire baisser de 75 % le taux de SO, combiné.

Résultats et discussion

La figure 1A montre la cinétique de l'acide malique et des composés carbonylés acétaldéhyde, acide pyruvique, acide α -cétoglutarique et acide galacturonique pendant la fermentation malolactique (FML) par deux souches d'O. oeni à titre d'exemple. L'épuisement de l'acide malique a pris dans toutes les variantes entre 17 et 44 jours (moyenne 25 jours).

Tableau 1 | Profil analytique du moût de Riesling et du vin avant FML (moyennes ± erreur type)

Paramètres du moût				Paramètres du vin					
Densité	рН	Acidité titrable	Azote assimilable	Ethanol	Acide malique	Composés carbonylés (mg/l)			/I)
(°Oe)		(g/l ac. tartrique)	(N mg/l)	(% v/v)	(g/l)	AcHO	Pyr	lpha-CG	AG
86	3,4	7,2 ± 0,1	106 ± 2	11 ± 0,1	$3,0 \pm 0,4$	85 ± 1	12 ± 0,5	25 ± 0.3	612 ± 17

AcHO: acétaldéhyde; Pyr: acide pyruvique; α -CG: acide α -cétoglutarique; AG: acide galacturonique.

De fortes différences se sont manifestées dans le métabolisme des différents composés carbonylés, tandis que le comportement des souches de bactéries lactiques restait très similaire (tabl.2). Par exemple, aucune des souches n'est parvenue à dégrader l'acide galacturonique durant la période d'observation (163 jours). L'acide α -cétoglutarique a été partiellement dégradé

par toutes les souches étudiées (dégradation moyenne de 48 % trois semaines après la FML), à un taux relativement faible. La cinétique de dégradation de l'acétaldéhyde et de l'acide pyruvique s'est déroulée en deux temps (fig. 1A): une première phase de dégradation rapide suivie d'une phase de faible dégradation, avec un taux de dégradation moyen de 87 (acétaldéhyde) et 85 %

Tableau 2 | Pourcentage de la dégradation des composés carbonylés au moment de la fin de la FML (épuisement de l'acide malique) et trois semaines après la fin de la FML (moyennes ± erreur type)

Souche	Pourcentage de dégradation									
		A la fin de	la FML (%)		3 semaines après la FML (%)					
	AcH0	Pyr	lpha-CG	AG	AcH0	Pyr	lpha-CG	AG		
R1032	28,7 ± 11,3	68,1 ± 2,9	20,9 ± 1,4	0.0 ± 0.0	82,7 ± 1,5	$100,0 \pm 0,0$	54,7 ± 4,3	0.0 ± 0.0		
R1054	31,6 ± 12,4	70,8 ± 2,2	24,5 ± 3,5	0.0 ± 0.0	92,3 ± 0,1	83,4±0,5	56,3 ± 1,5	0.0 ± 0.0		
R1075	24,3 ± 0,0	63,7 ± 4,3	21,2 ± 2,2	0.0 ± 0.0	82,8 ± 1,4	87,5 ± 0,1	71,8 ± 2,8	0.0 ± 0.0		
R1076	13,3 ± 10,0	50,9 ± 1,1	9,9 ± 2,1	0.0 ± 0.0	84,1 ± 0,6	84,6±0,8	52,4±3,5	0.0 ± 0.0		
R1077	48,9 ± 15,6	54,7 ± 3,3	15,7 ± 3,7	$0,0 \pm 0,0$	88,8±0,5	86,5±0,7	50,2 ± 3,4	$0,0 \pm 0,0$		
R1098	18,8 ± 4,8	8,7 ± 1,7	12,1 ± 1,1	$0,0 \pm 0,0$	91,8 ± 0,7	91,7 ± 0,4	53,4 ± 1,6	0.0 ± 0.0		
R1101	16,4 ± 13,1	49,6 ± 5,4	8,9 ± 2,1	$0,0 \pm 0,0$	91,4±0,3	88,9±1,5	35,2 ± 1,9	$0,0 \pm 0,0$		
R1105	24,6 ± 8,2	20,1 ± 5,1	8,1 ± 2,1	$0,0 \pm 0,0$	86,9±0,2	67,8 ± 0,1	47,3 ± 1,9	$0,0 \pm 0,0$		
R1106	29,1 ± 6,2	42,4 ± 4,6	12,9 ± 1,9	$0,0 \pm 0,0$	85,8 ± 0,2	71,7 ± 0,3	52,2 ± 1,8	0.0 ± 0.0		
R1108	21,0 ± 7,7	81,3 ± 2,3	5,9 ± 3,1	$0,0 \pm 0,0$	83,2 ± 1,3	100,0±0,0	34,3 ± 1,3	0.0 ± 0.0		
R1118	43,9 ± 10,1	59,4 ± 2,6	10,6 ± 2,6	$0,0 \pm 0,0$	88,3 ± 0,4	78,6 ± 1,6	28,1 ± 2,3	$0,0 \pm 0,0$		
R1124	64,5 ± 16,7	56,9 ± 0,4	19,9 ± 0,9	$0,0 \pm 0,0$	87,7 ± 0,2	80,9±0,3	43,3 ± 1,2	$0,0 \pm 0,0$		
Moyenne	30,4±3,7	48,9 ± 5,7	14,2 ± 1,3	$0,0 \pm 0,0$	87,1 ± 1,0	85,1 ± 4,7	48,2±2,0	$0,0 \pm 0,0$		
Plage	13,3-64,5	8,1-81,3	5,9-24,5		82,8-92,3	67,8-100,0	28,1–71,8			

AcHO: acétaldéhyde; Pyr: acide pyruvique; α -CG: acide α -cétoglutarique; AG: acide galacturonique.

Tableau 3 | Taux de SO₂ combiné estimés pendant et après la FML par 12 souches commerciales d'*O. oeni*. Les taux de SO₂ combiné sont calculés à partir des concentrations des composés carbonylés à un moment spécifique, les constantes de dissociation de leurs sulfonates et à un taux donné de SO₂ libre de 30 mg/l

Souche	SO ₂ combiné (mg/l)							
	Avant FML	A la fin de la FML	1 semaine post-FML	2 semaines post-FML	3 semaines post-FML			
R1032	$130,0 \pm 10,0$	152,0 ± 12,0	33,3 ± 5,7	28,9 ± 1,1	25,1 ± 0,9			
R1054	149,2 ± 19,2	136,2 ± 11,2	38,7 ± 1,3	31,5 ± 1,5	28,9 ± 1,1			
R1075	142,5 ± 2,5	106,3 ± 2,3	33,2 ± 3,8	27,1 ± 2,1	23,8 ± 2,8			
R1076	$136,5 \pm 4,5$	128,8 ± 8,8	29,7 ± 0,3	26,6 ± 1,6	23,8±0,8			
R1077	138,2 ± 5,2	34,2 ± 15,8	25,2 ± 1,8	22,3 ± 0,7	20,3 ± 0,7			
R1098	$140,3 \pm 20,3$	120,0 ± 5,0	44,1 ± 8,1	22,3 ± 0,3	18,5 ± 0,5			
R1101	138,6 ± 5,6	131,2 ± 13,8	65,0 ± 7,0	25,0 ± 2,0	19,6 ± 1,4			
R1105	$123,6 \pm 16,4$	107,0 ± 8,0	28,7 ± 1,3	25,5 ± 0,5	23,3±0,3			
R1106	137,2 ± 4,2	90,9 ± 10,9	28,3 ± 0,7	27,5 ± 0,5	24,3 ± 2,3			
R1108	$140,3 \pm 10,3$	118,7 ± 8,7	25,8 ± 7,2	22,5 ± 2,5	20,2 ± 1,8			
R1118	$132,8 \pm 2,2$	89,0 ± 12,0	29,9 ± 11,1	$26,0 \pm 4,0$	22,3 ± 1,7			
R1124	129,1 ± 7,9	70,4 ± 14,6	28,9 ± 5,1	25,9 ± 2,1	22,6 ± 0,4			
Moyenne	136,5 ± 2,7	107,1 ± 6,8	34,2 ± 2,5	25,9 ± 0,7	22,7 ± 0,6			
Plage	123,6-149,2	34,2–152,0	25,2-65,0	22,3–31,5	18,5-28,9			
Taux de réduction (%)	0	22	75	81	83			

(acide pyruvique) trois semaines après FML (tabl. 2). Dans le cas de l'acide pyruvique, les valeurs ont pu réaugmenter transitoirement dans quelques incubations (fig. 1A). Ce pic est probablement dû à la dégradation de l'acide citrique, qui forme de l'acide pyruvique comme intermédiaire métabolique (Bartowsky et Henschke 2004).

A la fin de la FML (définie par l'épuisement de l'acide malique), la moitié seulement de l'acide pyruvique et moins d'un tiers de l'acétaldéhyde et de l'acide α -cétoglutarique avaient été dégradés en moyenne (tabl.2). Donc, pour réduire les concentrations résiduelles en composés carbonylés - et par conséquence en SO, combiné - dans les vins, il serait opportun de retarder la stabilisation microbiologique après la FML. Cependant, la métabolisation des sucres et des acides aminés par les bactéries lactiques peut mener à la formation d'acide acétique et d'amines biogènes (Lonvaud-Funel 1999). Il est donc nécessaire de trouver un compromis permettant de maximiser la dégradation des composés carbonylés sans augmenter inutilement le risque de déviations organoleptiques. A cette fin, nous avons calculé la concentration en SO2 combiné qui résulterait en stabilisant le vin à différents moments. Pour obtenir les valeurs, nous avons utilisé les constantes de dissociation des sulfonates pertinents et supposé un taux de SO, libre de 30 mg/l. Cette estimation est représentée par la ligne noire dans la figure 1B et confirme que la réduction du SO, combiné était différée par rapport à la dégradation de l'acide malique. Les valeurs extraites de ce calcul (tabl. 3) indiquent qu'à la fin de la FML, en moyenne la réduction n'était que de 22 %. Une semaine après la FML, la réduction du SO, combiné atteignait déjà 75 %. Sur la base de ces fermentations avec douze souches et en considérant une marge de sécurité, il serait recommandé d'attendre

7–10 jours après la fin de la FML la stabilisation microbiologique des vins, pour réduire au maximum les concentrations de ${\rm SO_2}$ combiné sans augmenter le risque de déviations microbiologiques. Toutefois, il est recommandé de surveiller le développement de l'acidité volatile, surtout avec des vins à pH élevé et à faible degré d'alcool.

Conclusions

- Les douze bactéries lactiques du vin commerciales testées ont montré une capacité de dégradation des composés carbonylés similaire, mais avec un taux de dégradation différent.
- Toutes les souches étaient capables de métaboliser l'acétaldéhyde et l'acide pyruvique qui ont été dégradés rapidement. La dégradation de l'acide α -cétoglutarique a été plus lente, tandis que l'acide galacturonique n'a pas été dégradé de façon significative par aucune des souches.
- La dégradation des composés carbonylés a été différée par rapport à la dégradation de l'acide malique.
- La concentration de SO₂ combiné calculée sur la base des composés carbonylés présents était réduite de 25 % lors de l'épuisement de l'acide malique. Une semaine après la FML, le taux de SO₂ calculé était réduit de 75 %.
- Si une réduction significative des composés carbonylés (et donc du SO₂ combiné) est envisagée, il est recommandé de ne pas stabiliser le vin jusqu'à 7–10 jours après la fin de la FML.
- L'acidité volatile doit toutefois être contrôlée pour éviter des défauts organoleptiques, surtout si le pH du vin est élevé.

Bibliographie

- Bartowsky E. J. & Henschke P. A., 2004. The 'buttery' attribute of wine diacetyl – desirability, spoilage and beyond. Int. J. Food Microbiol. 96, 235–252.
- Cléroux M., Pernet A., Mira de Orduña R., Riedo A., Mertenat M., Jackowetz
 J. N. & Li E.. 2015. Effet des levures et des paramètres de vinification sur
 la dynamique des concentrations en acétaldéhyde. Revue suisse Vitic., Arboric.,
 Hortic. 47, 232–237.
- Dukes B. C. & Butzke C. E., 1998. Rapid determination of primary amino acids in grape juice using an o-phtalaldehyde/N-acetyl-L-cysteine spectrophotometric assay. Am. J. Enol. Vitic. 49, 127–134.
- Flamini R., de Luca G. & di Stefano R., 2002. Changes in carbonyl compounds in Chardonnay and Cabernet Sauvignon wines as a consequence of malolactic fermentation. Vitis 41, 107–112.
- Henriet J., Jackowetz J. N. & Mira de Orduña R., 2014. Composés carbonylés: importance pour les taux de SO₂, analyse et présence dans les vins.
 Revue suisse Vitic., Arboric., Hortic. 46, 318–325.
- Jackowetz J. N. & Mira de Orduña R., 2013. Improved sample preparation and rapid UHPLC analysis of SO₂ binding carbonyls in wine by derivatisation to 2,4-dinitrophenylhydrazine. Food Chem. 139, 100–104.
- Lonvaud-Funel A., 1999. Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. Antonie van Leeuwenhoek 76, 317–331.
- Mayer K., Pause G. & Vetsch U., 1976. Gehalte an SO₂-bindenden Stoffen in Wein: Einfluss von Gärung und biologischem Säureabbau. Schweiz Z. Obst-Weinbau 112. 309–313.
- Osborne J. P., Mira de Orduña R., Liu S.-Q. & Pilone G. J., 2000. Acetaldehyde metabolism by wine lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Lett. 191, 51–55.

Effect of malolactic fermentation on the concentration of carbonyl compounds and bound SO,

The amount of total SO, needed to stabilize a wine can be reduced if the concentrations of carbonyl compounds that bind to SO, are diminished. It is well known that malolactic fermentation (MLF) can decrease the SO, requirement of wines. The aim of this work was to study the kinetics of the metabolism of malic acid and carbonyl compounds by several strains of commercial wine lactic acid bacteria. Twelve Oenococcus oeni strains were studied during and after MLF of a Riesling wine. The carbonyl degradation rates differed among strains, but their ability to degrade carbonyls was similar. That is, none of the strains was able to degrade galacturonic acid while α -ketoglutaric acid was degraded partially by all bacteria (48 % 3 weeks after MLF). Acetaldehyde and pyruvic acid were degraded to a large extent (87 and 85 % 3 weeks after MLF), but their degradation was delayed with regards to the malic acid utilisation. If a substantial reduction of carbonyl compounds is desired, wines should not be stabilised until 7 to 10 days after the depletion of malic acid. Such an approach may reduce the bound SO, levels by 75 %.

Key words: malolactic fermentation, carbonyl compounds, SO₂, lactic acid bacteria.

Zusammenfassung

Einfluss des biologischen Säureabbaus auf den Gehalt an Carbonylverbindungen und gebundenem SO,

Die zur Stabilisierung eines Weines notwendige Menge an SO, kann durch die Verringerung des Gehalts an Carbonylverbindungen, welche SO, binden, reduziert werden. Es ist bekannt, dass der biologische Säureabbau (BSA) den SO₂-Bedarf von Weinen senken kann. Ziel dieser Studie war es. die Kinetik der Verstoffwechslung von Äpfelsäure und Carbonylverbindungen durch kommerzielle Weinmilchsäurebakterien zu untersuchen. Zwölf Oenococcus oeni Stämme wurden während und nach dem BSA in einem Riesling untersucht, Stammspezifische Unterschiede in den Abbauraten wurden offensichtlich, aber die grundsätzliche Fähigkeit zum Abbau einzelner Carbonylverbindungen war einheitlich. So war keiner der Stämme in der Lage die Galakturonsäure abzubauen während die α-Ketoglutarsäure von allen Bakterien teilweise abgebaut wurde (48 % 3 Wochen nach dem BSA). Das Acetaldehyd und die Brenztraubensäure wurden grösstenteils abgebaut (87 und 85 % 3 Wochen nach dem BSA), aber der Abbau war im Vergleich zum Malatabbau zeitlich verspätet. Falls eine signifikante Verringerung des Gehalts and Carbonylen gewünscht ist, sollten Weine daher erst 7 bis 10 Tage nach Ende des Malatabbaus stabilisiert werden. Eine solche Vorgehensweise vermag es den Gehalt an gebundenem SO, 75 % zu reduzieren.

Incidenza della fermentazione malolattica sul tasso di composti carbonilici e sulla SO, combinata

La concentrazione in SO, totale necessaria per stabilizzare un vino può essere ridotta se riusciamo ad abbassare il tenore in composti carbonilici che si combinano al SO₂. E' risaputo che la fermentazione malolattica (FML) può diminuire il bisogno di un vino in SO₃. Lo scopo di questo studio era di valutare la cinetica del metabolismo dell'acido malico e dei composti carbonilici di diversi ceppi di batteri lattici commerciali. Si sono studiati dodici ceppi d'Oenococcus oeni durante e dopo la FML di un Riesling. Certi presentavano delle differenze nei tassi di degradazione, ma la loro capacità di degradare i composti carbonilici era simile. Alcuni dei ceppi non hanno potuto degradare l'acido galatturonico, mentre l'acido α -chetoglutarico lo è stato parzialmente per tutti i batteri (48 % 3 settimane dopo la FML). L'acetaldeide e l'acido piruvico sono stati in gran parte degradati (87 e 85 % 3 settimane dopo la FML), ma in modo differito rispetto all'acido malico. Se è richiesta una riduzione significativa dei composti carbonilici, si consiglia di non stabilizzare i vini fino a 7-10 giorni dopo l'esaurimento dell'acido malico. Un tale approccio può far abbassare il tasso di SO, del 75 %.