

INCIDENCE DE LA CLARIFICATION DES MOÛTS DE RAISIN SUR LES FERMENTESCIBILITÉS ALCOOLIQUE ET MALOLACTIQUE

Michèle GUILLOUX-BENATIER et M. FEUILLAT

Institut Universitaire de la Vigne et du Vin, Laboratoire d'Œnologie, Université de Bourgogne,
Faculté des Sciences "Mirande", 21000 Dijon (France)

Résumé : *Des essais de débourage en vinification en blanc, réalisés de 1988 à 1992, mettent en évidence le rôle important joué par la teneur en macromolécules solubles dans le moût de raisin. Les moûts de faible turbidité conduisent en effet à des fermentations alcooliques lentes en relation avec de faibles populations levuriennes. Il est également confirmé que la libération de polysaccharides exocellulaires par les levures au cours de la fermentation alcoolique est d'autant plus élevée que le moût de départ a été fortement appauvri en colloïdes de raisin. Par contre, ce sont dans les lots les plus clarifiés que l'on observe la meilleure fermentescibilité malolactique.*

INTRODUCTION

Il a été souvent remarqué que la turbidité des moûts a en vinification en blanc une incidence directe à la fois sur le déroulement et sur le terme de la fermentation alcoolique (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 1975 ; GROAT et OUGH, 1978 ; HOUTMAN et DU PLESSIS, 1986 ; OLLIVIER *et al.*, 1987). La présence de bourbes solides en quantité plus ou moins importante dans le moût a une influence directe sur le métabolisme levurien bien que leurs rôles soient encore mal connus : rôle nutritif par apport d'acides gras favorables à la croissance des levures, rôle « support » par fixation d'inhibiteurs et notamment d'acides gras à chaîne courte C8, C10 (LAFON-LAFOURCADE *et al.*, 1984 ; EDWARDS *et al.*, 1990). Une clarification trop poussée du moût peut entraîner également une production plus ou moins élevée d'acide acétique pendant la fermentation alcoolique (DELFINI *et al.*, 1992).

Une autre composante de la turbidité des moûts est liée à la présence de macromolécules qui peuvent elles-mêmes fixer des inhibiteurs (OLLIVIER *et al.*, 1987). De plus, les levures libèrent dans le vin, pendant la fermentation alcoolique et au cours de l'élevage sur lies, des polysaccharides et surtout des mannoprotéines, dont les teneurs peuvent atteindre plusieurs centaines de milligrammes par litre. La libération de ces composés dépend de la souche de levure, de la température de fermentation, des conditions d'agitation (LLAUBÈRES *et al.*, 1986), mais aussi du degré de clarification des moûts et de la durée de conservation

sur lies (FEUILLAT et *al.*, 1989). Or, nous savons que la teneur en colloïdes des vins joue un rôle non négligeable sur les qualités sensorielles et organoleptiques des vins finis (FEUILLAT et *al.*, 1987 ; FEUILLAT et *al.*, 1988) compte tenu des interactions qui peuvent exister avec les arômes (VOILLEY et *al.*, 1990 ; LUBBERS, 1993).

Nous disposons au laboratoire de nombreuses données concernant des suivis de fermentations alcooliques et malolactiques en relation avec des clarifications plus ou moins intenses des moûts de raisin. Différents procédés de débourbage ont été testés : débourbages dynamiques tels que la centrifugation et la filtration et débourbages statiques tels que le débourbage par l'anhydride sulfureux, par le froid et par l'enzymage.

L'analyse de ces données a permis de mettre en évidence l'incidence de la clarification des moûts de raisin sur la fermentation alcoolique mais aussi sur la fermentation malolactique.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I — SUIVI DES FERMENTATIONS ALCOOLIQUE ET MALOLACTIQUE

La fermentation alcoolique est suivie au cours du temps par la détermination de la teneur en sucres réducteurs dans le milieu (densimétrie) et par l'évaluation des populations levuriennes totales par comptage à l'hématimètre après coloration au bleu de méthylène.

La fermentation malolactique est suivie au cours du temps par la détermination de la teneur en acide L-malique dans le vin (méthode enzymatique, BERGMAYER, 1973).

II — ANALYSES QUANTITATIVE ET QUALITATIVE DES COLLOÏDES

Les colloïdes solubles totaux sont extraits des moûts et des vins, préalablement centrifugés, par précipitation à l'éthanol selon la méthode décrite par USSEGLIO-TOMASSET (1976), avec en particulier le séchage des précipités à l'éther diéthylique avant pesée. Les macromolécules de levures sont également obtenues par précipitation à l'éthanol d'un surnageant d'autolyse après 48 heures d'autolyse de *Saccharomyces cerevisiae* Levuline BRG dans un tampon hydroalcoolique selon la technique de FEUILLAT et *al.* (1989).

Le fractionnement des constituants macromoléculaires est réalisé par chromatographie d'exclusion-diffusion moyenne pression (FPLC) sur une colonne de Superose 6 HR 10/30. Le domaine de fractionnement de ce gel se situe entre 10^4 Da et 4.10^6 Da pour les polysaccharides et 5.000 Da et 4.10^7 Da pour les protéines globulaires. Le dispositif utilisé présente les caractéristiques suivantes :

- colonne Pharmacia remplie d'agarose,
- élution descendante par un tampon phosphate - NaCl 0,05 M ; pH 7,
- débit : 0,3 ml/min sous une pression de 0,1 bar,

- volume injecté : 200 µl d'une solution aqueuse de colloïdes à 5 mg/ml,
- collecte par fractions de 0,6 ml,
- détection en sortie de colonne par mesure de l'absorbance à 280 nm pour les protéines et révélation des sucres totaux par la méthode de DUBOIS et *al.* (1956).

L'étalonnage de la colonne est réalisée à l'aide de dextrans standards (Bleu dextran, T500, T150, T70, T40 et T9,3) et de protéines standards (Aprotinine, Anhydrase carbonique, Bovine sérum albumine, Alcool déshydrogénase, Ferritine et Thyroglobuline).

III — PROTOCOLES DES ESSAIS DE CLARIFICATION DES MOÛTS

1°) Essais n°1 et n°2

A partir d'un moût de deuxième pressée (taille en Champagne) de Pinot noir (essai n°1) et d'un moût de première pressée (cuvée en Champagne) de Pinot noir (essai n°2) provenant de la récolte 1988, débourbés au SO₂, deux lots sont constitués :

- un lot témoin,
- un lot subissant une clarification supplémentaire par centrifugation avec un clarificateur autodébourbeur SC 35 WESTFALIA (débit 60 hl/h) pour l'essai n°1 et avec un centrifugeur VNP X 510 ALFA-LAVAL (débit 30 hl/h) pour l'essai n°2.

Les moûts sont ensemencés avec *Saccharomyces cerevisiae* (Levuline CHP). En fin de fermentation alcoolique, les vins sont soutirés et la fermentation malolactique s'effectue en flore indigène.

2°) Essais n°3 et n°4

A partir d'un moût de première pressée (cuvée en Champagne) de Pinot noir provenant de la récolte 1989 (essai n°3) et de la récolte 1991 (essai n°4), débourbés au SO₂, trois lots sont constitués :

- un lot témoin,
- un lot subissant une clarification supplémentaire par centrifugation avec un clarificateur autodébourbeur SC 35 WESTFALIA,
- un lot subissant une clarification supplémentaire par filtration avec un filtre SCHENK TUCHFILTER TF 630 NIRO.

Les moûts sont ensemencés avec *Saccharomyces cerevisiae* (Levuline CHP). Les vins sont soutirés après fermentation alcoolique. Pour l'essai n°3, la fermentation malolactique s'effectue en flore indigène et pour l'essai n°4, les vins sont ensemencés avec *Leuconostoc oenos* (Inobacter).

3°) Essai n°5

A partir d'un moût de première pressée (cuvée en Champagne) de Pinot noir provenant de la récolte 1990, débourbé au SO₂, trois lots sont constitués :

- un lot témoin,
- un lot additionné de bentocaséine à 30 g/hl (50 p. cent caséine, 50 p. cent bentonite) soutiré après 24 heures,
- un lot additionné de bentocaséine à 80 g/hl (50 p. cent caséine, 50 p. cent bentonite) soutiré après 24 heures.

Les moûts sont ensemencés avec *Saccharomyces cerevisiae* (Levuline CHP). Les vins soutirés après fermentation alcoolique sont ensemencés avec *Leuconostoc oenos* (Inobacter).

4°) Essai n°6

A partir d'un moût de première pressée (cuvée en Champagne) de Pinot noir provenant de la récolte 1990, débourbé au SO₂, deux lots sont constitués :

- un lot témoin,
- un lot subissant une clarification supplémentaire par filtration avec un filtre SCHENK TUCHFILTER TF 630 NIRO.

Les moûts sont ensemencés avec *Saccharomyces cerevisiae* (Levuline CHP). Les vins sont soutirés après fermentation alcoolique et ensemencés avec *Leuconostoc oenos* (Inobacter).

5°) Essai n°7

A partir d'un moût d'Aligoté (récolte 1992), sulfité à 5 g/hl après pressurage, quatre lots sont constitués :

- un lot témoin,
- un lot additionné de bentonite (100 g/hl) soutiré après 36 heures,
- un lot débourbé par le froid (12 heures à 12 °C),
- un lot centrifugé par un autodébourbeur ALFA-LAVAL (débit : 45 hl/h).

Les moûts sont ensemencés avec *Saccharomyces cerevisiae* (Zymaflore VL1). Les vins sont soutirés après fermentation alcoolique et la fermentation malolactique s'effectue en flore indigène.

6°) Essai n°8

A partir d'un moût de Chardonnay (récolte 1992), sulfité à 5 g/hl après pressurage, trois lots sont constitués :

- un lot après 12 heures de débourbage statique,
- un lot après 24 heures de débourbage statique,
- un lot après 48 heures de débourbage statique.

Les moûts sont ensemencés avec *Saccharomyces cerevisiae* (Levuline BRG). Les vins sont soutirés après fermentation alcoolique et ensemencés avec *Leuconostoc oenos* (Microenos B16) (BRUMWELL, 1993).

RÉSULTATS - DISCUSSION

I — INFLUENCE DE LA TENEUR EN COLLOÏDES DES MOÛTS DE RAISIN SUR LA DURÉE DE LA FERMENTATION ALCOOLIQUE

Les différents traitements de débouillage se caractérisent par des valeurs de turbidité différentes (tableau I). La valeur de la turbidité ne reflète pas exactement la concentration en colloïdes du moût de raisin. Par exemple, pour trois turbidités voisines de 80 à 85 NTU, la teneur en macromolécules du moût est respectivement de 123 mg, 199 mg et 310 mg par litre.

TABLEAU I

Influence de la clarification des moûts sur leurs teneurs en colloïdes et sur la durée de la fermentation alcoolique (FA)

Essai	Technique de débouillage	Turbidité (NTU)	Colloïdes du moût (mg/l)	Durée de la FA (jours)
n°1	Non débouillé Centrifugation	280	188	7
		92	153	16
n°2	Non débouillé Centrifugation	235	166	8
		85	123	12
n°3	Non débouillé Centrifugation Filtration	7,1	219	9
		6,0	199	7
		3,7	167	11
n°4	Non débouillé Centrifugation Filtration	103	225	10
		80	199	13
		2	165	17
n°5	Non débouillé Bentonitage (30 g/hl) Bentonitage (80 g/hl)	138	402	12
		61	316	12
		32	291	12
n°6	Non débouillé Filtration	33	278	9
		2	171	9
n°7	Non débouillé Bentonitage Froid Centrifugation	250	366	4
		150	299	14
		145	341	7
		80	310	7
n°8	Statique 12 heures Statique 24 heures Statique 48 heures	47	322	6
		30	295	7
		18	278	9

Les colloïdes des moûts de raisin sont des constituants très sensibles aux traitements de clarification : plus le débouillage est important, plus le moût de raisin est appauvri en macromolécules ; la diminution atteignant généralement 20 à 30 p. cent de la concentration initiale.

Ce sont les lots de moûts de raisin les plus clarifiés qui ont les durées de fermentation alcoolique les plus longues (tableau I). Les fermentations alcooliques plus lentes sont souvent en relation avec des populations levuriennes totales plus faibles (figure 1). Le débouillage a donc un effet direct sur le développement des levures, les lots les plus appauvris en colloïdes présentant une moins bonne fermentescibilité alcoolique.

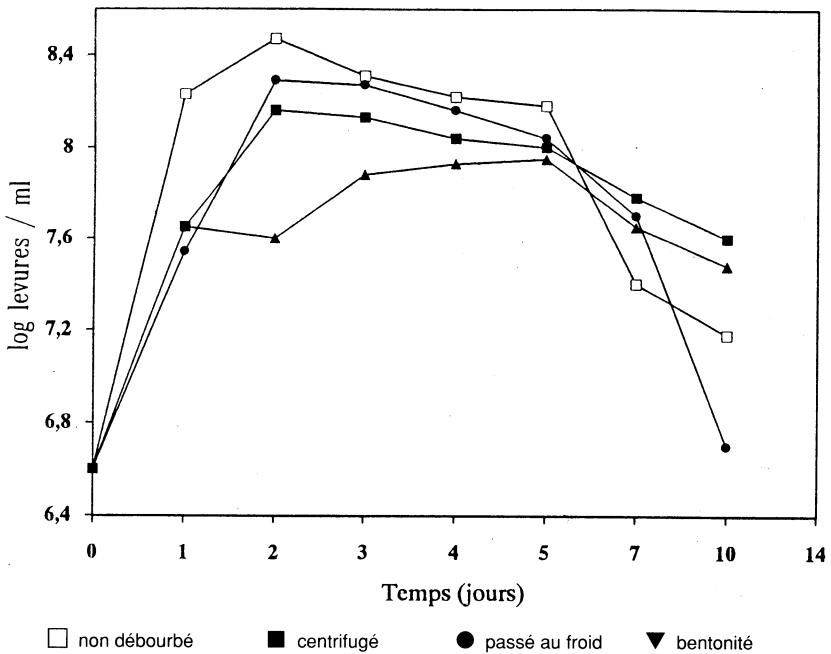
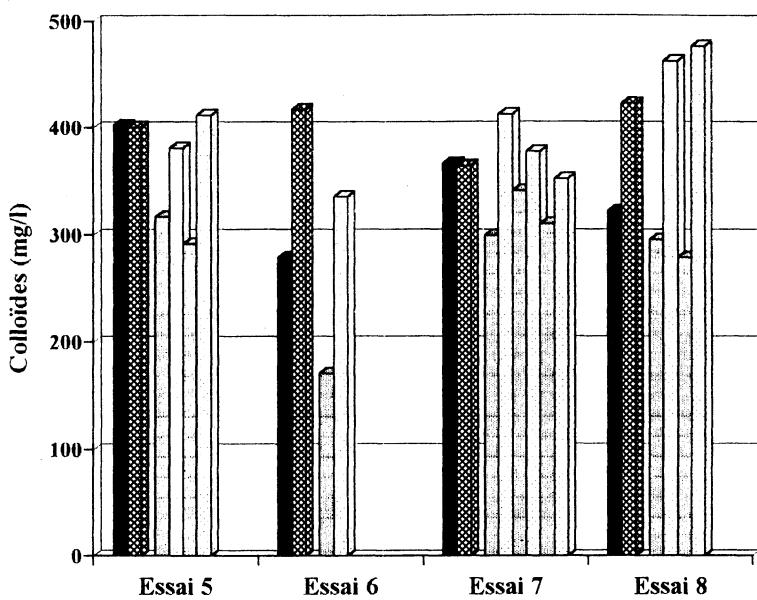
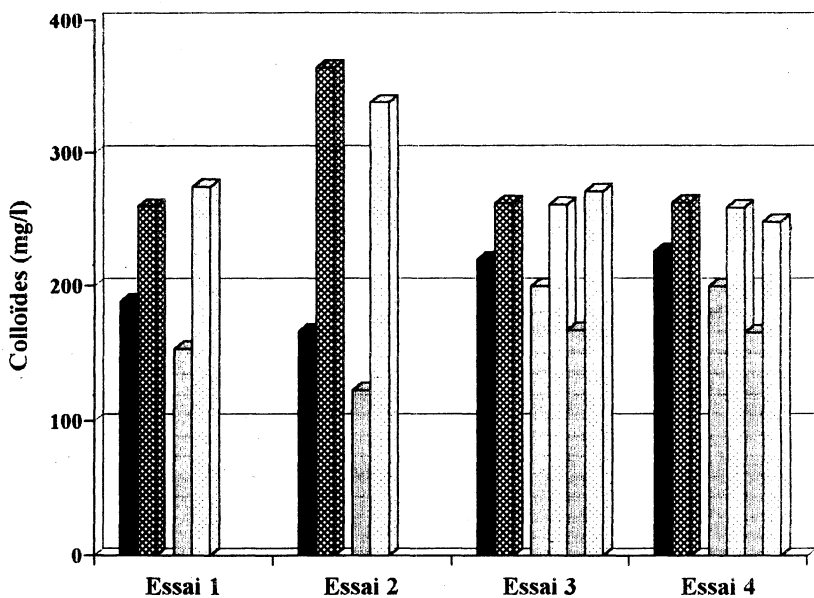


Fig. 1 — Evolution des populations levuriennes totales au cours de la fermentation alcoolique en fonction de la clarification des moûts (essai n° 7)

II — INFLUENCE DE LA CLARIFICATION DES MOÛTS SUR LA PRODUCTION DE MACROMOLÉCULES PAR LES LEVURES PENDANT LA FERMENTATION ALCOOLIQUE

D'après LLAUBÈRES *et al.* (1987), la libération de polysaccharides exocellulaires par des levures du genre *Saccharomyces cerevisiae* pendant la fermentation alcoolique est fonction à la fois de la souche utilisée et de l'âge de la culture. FEUILLAT *et al.* (1989) ont montré que plus un moût de raisin est appauvri en colloïdes, plus l'enrichissement en polysaccharides et glycoprotéines par les levures au cours de la fermentation alcoolique est important.



Moût témoin
 Vin témoin
 Vin clarifié
 Moût clarifié

Fig. 2 — Comparaison des teneurs en colloïdes des moûts et des vins correspondants pour les différents essais.

(a) essais n°1 à n°4 ; (b) essais n°5 à n°8

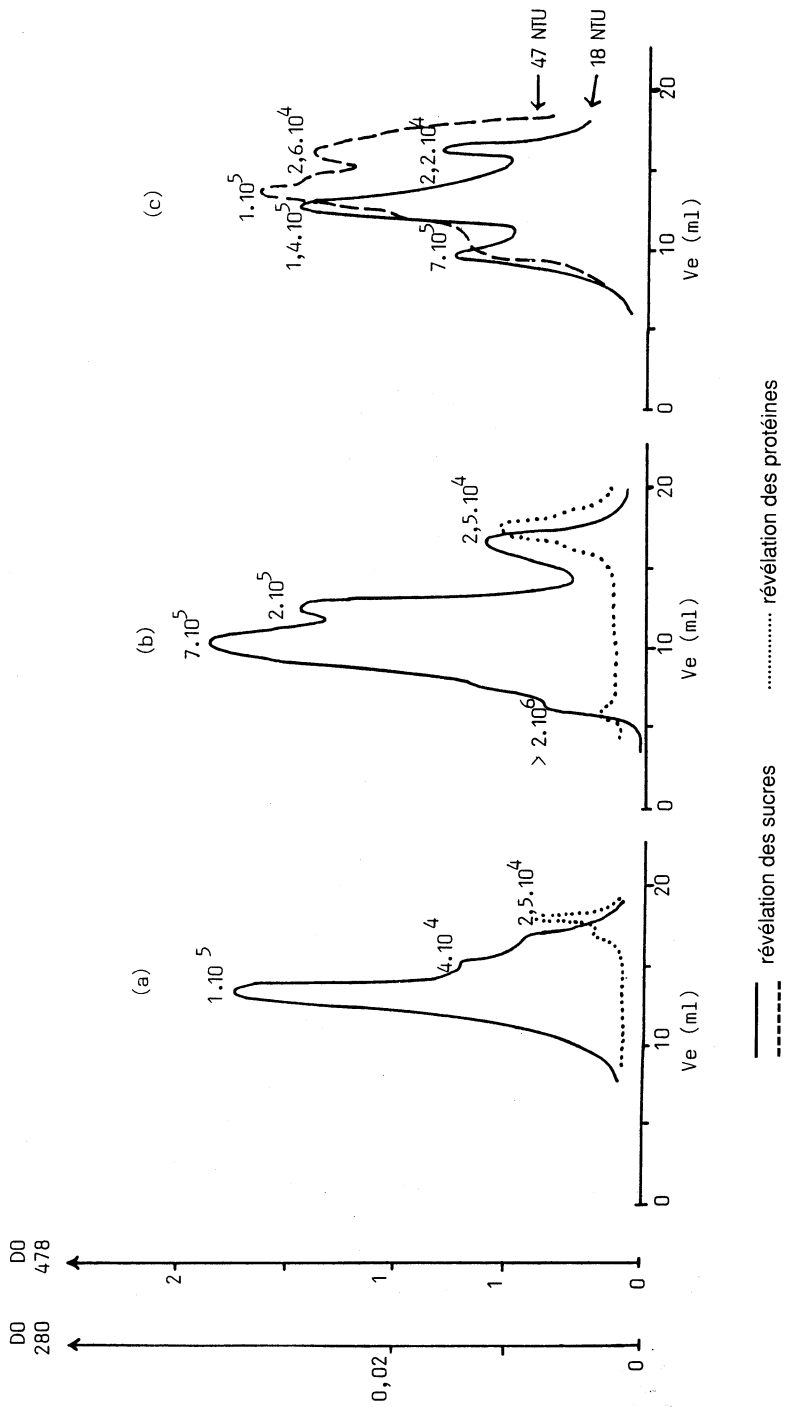


Fig. 3 — Chromatogrammes sur Superose 6 HR 10/30 de colloïdes de moût de Chardonnay (a), de colloïdes de *Saccharomyces cerevisiae* après autolyse (b) et de colloïdes de vins en fin de fermentation alcoolique (c)

Les résultats obtenus dans les essais rapportés confirment cette observation (figures 2a et 2b). La production de macromolécules varie très fortement suivant l'intensité de la clarification. Pour un même essai, le lot témoin (non débourbé ou présentant la turbidité la plus élevée) s'enrichit le moins en macromolécules au cours de la fermentation alcoolique.

Dans la mesure où tous les vins sont soutirés en fin de fermentation alcoolique, ce phénomène pourrait s'expliquer par un temps de contact entre le milieu et les levures plus limité pour le lot témoin que pour les lots clarifiés en raison de la fermentation alcoolique plus rapide dans le lot témoin. Cependant, pour une même durée de fermentation alcoolique (12 jours) et donc un même temps de contact (essai n°5), nous observons un plus fort enrichissement en macromolécules d'origine levurienne sur les lots clarifiés (respectivement 64 et 120 mg/l) que sur le lot témoin (0 mg/l) (tableau I et figure 2b). La production active de macromolécules par les levures au cours de la fermentation alcoolique dépendrait donc bien de la richesse initiale du moût en colloïdes.

Le fractionnement de macromolécules d'origine différente, par chromatographie d'exclusion-diffusion moyenne pression est donné sur la figure 3.

Les macromolécules du raisin (figure 3a) et des levures (figure 3b) ont une nature différente : celles de raisin sont plus homogènes et présentent essentiellement une fraction polysaccharidique importante d'environ 100.000 Da et une deuxième fraction plus faible d'un poids moléculaire d'environ 40.000 Da. Les macromolécules de levures renferment des polysaccharides de haut poids moléculaire : 2 à $7 \cdot 10^5$ Da et supérieur à $2 \cdot 10^6$ Da qui n'existent pas dans le raisin.

Le fractionnement des colloïdes de deux vins en fin de fermentation alcoolique (figure 3c) provenant d'un même moût présentant deux niveaux de clarification différents : respectivement 47 et 18 NTU confirme la présence des macromolécules d'origine levurienne. En effet, nous retrouvons dans les deux cas des fractions polysaccharidiques de haut poids moléculaire : $7 \cdot 10^5$ et $1,4 \cdot 10^5$ Da et il y en a légèrement plus dans le lot le plus fortement clarifié.

III — RELATION ENTRE LA DURÉE DE LA FERMENTATION ALCOOLIQUE ET LA DURÉE DE LA FERMENTATION MALOLACTIQUE

Les suivis de fermentations alcoolique et malolactique pour les essais 3, 4, 7 et 8 sont présentés dans la figure 4.

Ce sont les lots témoins peu débourbés conduisant à une courte fermentation alcoolique qui donnent des vins où les durées de fermentations malolactiques sont les plus longues. Inversement, ce sont les lots les plus clarifiés, lots où la fermentation alcoolique est la plus longue, qui présentent la meilleure fermentescibilité malolactique. Les écarts vont de 7 à 11 jours pour les fermentations malolactiques induites par ensemencement bactérien (essais n° 4 et n°8) et de 4 à 32 jours pour les fermentations malolactiques se réalisant en flore indigène (essais n° 3 et n°7).

Il semble donc exister une relation inverse entre la fermentescibilité alcoolique et la fermentescibilité malolactique, une meilleure maîtrise de la première ayant une incidence directe sur la seconde.

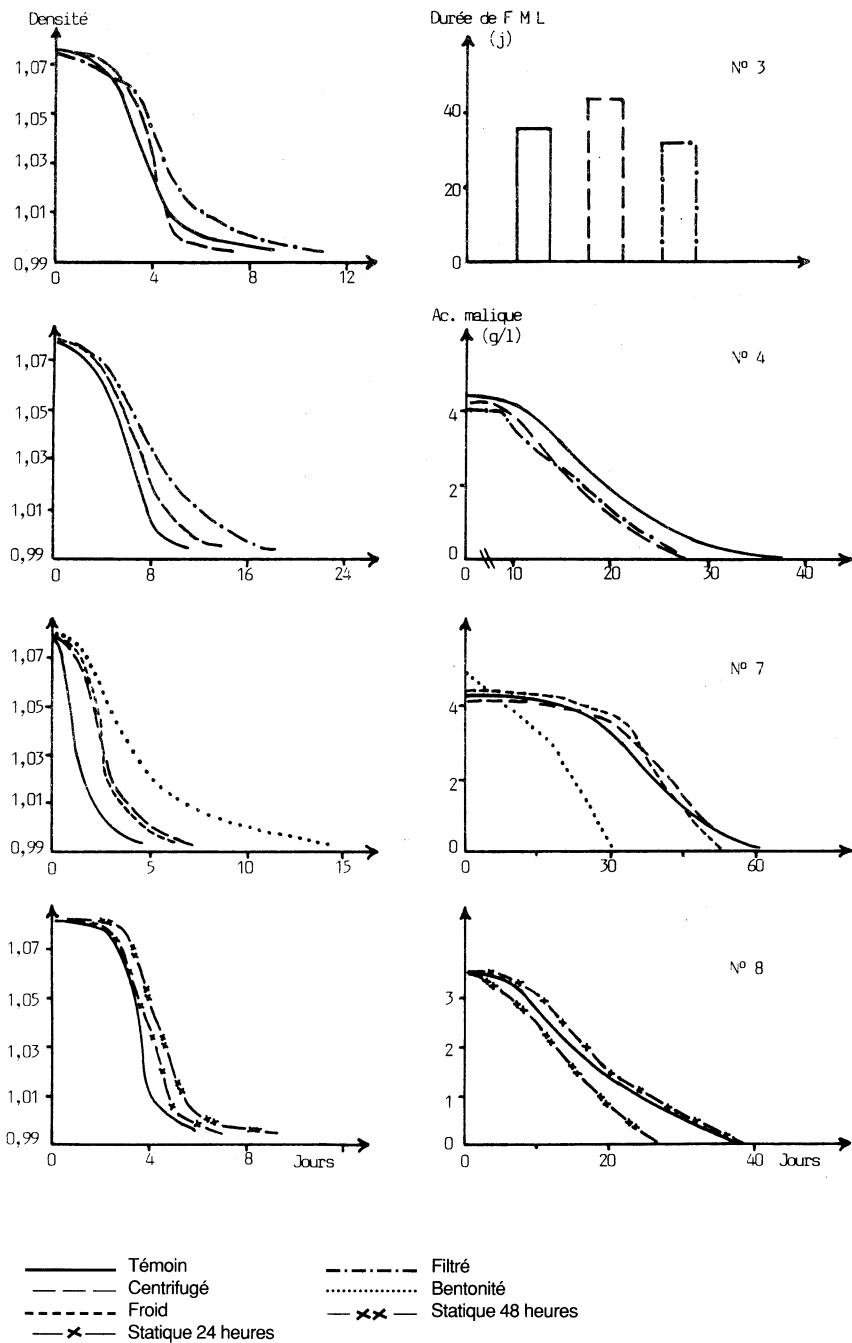


Fig. 4 — Evolution au cours du temps des densité et de l'acide malique (dosage enzymatique pour les essais 4, 7 et 8 et chromatographie sur papier pour l'essai 3).

La teneur plus importante de macromolécules d'origine levurienne dans les vins issus de moûts très clarifiés favoriserait donc l'activité malolactique des bactéries lactiques. Plusieurs rôles positifs des macromolécules de levures vis-à-vis des bactéries lactiques peuvent être envisagés : un rôle de fixation d'inhibiteurs bactériens présents dans le milieu tels que les acides gras C10 et C12 par exemple (LONVAUD-FUNEL et al., 1985), un rôle nutritionnel par la possibilité d'une hydrolyse enzymatique partielle de ces constituants macromoléculaires (GUILLOUX-BENATIER et al., 1993).

CONCLUSION

Conformément aux résultats d'OLLIVIER et al. (1987), ces essais montrent que la teneur en macromolécules solubles dans le moût après clarification joue un rôle important sur le déroulement et l'achèvement de la fermentation alcoolique en vinification en blanc.

Les moûts très clarifiés conduisent à des fermentations alcooliques lentes en relation généralement avec de faibles populations levuriennes. Bien que nous observons, pour une même souche de levure, une production variable de macromolécules dans le milieu fermentaire sur les différents moûts testés, il est toujours constaté une relation entre la quantité de macromolécules produites au cours de la fermentation alcoolique et le niveau initial de clarification du moût. Nous confirmons ainsi que ce sont dans les moûts les plus appauvris en colloïdes que l'on note le plus fort relargage de macromolécules d'origine levurienne.

En outre, nous constatons que les vins issus de moûts à faible turbidité présentent une meilleure fermentescibilité malolactique. Le rôle positif de l'enrichissement du milieu en macromolécules levuriennes sur la croissance et l'activité malolactique des bactéries lactiques, déjà mis en évidence en milieu synthétique (HEMAMI, 1988), semble se confirmer en milieu vin. Les mécanismes physiologiques impliqués dans ces phénomènes sont actuellement en cours d'étude dans notre laboratoire.

Remerciements :

Nous remercions l'Union Auboise des Producteurs de Vins de Champagne, la Maison Bouchard Père & Fils et les étudiants, A. BOLLOTTE, A. BRUMWELL, B. COLOMER MARTI, B. FERREIRA, S. MINOT et F. ROGER, qui ont participé aux différents essais.

Manuscrit reçu le 18 octobre 1993 ; accepté pour publication le 10 décembre 1993

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BERGMEYER H.U., 1971. *Methods of enzymatic analysis*. Academic Press, New York.

- BRUMWELL A., 1993. Influence des macromolécules sur les fermentescibilités alcoolique et malolactique. *Mémoire Ingénieur des Techniques Agricoles*, Ecole Supérieure d'Agriculture de Barcelone et Université de Bourgogne.
- DELFINI C., CONTERNO L., GIACOSA D., COCITO C., RAVAGLIA S. et BARDI L., 1992. Influence of clarification and suspended contact on the oxygen demand and long-chain fatty acid contents of free run, macerated and pressed grape musts, in relation to acetic acid production. *Vitic. Enol. Sci.*, **47**,69-75.
- DUBOIS M., GILLESK A., HAMILTON J.J., REBERS H. et SMITH F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, **28**, n°3, 350-356.
- EDWARDS C.G., BEELMAN R.B., BARTLEY C.E et McCONNELL A.L., 1990. Production of decanoic acid and other volatil compounds and the growth of yeast and malolactic bacteria during vinifications. *Amer. J. Enol. Viticult.*, **41**, N°1,48-56.
- FEUILLAT M., PEYRON D. et BERGER J.L., 1987. Influence de la microfiltration tangentielle des vins sur leur composition physico-chimique et leurs caractères sensoriels. Application aux vins de Bourgogne. *Bull. OIV*, **60**, n° 673-674, 227-244.
- FEUILLAT M., CHARPENTIER C., PICCA G. et BERNARD P., 1988. Production de colloïdes par les levures dans les vins élaborés selon la méthode champenoise. *Rev. Fr. Œnol.*, n°**111**, 36-45.
- FEUILLAT M., FREYSSINET M. et CHARPENTIER C., 1989. L'élevage sur lies des vins blancs de Bourgogne. II. Evolution des macromolécules : polysaccharides et protéines. *Vitis*, **28**, 161-176.
- GROAT M. et OUGH C.S., 1978. Effect of insoluble solids added to clarified musts on fermentation rate, wine composition, and wine quality. *Amer. J. Enol. Viticult.*, **29**, 112-119.
- GUILLOUX-BENATIER M., SON H.S., BOUHIER S. et FEUILLAT M.,1993. Activités enzymatiques : glycosidases et peptidase chez *Leuconostoc oenos* au cours de la croissance bactérienne. Influence des macromolécules de levures. *Vitis*, **32**, 51-57.
- HEMAMI F., 1988. Influence des macromolécules libérées par la paroi de levures de vinification sur la croissance de *Leuconostoc oenos*. *DEA Génie enzymatique*, Bioconversion, Microbiologie, Universités de Compiègne et de Bourgogne.
- HOUTMAN A.C. et DU PLESSIS C.S., 1986. Nutritional deficiencies of clarified white grape juices and their correction in relation to fermentation. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, **7**, 39-46.
- LAFON-LAFOURCADE S., GENEIX C. et RIBÉREAU-GAYON P., 1984. Inhibition of alcoholic fermentation of grape must by fatty acids produced by yeasts and their elimination by yeasts ghosts. *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**, 1246-1249.

- LLAUBERES R.M., DUBOURDIEU D. et VILLETAZ J.C., 1987. Exocellular polysaccharides from *Saccharomyces* in wine. *J. Sci. Food Agric.*, **41**, 277-286.
- LONVAUD-FUNEL A., DESENS C. et JOYEUX A., 1985. Stimulation de la fermentation malolactique par l'addition au vin d'enveloppes cellulaires de levure et différents adjuvants de nature polysaccharidique et azotée. *Connaissance Vigne Vin*, **21**, n° 1, 59-70.
- LUBBERS S., 1993. Caractérisation des macromolécules d'origine levurienne du vin. Etude des interactions avec des substances d'arômes. Application à la stabilisation tartrique. *Thèse Doctorat*, Université de Bourgogne, Mention Sciences des Aliments.
- OLLIVIER C., STONESTREET T., LARUE F. et DUBOURDIEU D., 1987. Incidence de la composition colloïdale des moûts blancs sur leur fermentescibilité. *Connaissance Vigne Vin*, **21**, n° 1, 59-70.
- RIBÉREAU-GAYON P., LAFON-LAFOURCADE S. et BERTRAND A., 1975. Le débourbage des moûts de vendange blanche. *Connaissance Vigne Vin*, **9**, n°2, 117-139.
- USSEGLIO-TOMASSET L., 1976. Les colloïdes glucidiques des moûts et des vins. *Connaissance Vigne Vin*, **10**, n° 2, 193-226.
- VOILLEY A., LAMER C., DUBOIS P. et FEUILLAT M., 1990. Influence of macromolecules and treatments on the behaviour of aroma compounds in a model wine. *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 248-251.