

Bioacidification des vins par la levure *Lachancea thermotolerans*

Ana Hranilovic¹, Vladimir Jiranek^{1,2}, Joana Coulon³, Isabelle Masneuf-Pomarede^{4,5}, Warren Albertin^{4,6}, Marina Bely⁴

¹ Department of Wine and Food Science – Université d'Adelaïde – Australie.

² The Australian Research Council Training Centre for Innovative Wine Production – Adelaïde – Australie.

³ BioLaffort – Floirac – France.

⁴ Université de Bordeaux – UR œnologie – EA 4577 – USC 1366 INRAE – Bordeaux INP – ISVV Villenave-d'Ornon – France.

⁵ Bordeaux Sciences Agro – Gradignan – France. ⁶ ENSCBP – Bordeaux INP – Pessac – France.



Extrait de la Revue
des Œnologues n° 183
search.oeno.tm.fr

Rôle des acides organiques en œnologie

Les acides organiques sont un constituant majeur de l'équilibre d'un vin. Ils définissent ses propriétés organoleptiques, en particulier la perception d'acidité, mais ils affectent également son apparence, et sa stabilité chimique et microbienne (Waterhouse et al., 2016). Six acides organiques contribuent à plus de 95 % des acides totaux du vin (**tableau 1**). Présents dans le raisin, ils peuvent être produits par le métabolisme microbien et leurs teneurs peuvent être modulées par les pratiques œnologiques. Les vins issus de climats frais sont généralement caractérisés par une acidité importante; quand elle est excessive, ces vins peuvent bénéficier d'une désacidification partielle pour rétablir l'équilibre gustatif. En revanche, les raisins issus des climats chauds présentent souvent une acidité insuffisante, nécessitant donc une acidification lors de la vinification.

L'acidification des vins

L'acidification des vins est le plus souvent effectuée par l'ajout d'acide tartrique, possible à tout moment de la vinification. L'utilisation d'autres acides organiques (ex. : l'acide malique, citrique et lactique) est également permise par l'OIV, mais ces derniers sont moins fréquemment utilisés. L'acide tartrique n'est pas métabolisé lors de la vinification; cependant, il peut être

partiellement éliminé par précipitation. Cela impose des coûts supplémentaires, qui sont loin d'être négligeables. La nécessité d'acidifier les vins augmente dans le contexte du changement climatique. Paradoxalement, les consommateurs (de plus en plus attentifs à la « naturalité » des denrées alimentaires) et les producteurs plébiscitent des vins contenant moins d'intrants ayant une connotation « chimique ». Les méthodes alternatives pour corriger l'acidité des vins sont donc recherchées, et la bioacidification (c'est-à-dire l'acidification biologique) par l'utilisation de microorganismes représente une pratique particulièrement prometteuse. La levure *Lachancea thermotolerans* est l'un des microorganismes les plus acidifiants naturellement retrouvés au sein des communautés du raisin au vin.

Bioacidification par *Lachancea thermotolerans*

Anciennement appelé *Kluyveromyces thermotolerans*, *L. thermotolerans* est une levure faisant partie de la flore indigène du raisin (Jolly et al., 2014). Elle est capable de réaliser la fermentation alcoolique (FA), mais, en conditions œnologiques, elle ne peut cependant pas la mener jusqu'à sa fin et résiste en moyenne jusqu'à 9 % vol. d'alcool en culture pure (Hranilovic et al., 2018). Cette espèce présente un caractère extrêmement rare chez les levures: la capacité de produire de l'acide lactique lors de la FA. En

■ Tableau 1 : Propriétés principales des six acides majeurs en œnologie, incluant leur structure, leur pKa (un pKa plus faible indique un acide plus fort), leurs concentrations moyennes dans les vins issus de raisins sains et leur principale origine (adapté de Waterhouse et al., 2016).

Acide	Structure	pKa dans l'eau	Concentrations typiques dans le vin (g/L)	Origine principale
Tartrique		2,98	2-10	Produits dans les raisins
Malique		3,40	0,5-7	
Citrique		3,13	0,1-0,8	
Succinique		4,21	0,5-1	Produits pendant la fermentation alcoolique et/ou malolactique
Lactique		3,86	0-3	
Acétique		4,76	0,1-0,5	

œnologie, la production du lactate est plutôt l'apanage des bactéries lactiques, responsables de la fermentation malolactique (FML). Mais contrairement à la FML, le substrat pour la production de l'acide lactique par *L. thermotolerans* n'est pas l'acide malique, mais les sucres du moût (**figure 1**). La transformation d'une partie des sucres en lactate au lieu de l'éthanol est donc associée d'une part à une diminution de pH/l'augmentation de l'acidité totale (AT), et d'autre part à la réduction de la teneur éthanol/sucres des vins (Hranilovic et al., 2018). Le faible rendement d'éthanol représente donc un autre atout de cette espèce, car les raisins peu acides sont souvent trop riches en sucres, donnant des vins plus alcoolisés. Bien qu'appartenant à la même espèce, les souches de *L. thermotolerans* présentent des caractéristiques œnologiques extrêmement variables, dont la capacité de bioacidification. L'objectif de nos travaux était donc de sélectionner la souche la plus adaptée pour répondre aux enjeux de l'œnologie moderne.

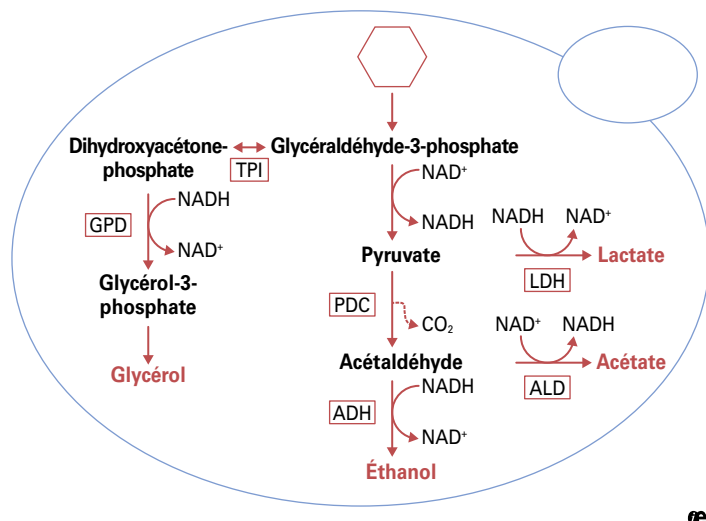
Travaux de sélection de souches particulièrement acidifiantes de *Lachancea thermotolerans*

Notre quête de la meilleure souche pour une application en œnologie a débuté par la collecte de nombreux isolats de *L. thermotolerans*, aujourd'hui en conservation au sein de l'Institut des sciences de la vigne et du vin (ISVV) à Bordeaux. Cette collection comprend environ 200 isolats provenant de vignobles ou de chais de grandes régions viticoles du monde entier, « anciens » aussi bien que « nouveaux », et provenant également d'habitats « naturels » (ex. : forêts du Canada, cactus d'Hawaï). Cette approche nous a permis d'avoir accès aux meilleures souches possibles, tout en étudiant leur diversité et leur adaptation à différents environnements.

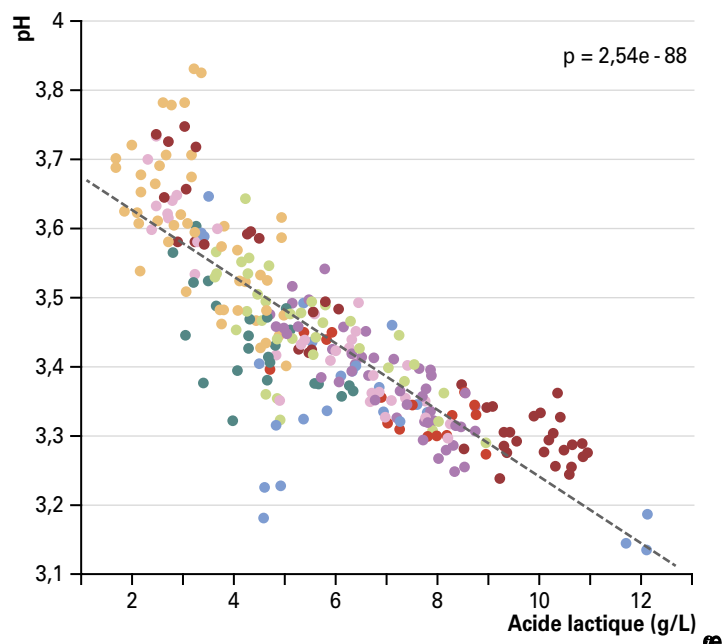
Nous avons d'abord développé des marqueurs moléculaires appelés « microsattellites » pour caractériser la diversité génétique de la col-

■ Figure 1 : Métabolisme central chez *Lachancea thermotolerans*

, une levure capable de transformer une proportion des sucres de raisins en acide lactique au lieu de l'éthanol lors de la fermentation alcoolique, grâce à l'activité enzymatique de lactate déshydrogénase (LDH; Hranilovic et al., 2018).



■ Figure 2 : Production d'acide lactique de 94 souches de *Lachancea thermotolerans* en cultures pures et effet sur le pH des vins issus d'un moût du chardonnay (~240 g/L sucres; pH 3,6) (Hranilovic et al., 2018).



lection (Hranilovic et al., 2017). Un sous-ensemble de souches a été caractérisé dans un moût de chardonnay (~240 g/L sucres; pH 3,6) afin de comparer de nombreux paramètres d'intérêt œnologique, dont la capacité fermentaire, le rendement de métabolites et la production des composés aromatiques (Hranilovic et al., 2018). Les analyses issues de 282 fermentations individuelles ont montré une diversité insoupçonnée au sein de l'espèce; ainsi, dans un même moût, certaines souches produisent moins de 1 g/L de lactate, tandis que d'autres vont jusqu'à plus de 10 g/L (figure 2). Cette variation en lactate (0,8-12 g/L) est significativement corrélée au pH des vins, qui oscillent entre 3,2 et 3,8 (figure 2). Les souches associées à l'œnologie sont, en règle générale, plus aptes à fermenter le moût de raisin que les souches provenant d'autres écosystèmes. Vingt souches ont ensuite été testées dans des conditions œnologiques diverses, en variant les cépages utilisés, la richesse en sucres des moûts, le niveau de sulfitage ou la température de la fermentation (Favier et al., 2021). Suite à leur caractérisation en culture pure, les souches présentant des propriétés œnologiques intéressantes dans la plupart des conditions testées ont été retenues pour des essais en cultures mixtes avec *Saccharomyces cerevisiae*.

Lachancea thermotolerans et *Saccharomyces cerevisiae*: un duo de choc en œnologie!

Quelle que soit la souche, *L. thermotolerans* n'est pas capable de terminer la FA en conditions œnologiques. Elle doit donc être utilisée en combinaison avec *S. cerevisiae*, soit en co-inoculation (c'est-à-dire par une inoculation simultanée des deux espèces), soit en inoculation séquentielle, en ensemençant d'abord *L. thermotolerans*, puis *S. cerevisiae* après un certain délai. Ces deux moda-

lités d'inoculation ont été testées en utilisant 5 souches différentes de *L. thermotolerans* (LT1-LT5). Une culture pure de *S. cerevisiae* a été rajoutée pour comparaison (SC; Zymaflore® Spark), de même qu'une fermentation « spontanée » (SP) sans ajout de levains. Les essais ont été menés dans un moût de merlot (~310 g/L sucres; pH 3,9), le cépage le plus planté en France, et souvent caractérisé par sa perte d'acidité et sa teneur accrue en sucres (Boursiquot et al., 2009).

Les résultats (tableau 2) montrent la variation des paramètres œnologiques des vins en fonction des souches de *L. thermotolerans*, mais aussi en fonction de leur mode d'inoculation, avec, comme attendu, une plus forte expression de *L. thermotolerans* lors des inoculations séquentielles que lors des co-inoculations.

L'arrêt de la FA dans certains vins (ex. : LT1_seq) suggère l'existence d'incompatibilités entre certaines souches de *L. thermotolerans* et la souche *S. cerevisiae* utilisée, potentiellement liées à des interactions microbiennes (ex. : la compétition pour les nutriments et l'oxygène, la production de molécules inhibitrices; Jolly et al., 2014). L'identification de couples compatibles est donc importante afin d'éliminer les risques de fermentations languissantes ou d'arrêts précoces. Parmi les vins secs, cofermentés avec des souches compatibles, une dichotomie entre les modalités acidifiantes et non acidifiantes a été mise en évidence (Hranilovic et al., 2021). Notamment, la souche LT2 entraîne une diminution de 0,5 point de pH en inoculation séquentielle, et 0,4 point en co-inoculation, tandis que le pH des vins LT3 est comparable à ceux du témoin *S. cerevisiae* (pH 3,9) (tableau 2). L'acidité totale montre des tendances inverses. Les autres souches de *L. thermotolerans* ont des capacités d'acidification intermédiaires. La modulation de pH/AT est associée à la produc-

tion de l'acide lactique: elle est supérieure à 8 g/L pour la modalité LT2_seq, mais n'atteint que 1 g/L pour LT3_seq (**tableau 2**). Cette variation influence également la teneur en éthanol des vins, avec une diminution de 0,9 % vol. dans le vin LT2_seq par rapport au témoin *S. cerevisiae* (16,5 % vol.) (**tableau 2**). La modulation des paramètres œnologiques a également un fort impact sur la couleur des vins, avec une augmentation de l'intensité et de la stabilité de la couleur liée à l'acidification et la diminution d'alcool (**figure 3**).

Comparaison de la bioacidification par *Lachancea thermotolerans* et de l'acidification par ajout d'acides

La souche LT2 présente une capacité remarquable de bioacidification des vins. L'étape suivante a consisté en la comparaison des profils de vins bioacidifiés par LT2 avec ceux de vins acidifiés via l'ajout de différents acides organiques, tout en évaluant l'intérêt de vin cofermenté avec LT2 pour des assemblages. Un moût de raisins mûrs, toujours de merlot, a été fermenté soit par inoculation séquentielle de LT2 et *S. cerevisiae*, soit *S. cerevisiae* seule (**figure 4**). Le pH du vin issu du témoin *S. cerevisiae* a été ajusté par l'ajout d'acide tartrique (SC + TAR) ou d'acide lactique (SC + LAC), afin d'obtenir le même pH que le vin cofermenté avec LT2. Les deux vins initiaux ont également été assemblés en trois proportions (3:1; 1:3; 1:1), et tous les vins ont été comparés sur un plan analytique et sensoriel.

Après la FA, le vin bioacidifié avec LT2 montre une perte de pH de 0,4 unité par rapport au vin fermenté par *S. cerevisiae* seule (3,6 et 4,0, respectivement), ce qui correspond à une augmentation de l'AT de 3,2 à 6,1 g/L en H₂SO₄ (**figure 4**). Là encore, la bioacidification est

■ **Tableau 2: Paramètres œnologiques de 12 vins de merlot issus d'une culture pure de *Saccharomyces cerevisiae* (témoin SC), de 2 modes d'inoculation (LT/SC): co-inoculation (co) ou d'inoculation séquentielle (séq: après 48 h) avec 5 souches de *Lachancea thermotolerans* (LT1-LT5) et d'une fermentation « spontanée » (SP). Les valeurs représentent les moyennes de triplicatas et les niveaux de significativité (ANOVA: 5 %) (adapté de Hranilovic et al., 2021).**

Modalité	Sucres résiduels (g/L)	Éthanol (% vol.)	pH	AT (g/L H ₂ SO ₄)	Acide lactique (g/L)
SC	< 0,1 c	16,5 a	3,9 a	3,3 f	0,4 e
LT1_co	0,2 c	16,0 c	3,5 d	5,8 bc	5,4 b
LT1_séq	8,2 a	15,0 e	3,4 e	7,2 a	7,6 a
LT2_co	0,4 c	16,1 bc	3,5 d	5,4 cd	3,7 c
LT2_séq	1,4 c	15,6 d	3,4 e	7,3 a	8,1 a
LT3_co	< 0,1 c	16,4 ab	3,9 a	3,4 f	0,6 e
LT3_séq	1,4 c	16,2 abc	3,9 a	3,3 f	1,0 e
LT4_co	0,2 c	16,3 abc	3,7 b	4,0 e	1,8 de
LT4_séq	3,8 b	15,6 d	3,6 c	5,3 d	3,4 cd
LT5_co	0,2 c	16,1 c	3,6 cd	5,0 d	3,6 c
LT5_séq	2,2 bc	15,7 d	3,5 cd	6,0 b	5,8 b
SP	1,2 c	16,2 abc	3,9 a	3,1 f	1,7 e

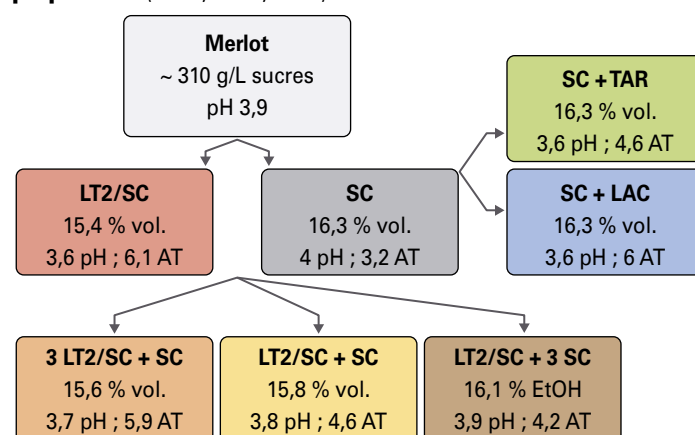
■ **Figure 3: Couleurs de 12 vins de merlot issus de différentes modalités.** Les échantillons sont présentés dans le même ordre que dans le **tableau 2** (les modalités se lisent de haut en bas dans le **tableau 2** et de gauche à droite dans la **figure 3**).



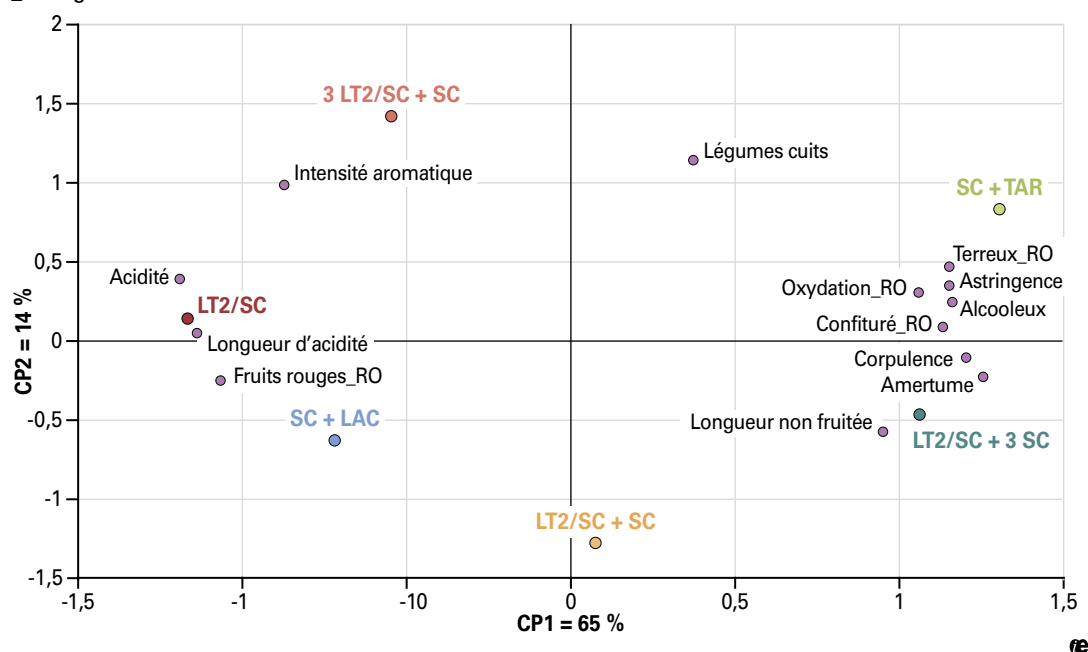
accompagnée de la diminution de la teneur en éthanol de 0,9 % vol. (**figure 4**). À pH équivalent (3,6), le vin acidifié par l'ajout d'acide lactique possède une AT plus élevée que le vin acidifié par de l'acide tartrique (6,0 et 4,6 g/L, respectivement) (**figure 4**) puisque l'acide lactique est moins fort que l'acide tartrique (pK supérieur) (**tableau 1**). Les paramètres d'acidité et le taux d'éthanol dans les trois assemblages dépendent de la proportion du mélange (**figure 4**). Sur le plan sensoriel, une dégustation à l'aveugle a été proposée à 30 dégustateurs expérimentés, lesquels devaient noter les intensités de 46 descripteurs en utilisant la méthode sensorielle « Rate-All-That-Apply » (RATA, permettant d'évaluer tous les descripteurs jugés pertinents par les dégustateurs). Les

dégustateurs détectent des différences significatives dans ces vins pour 13 des 46 descripteurs. Ceux-ci sont visualisés via une analyse en composantes principales (ACP) permettant de mieux comprendre les profils sensoriels de chaque vin (**figure 5**).

■ **Figure 4: Représentation des essais de vinification, d'acidification et d'assemblage avec les taux d'éthanol, pH et acidité totale (g/L acide H₂SO₄) des vins LT2/SC (inoculation séquentielle de LT2 et *S. cerevisiae*), SC (*S. cerevisiae* témoin), SC + TAR (témoin acidifié à l'acide tartrique), SC + LAC (témoin acidifié à l'acide lactique) et assemblages de LT2/SC et SC en trois proportions (3:h1; 1:h3; 1:h1).**



■ **Figure 5: Profils sensoriels de vins visualisés via l'ACP en utilisant 13 descripteurs significativement affectés par les modalités de vinification décrites dans la figure 4.** L'abréviation _RO signifie rétroolfaction.



Le vin bioacidifié avec LT2 est caractérisé par une acidité plus élevée, ainsi que la perception rétroolfactive de « fruits rouges ». Le vin témoin fermenté uniquement avec *S. cerevisiae*, puis acidifié avec de l'acide tartrique (SC + TAR) présente un profil complètement différent, moins acide mais plus amer, plus alcooleux, astringent et corpulent, avec des rétroolfactions confiturées et terreuses (figure 5). A contrario, le vin témoin acidifié avec de l'acide lactique (SC + LAC) ressemble plutôt au vin bioacidifié avec LT2, et est perçu comme moins « mûr » et plus « frais » par rapport au vin acidifié à l'acide tartrique. Pourtant, le pH de ces deux vins sont équivalents, de même que leur taux d'alcool et leurs compositions aromatiques et phénoliques. Ce qui diffère est leur AT; considérée comme un meilleur indicateur de la perception d'acidité des vins que le pH (Waterhouse et al., 2016). Avec une AT supérieure, le vin SC + LAC est donc perçu comme plus acide que le vin SC + TAR et cette différence de perception de l'acidité influence les autres attributs sensoriels (ex. : l'amertume, l'astringence, la corpulence et les saveurs des vins) par des mécanismes d'interactions perceptives. Les profils sensoriels des trois assemblages obtenus en utilisant trois proportions différentes du vin bioacidifié avec LT2 sont également distincts et comme leur composition chimique, modulés en fonction du rapport d'assemblage. Par exemple, l'assemblage à prédominance du vin LT2 (3 LT2/SC + SC) est le plus proche de la modalité LT2/SC, tandis que l'assemblage à prédominance du témoin *S. cerevisiae* (LT2/SC + 3 SC) ressemble plutôt au vin SC acidifié à l'acide tartrique (figure 5). Ces travaux confirment le potentiel des vins issus de la cofermentation de LT2 et SC pour s'intégrer dans des itinéraires d'assemblage permettant d'apporter de la fraîcheur à des vins qui en manquent.

Stabilisation microbiologique des vins par l'utilisation de *Lachancea thermotolerans*

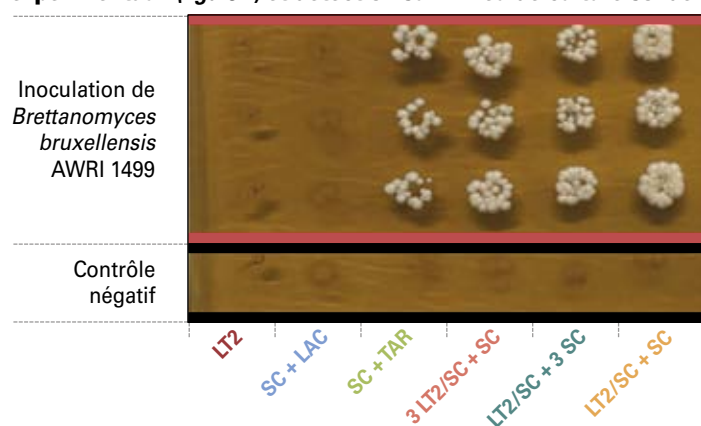
L'intérêt de la souche LT2 sur le plan analytique et sensoriel des vins et de leurs assemblages est indéniable, notamment par la modulation positive de l'acidité des vins. Pourtant, son potentiel œnologique ne s'arrête pas là; il comprend également des solutions de stabilisation microbiologique pour des vins sans (ou avec peu) de SO₂. L'acide lactique est un inhibiteur des bactéries lactiques, ce qui permet, si l'on souhaite s'affranchir de

FML spontanées, d'envisager cet itinéraire, notamment dans le cadre de vins blancs et rosés avec moins ou sans SO₂. La FML est peu probable à des concentrations d'acide lactique de 4 g/L et au-delà (Favier et al., 2021; Snyder et al., 2021), ce qui doit également être pris en considération si elle est souhaitée.

Nos résultats préliminaires indiquent également que les vins fermentés partiellement avec LT2 pourraient défavoriser la croissance de *Brettanomyces bruxellensis*, la principale levure d'altération en œnologie. En effet, après son inoculation, la croissance d'une souche de *B. bruxellensis* (AWRI 1499) est inhibée dans le vin issu de l'inoculation séquentielle de LT2, ainsi que dans le vin fermenté par le témoin *S. cerevisiae* acidifié par de l'acide lactique (SC + LAC) (figure 6). La présence de *B. bruxellensis* dans le vin SC acidifié avec l'acide tartrique (SC + TAR) et les trois assemblages indiquent que l'acide lactique est impliqué dans l'inhibition de *B. bruxellensis* en fonction de sa concentration, mais des recherches supplémentaires sont nécessaires afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans cette inhibition pour pouvoir rationaliser la lutte contre *B. bruxellensis*.

NDLR: Les références bibliographiques concernant cet article sont disponibles sur le site internet de la Revue des Œnologues: search.oeno.tm.fr

■ **Figure 6: Présence ou absence de *Brettanomyces bruxellensis* (souche AWRI 1499) après son inoculation dans des vins expérimentaux (figure 4) et détection sur milieu de culture solide.**



revue des
œnologues
Sciences et techniques de la vigne et du vin



Article publié avec l'aimable autorisation de la Revue des Œnologues

N° 183 - Avril 2022 – p. 39 à 42

" Bioacidification des vins par la levure *Lachancea thermotolerans* " – Ana Hranilovic, Vladimir Jiranek,

Joana Coulon, Isabelle Masneuf-Pomarede, Warren Albertin, Marina Bely

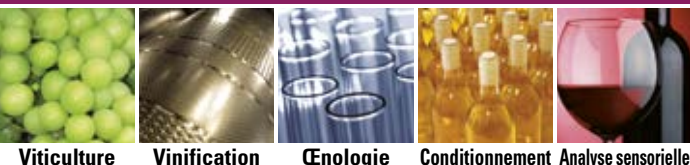
La référence internationale de l'actualité scientifique et technique vitivinicole, depuis plus de 44 ans en France et dans 60 pays

■ Plus de 1 200 articles archivés par mots clés search.oeno.tm.fr

■ Pour tout contact : infos@mail.oeno.tm.fr ■

revue des œnologues

Sciences et techniques de la vigne et du vin
et des techniques vitivinicoles et œnologiques



Le trimestriel de
tous les acteurs
de la filière
vitivinicole

Viticulture Vinification Œnologie Conditionnement Analyse sensorielle

L'actualité scientifique & technique

- Depuis plus de 40 ans, dans 60 pays
- Revue internationale en langue française
- Viticulture | Œnologie | Conditionnement

Le trimestriel des acteurs de la filière

« Les lecteurs de la Revue des Œnologues sont à la recherche d'informations fiables et de conseils techniques précis pour réaliser des investissements concrets et mettre en place des solutions opérationnelles en viticulture et œnologie.

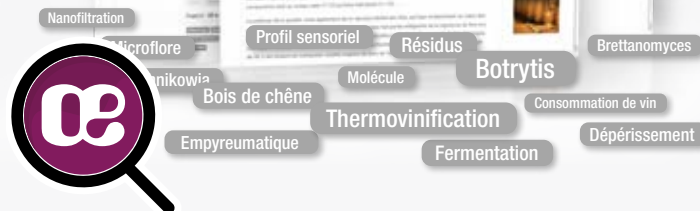
Aujourd'hui, plus que jamais, il est indispensable d'être bien informé et ce, par des professionnels conscients des réalités et des enjeux techniques de la filière ».

Henri-Laurent Arnould

Ingénieur agronome œnologue
Directeur de la Revue des Œnologues



search.oeno.tm.fr



À la source de l'information

- Accès libre à un large corpus d'informations scientifiques & techniques
- Informations évaluées et sélectionnées, depuis plus de 40 ans, par la Revue des Œnologues

Plus vite à l'essentiel...

- Accès rapide par mots-clés
- Résumés, bibliographies, listes d'articles
- Plus de 6 000 articles et 5 000 contributeurs



search.oeno.tm.fr

Moteur de recherche | Viticulture
Œnologie | Revue des Œnologues