J. Int. Sci. Vigne Vin, 1997, **31**, n°4, 197-202

ÉVALUATION DE L'ÉTABLISSEMENT DES LEVAINS MALOLACTIQUES AU SEIN DE LA MICROFLORE BACTÉRIENNE INDIGENE

EVALUATION OF THE SETTLING OF MALOLACTIC STARTERS WITHIN THE INDIGENOUS MICROFLORA OF WINES

GINDREAU E., JOYEUX Annick, DE REVEL G.,
CLAISSE O. et LONVAUD-FUNEL Aline

Faculté d'Œnologie, Unité associée INRA/Université Victor Segalen Bordeaux 2
351, cours de la Libération, 33405 Talence (France)

Résumé : L'expérimentation porte sur six préparations industrielles de levains malolactiques. La première partie du travail a consisté à établir le profil de restriction des souches utilisées. Parmi les six levains, on retrouve le même profil pour trois. L'étude conduite avec la sonde de bactériophage confirme que ces trois levains ont probablement été préparés avec la même souche.
Dans la plupart des lots inoculés, les profils caractéristiques des levains sont retrouvés prédominants en fin de fermentation malolactique. Malgré la présence d'une population élevée et active de bactéries indigènes, les levains semblent avoir participé efficacement à la fermentation. Il reste à établir l'incidence de chacun des levains sur les caractères des vins obtenus.

Abstract : Six malolactic starters were experimented. The objective was an evaluation of the capacity of each one to settle in different wines. First we obtained the genomic DNA fingerprinting with *Not* I a rare cutting enzyme after pulse field gel electrophoresis (PFGE). Previous results with *Leuconostoc œnos* strains of our collection showed that this enzyme was the most appropriated for identification at the strain level. However, we did not obtain six different patterns, three starters showed the same. Therefore *Apa* I and *Sfi* I patterns were also established. Contrary to the expected results A, B and C finally had the same fingerprinting with the three enzymes. Another investigation was conduced using the Southern hybridization of *EcoR*I restricted DNA with the ϕ MC 10 prophage DNA as probe. Our again all three starters showed the same pattern. They probably were prepared with the same strain. Wines in vat or barrels were inoculated just after racking. Malolactic fermentation had already begun in some of them before inoculation. However malic acid was degraded more quickly in all the inoculated wines than in the controls. The PFGE patterns were obtained from bacteria isolated from wines at the end of malolactic fermentation. In 15 cases of 21, the pattern of the starter appeared alone or superimposed with other bacteria. This proved that, even in the worst conditions of this experimentation, where the indigenous microflora was very abundant and active malolactic starters could survive and predominate. The influence of these starters on the sensorial quality of wines needs to be studied.

Mots clés : levains malolactiques, identifications des souches, électrophorèse en champ pulsé

Keywords : malolactic starters, strain identification, pulse field gel electrophoresis

Depuis le début des années 70, les œnologues ont envisagé de maîtriser le déclenchement de la fermentation malolactique par l'addition de cultures concentrées de bactéries lactiques, de l'espèce *Leuconostoc œnos* (*Œnococcus œni*) le plus souvent. Mais c'est seulement depuis quelques années que les préparations industrielles proposées se révèlent véritablement efficaces. Les premières générations sont des préparations lyophilisées de *L. œnos* de forte concentration, environ 10^{11} à 10^{12} CFU/g, dont le protocole d'utilisation prévoit une phase de réactivation (JOYEUX et LONVAUD-FUNEL, 1985). Leur utilisation est relativement aisée lorsque la réactivation ne comporte qu'une incubation de 1 à 2 jours en milieu nutritif ; elle devient beaucoup plus lourde lorsque le protocole prévoit également plusieurs "pieds de cuve" successifs obtenus par inoculation de volumes croissants de vin. Cette réactivation est indispensable à la réussite de l'opération ; elle assure le maintien de la survie des bactéries inoculées. Les recherches plus récentes sur les bases fondamentales des mécanismes d'adaptation des bactéries aux milieux hostiles (GARBAY et LONVAUD-FUNEL, 1996) ont abouti finalement à l'obtention de préparations industrielles efficaces même sans réactivation préalable (NIELSEN *et al.*, 1996).

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

Il est bien établi par ailleurs que la fermentation malolactique ne se limite pas à une désacidification du vin. La transformation d'un grand nombre de substrats provoque un changement organoleptique conséquent. Les analyses sensorielles effectuées à l'occasion de nombreux essais de préparations industrielles ont toujours démontré des différences entre les lots inoculés par chacune d'elle (HENICK-KLING *et al.*, 1993 ; SAUVAGEOT et VIVIER, 1997). Il n'est toutefois pas possible jusqu'ici d'identifier les composants du vin impliqués. En outre pour une même microflore, le changement organoleptique varie avec la vitesse de la fermentation malolactique. L'exemple le mieux connu est celui du diacétyle et de l'acide acétique, principaux produits du métabolisme de l'acide citrique, dont les concentrations finales dépendent des conditions de croissance des bactéries (De REVEL *et al.*, 1989). Dans l'étude de l'incidence organoleptique des souches industrielles, il est nécessaire, d'une part de relever tous les paramètres décrivant l'évolution de la fermentation malolactique, et d'autre part d'établir que la souche inoculée s'est bien implantée, c'est-à-dire qu'elle a survécu au choc de l'inoculation avant de se multiplier.

Seule l'analyse de l'ADN génomique permet d'identifier une souche au sein d'une espèce. Contrairement aux levures, les bactéries n'ont qu'un chromosome. La variation de certaines portions de cet ADN permet d'identifier une souche. Elle peut être mise en évidence par l'hybridation d'oligonucléotides ou par la restriction avec des enzymes spécifiques. Dans le premier cas, la PCR avec des amorces aléatoires est la méthode utilisée. Dans le deuxième cas, il s'agit d'observer le résultat de l'hydrolyse de l'ADN en séparant les fragments générés par électrophorèse. Les méthodes sont alors le ribotypage (hydrolyse avec des enzymes à site fréquent de coupure, suivie d'une hybridation avec une sonde d'ADN codant pour l'ARN ribosomique) ou l'analyse électrophorétique en champ pulsé (hydrolyse avec des enzymes à site rare de coupure et séparation des fragments en champ alterné). La PCR aléatoire et le ribotypage se sont révélés mal adaptés pour des souches de *L. oenos*, en raison pour la première du manque de reproductibilité et pour la deuxième de la faible variabilité de l'ADN ribosomique (LE JEUNE et LONVAUD-FUNEL, 1997). Jusqu'ici seuls les profils obtenus en champ pulsé ont permis d'identifier les souches (DANIEL *et al.*, 1993) ; nous utilisons cette méthode dans ce travail. Les essais rapportés ont pour but d'évaluer l'aptitude des souches industrielles à s'implanter dans le vin, malgré les conditions très favorables à la microflore indigène rencontrées lors de ce millésime 1997 en bordelais.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I — LEVAINS EXPÉRIMENTÉS

Les préparations industrielles utilisées pour cette expérimentation sont fournies sous forme lyophilisées ; elles sont notées de A à F. Quatre d'entre elles font partie de la nouvelle génération des levains malolactiques prêts pour l'inoculation directe, les deux autres doivent être réactivées plus ou moins longuement. Tous les levains ont été inoculés en suivant les indications données par le distributeur.

II — MISE EN PLACE DES ESSAIS ET CONTRÔLES ANALYTIQUES

Les exemples décrits dans cet article concernent cinq chais. Dans tous les cas, le vin provenant d'une même cuve de fermentation alcoolique est écoulé en cuve et en barriques ou en barriques seulement, selon les disponibilités. Les essais sont répertoriés dans le tableau I. Les dénombrements de bactéries viables sont effectués par comptage des colonies formées sur milieu nutritif solide. Les dosages d'acide malique sont réalisés par voie enzymatique (Kit Boehringer Mannheim).

TABLEAU I
Conditions expérimentales

Table I — Experimental protocols

Chai	Levain	Logement du vin
I	A, B, D	Barriques
II	A, B, D	Cuve et Barriques
III	A	Cuve et Barriques
IV	A, B, C, D, F	Cuve et Barriques
V	A, B, C, D, E, F	Barriques

III — ANALYSE DES PROFILS DE RESTRICTION PAR ÉLECTROPHORÈSE EN CHAMP PULSÉ

Les profils ont été établis pour les bactéries des préparations industrielles d'une part et pour les bactéries récoltées dans les vins d'autre part. Les préparations commerciales sont mises en culture en milieu optimum pendant 1 à 2 jours à 25 °C. Après croissance, la densité optique de la suspension est mesurée à 600 mm et ajustée par dilution à $DO_{600} = 0,1$. Pour les bactéries des différents lots de vin, une culture préalable en milieu nutritif gélosé est nécessaire. Elle permet d'éliminer les composés phénoliques qui empêchent les réactions enzymatiques. L'échantillon de 0,1 ml de vin en cours ou fin de fermentation malolactique, dans lequel la concentration bactérienne est supérieure à 10^6 CFU/ml, est étalé sur le milieu solide additionné de pimaricine

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

TABLEAU II
Évaluation de l'implantation des levains commerciaux

Table II — Evaluation of settling of industrial starters

Chai	Souche et logement	Implantation
I	A	+
	B	+
	D	+/-
II	A - Cuve	+
	A - Barrique	+/-
	B - Barrique	+
	D - Barrique	+
III	A - Cuve	+
	A - Barriques	+/-
IV	A - Barriques	+
	A - Cuve	+
	B - Barrique	-
	C - Barrique	-
	D - Barrique	+
	F - Barrique	-
V	A - Barrique	+/-
	B - Barrique	-
	C - Barrique	+/-
	D - Barrique	-
	E - Barrique	+/-
	F - Barrique	-

+ : implantation totale : profil de la souche industrielle unique
+/- : implantation partielle : profil de la souche industrielle prépondérant mais trace des souches indigènes
-: pas d'implantation : profil unique de la microflore indigène

+ : total settling : single fingerprinting of the industrial starter.
+/- : partial settling : preponderant fingerprinting of the industrial strain but traces of the indigenous strains
-: no settling : single fingerprinting of the indigenous strains

pour éliminer les levures. Après 8 à 10 jours de croissance, la biomasse qui s'est développée en tapis, est récupérée dans du tampon TE (Tris 10mM, EDTA 1mM, pH 8). La densité optique de la suspension obtenue est ajustée aussi à $DO_{600} = 0,1$.

Cinq ml des suspensions bactériennes sont centrifugés 10 mm à 10 000 g. Le culot mis en suspension dans 50 µl de tampon Tris 10 mM, EDTA 100 mM, pH 7,5 est additionné de 50 µl du même tampon contenant 1 p (p/v) d'agarose à bas point de fusion maintenu à 50 °C. Le mélange est coulé dans un moule et, après solidification (15 min à 4 °C), le gel est démoulé; les "inserts" obtenus peuvent être conservés à 4 °C dans du tampon. Les cellules sont lysées en incubant les inserts dans du tampon contenant 2 mg/ml de lysozyme pendant 2 h à 37 °C. Après transfert dans du tampon contenant 2 mg/ml de pronase et 1,5 p. cent (p/v) de N-lauryl-sarcosine, puis incubation pendant 16 h à 37 °C, les inserts sont devenus transparents. Ils sont lavés plusieurs fois dans le tampon et l'hydrolyse par les enzymes de restriction (30U) dure 16 h dans le tampon spécifique (120 µl). La restriction est réalisée par les enzymes à site de coupure rare *Not* I, *Apa* I, *Sfi* I.

Après rinçage dans le tampon, les inserts sont déposés dans les puits du gel de séparation (agarose "qualité champ pulsé" 1 p. cent dans Tris 44 mM, EDTA 1 mM, acide borique 44 mM). La migration est conduite sur l'appareillage CHEF DR III (Biorad). Les conditions de migration retenues pour les restrictions avec *Not* I par exemple sont : température 15 °C, temps de pulse 1-25 secondes, durée totale 22 h, angle de réorientation 120 °, voltage 6V/cm.

IV — VÉRIFICATION PAR PROFIL DE RESTRICTION D'UN PROPHAGE

Parmi les six préparations, trois ont nécessité une détermination supplémentaire en vue d'établir leur identité. Des travaux antérieurs ont démontré que certaines souches de *L. oenos* sont lysogènes ; c'est-à-dire que leur chromosome comporte l'ADN d'un phage intégré. Les phages diffèrent par leur profil de restriction. Par ailleurs, l'ADN de phage marqué peut être utilisé comme sonde et hybride avec l'ADN de toute bactérie lysogène (POBLET et LONVAUD-FUNEL, 1996). L'analyse effectuée sur les préparations expérimentées a été effectuée en deux temps. D'abord l'ADN du phage a été utilisé comme sonde dans une hybridation "dot-blot" avec l'ADN des six souches conduite selon la méthode couramment utilisée. Ensuite, l'ADN des souches lysogènes a été soumis à l'action de l'enzyme de restriction EcoRI et les fragments ont été séparés par électrophorèse en champ constant. Après migration, l'hybridation en Southern avec l'ADN du phage fournit le profil de restriction du prophage de chaque bactérie.

RÉSULTATS

I — PROFILS ÉLECTROPHORÉTIQUES DE L'ADN DES SIX LEVAINS MALOLACTIQUES :

La figure 1 montre les profils de restriction de l'ADN obtenus avec l'enzyme *Not* I. Le nombre limité de bandes permet une interprétation rapide et simple. Pour les six levains, on observe quatre profils différents au

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)



Fig. 1 — Profils en électrophorèse en champs pulsé de l'ADN des six préparations industrielles après restriction par *Not* I.

Fig. 1 — Pulse field gel electrophoresis of *Not* I restricted DNA of the six industrial starters.

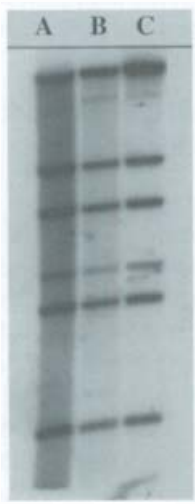


Fig. 2 — Profil en Southern de l'ADN des levains A, B et C après restriction par *Eco*RI et hybridation par l'ADN du phage.

Fig. 2 — Southern hybridization of *Eco*RI restricted DNA of starters A, B and C with the DNA of prophage ϕ MC 10 as probe.

lieu des six attendus. Les trois levains A, B et C ne peuvent pas être distingués. Cela signifie que le chromosome de chacune des souches qui les compose est coupé exactement au même endroit par l'enzyme. Ce résultat, surprenant compte tenu de la faible fréquence de site de reconnaissance de cet enzyme, conduit à répéter l'analyse avec *Apa*I également à site rare de coupure. Le résultat est le même et l'on ne peut différencier ces trois souches. L'enzyme *Sfi*I a été ensuite utilisé et conduit encore au même profil pour les trois souches. Afin de lever le doute, une analyse basée sur un principe totalement différent a été entreprise. L'ADN d'un phage de *L. oenos* ϕMC 10 (GINDREAU *et al.*, 1997) marqué a été utilisé comme sonde pour hybrider les ADN génomiques des six levains étudiés. Seuls A, B et C hybrident, signifiant qu'ils contiennent des bactéries lysogènes. La dernière investigation a consisté à hybrider avec cette sonde les ADN de ces trois levains après restriction par *Eco*RI (enzyme à site fréquent de coupure) et électrophorèse. La figure 2 montre l'exacte ressemblance entre les trois prouvant que le prophage intégré dans le chromosome de chaque souche a exactement le même profil de restriction. Comme il est peu probable que des souches d'origine différente ait intégré le même prophage, il s'agit probablement de la même souche.

II — ANALYSE EN CHAMP PULSÉ APRES RESTRICTION PAR *NOT*I DES ADN DES BACTÉRIES RÉCOLTÉES DANS LES VINS

Les échantillons destinés à l'analyse de la microflore ont été prélevés en fin de fermentation malolactique, c'est-à-dire quand la concentration d'acide malique était de l'ordre de 0,2 g/l dans les lots inoculés. A la même date, il restait plus de 0,5 g/l dans les lots témoins où, dans tous les cas, la microflore indigène s'est facilement développée aussi. La comparaison des profils des témoins non inoculés, des souches composant les levains et des bactéries récoltées dans les vins inoculés ont permis d'apprécier l'implantation. Les résultats sont rassemblés dans le tableau II et la figure 3 donne des exemples des profils obtenus.

Dans le chai I, les trois levains se sont correctement implantés, mais dans le lot inoculé avec D la microflore indigène persiste mieux que dans les autres. Dans tous les vins, la fermentation malolactique s'est déclenchée. Toutefois, elle est plus lente dans le lot témoin. Parmi les trois inoculés, même si l'on note un léger retard d'abord pour D (à J5 ou J7) puis pour A (à J12), il est sans conséquence puisqu'après 14 jours il ne reste pratiquement plus d'acide malique dans aucun d'eux (tableau IIIa).

Dans le chai II, en cuve, seul le profil du levain A est retrouvé (figure 3b, puits 3), on ne perçoit plus les bandes caractéristiques des populations indigènes (fig. 3b, puits 1 et 2). Ce n'est pas le cas dans la barrique (figure 3b, puits 4) où les deux profils, celui de A et celui des bactéries indigènes sont superposées. En outre parmi les souches indigènes, le profil a évolué différemment avec une importance notable de bactéries qui n'apparaissent pas dans le témoin. Dans tous les lots ensemencés, la dégradation de l'acide malique s'achève plus tôt que dans les lots témoins, ce qui confirme l'apport des levains. Pourtant la fermentation malolactique était déjà enclenchée au moment de l'ensemencement puisque la concentration en acide L-lactique était de 0,53 g/l. En barrique, le levain B a été plus efficace que les autres d'ailleurs sa population était un peu plus élevée.

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

TABLEAU III
Evolution de la concentration en acide malique (g/l) dans les différents lots

Table III — Evolution of malic acid (g/l) in the different trials

IIIa - Chai I : Concentration initiale 1,33 g/l
IIIa - Cellar I : Initial concentration 1.33 g/l

Jour après inoculation	Témoin	A	B	D
J5	1,26	1,03	0,98	1,06
J7	1,19	0,83	0,55	0,95
J12	-	0,76	0,50	0,61
J14	0,72	0,13	0,13	0,12

IIIb - Chai II : Concentration initiale 2,32 g/l
IIIb - Cellar II : Initial concentration 2.32 g/l

Essai en cuve

Jour après inoculation	Témoin	A
J9	1,16	1,10
J14	1,14	0,20
J17	1,19	-
J21	0,68	-
J24	0,15	-

Essai en barriques

Jour après inoculation	Témoin	A	B	D
J3	-	2,20	1,73	2,03
J9	1,27	1,00	0,30	0,76
J14	1,20	0,18	0,10	0,16
J17	1,32	-	-	-
J21	0,80	-	-	-
J24	0,41	-	-	-

Dans le chai V où la FML a été très rapide (3-4 jours), le décalage entre le témoin et les lots ensemencés est insignifiant. Les profils des levains B, D et F n'apparaissent pas (Exemple levain F - figure 3c) et ceux des levains A, C et E sont prépondérants mais superposés à la microflore indigène. La FML a aussi été extrêmement rapide dans les chais III et IV ; elle avait aussi démarré au moment de l'inoculation. Malgré cela, l'implantation des levains est effective dans 5 cas sur 8 ; les profils de B, C et F n'apparaissent pas du tout.

DISCUSSION - CONCLUSION

L'électrophorèse en champ pulsé s'est avéré un outil bien adapté à la recherche d'une souche particulière au

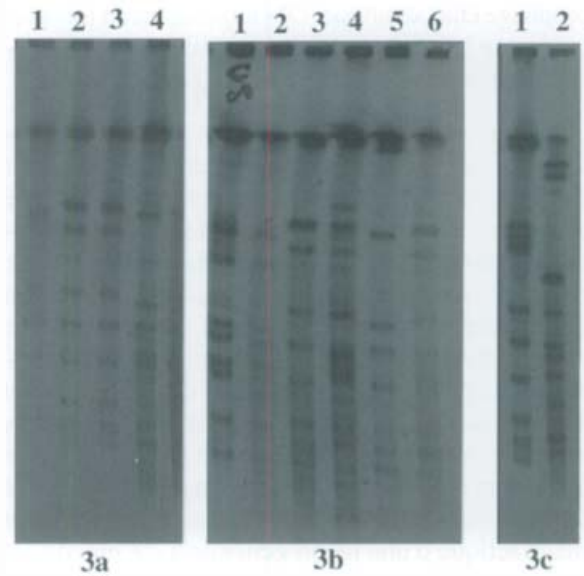


Fig. 3 — Exemples des profils de restriction des ADN des bactéries récoltées dans différents lots de vin.

3a - Essai dans le chai I
Puits 1 : bactéries indigènes - Puits 2 : vin inoculé par A
Puits 3 : vin inoculé par B - Puits 4 : vin inoculé par D

3b - Essai dans le chai II
Puits 1 : bactéries indigènes cuve - Puits 2 : bactéries indigènes barrique - Puits 3 : vin en cuve inoculé par A - Puits 4 : vin en barrique inoculé par A - Puits 5 : vin en barrique inoculé par D
Puits 6 : vin en barrique inoculé par B

3c - Essai dans le chai IV
Puits 1 : vin en barrique inoculé par F
Puits 2 : bactéries indigènes de la barrique

Fig. 3 — Pulse field gel electrophoresis of *Not* I restricted DNA of bacteria isolated from wines.

3a - Experimentation in cellar I :
Lane 1 : spontaneous MLF - Lane 2 : wine inoculated by A
Lane 3 : wine inoculated by B - Lane 4 : wine inoculated by D

3b - Experimentation in cellar II :
Lane 1 : indigenous bacteria in vat - Lane 2 : indigenous bacteria in barrel - Lane 3 : starter A in vat - Lane 4 : starter A in barrel
Lane 5 : starter D in barrel - Lane 6 : starter B en barrel

3c - Experimentation in cellar IV :
Lane 1 : wine in barrel, inoculated by F - Lane 2 : indigenous microflora

sein de la microflore bactérienne indigène des vins. L'enzyme *Not* I a donné les meilleurs résultats ; les profils sont nets et discriminants. Les deux autres enzymes *Sfi* I et *Apa* I conviennent bien aussi. La méthode éprouvée antérieurement à ce travail, avec la collection de souches de *L.oenos* IOEB (Faculté d'Œnologie de Bordeaux) permet avec le seul enzyme *Not* I de différencier la plupart des souches. Dans le cas contraire, l'utilisation d'un autre enzyme lève le doute. A l'occasion de cette étude, nous avons cependant rencontré des difficultés pour distinguer trois levains. Après restriction avec les trois enzymes, les profils ont toujours été semblables. Une méthode totalement différente a alors été utilisée car ces trois souches se sont révélées lysogènes. Mais là encore, le profil de restriction du

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

prophage était identique. Dès lors il apparaît très probable que la même souche a été utilisée pour préparer ces levains.

Jusqu'ici, les expérimentations sur les levains malolactiques laissaient toujours planer un certain doute sur l'intervention réelle des bactéries ajoutées. L'efficacité d'un levain était mise en évidence lorsque la fermentation malolactique se déclenchait dans le témoin avec plusieurs jours ou semaines de décalage par rapport au lot inoculé. Dans le cas contraire, même si l'acide malique disparaissait un peu plus rapidement dans l'essai, on ne pouvait pas conclure à l'établissement du levain. Il était même admis que la microflore indigène, naturellement mieux adaptée, avait éliminé le levain totalement ou en partie. Les essais rapportés dans cette expérimentation démontrent l'inverse. La fermentation malolactique d'une façon générale a été précoce et rapide en 1997, et c'était le cas dans les chais de cette expérimentation. L'acide malique commençait à disparaître dans plusieurs cas au moment de l'inoculation démontrant le niveau et l'efficacité des populations indigènes. Malgré cela, la microflore contrôlée en fin de fermentation malolactique était constituée de façon prédominante par les souches des levains industriels dans 15 essais sur les 21 réalisés. Un levain malolactique peut donc s'implanter même au sein d'une population nombreuse et bien adaptée de bactéries indigènes. Le nombre d'essais n'est pas suffisant pour conclure à la meilleure adaptation au vin de telle ou telle préparation. Toutefois le levain A, qui a donné lieu à 8 essais, a toujours été retrouvé en fin de fermentation malolactique.

L'incidence organoleptique des levains malolactiques est nette lorsque les vins contiennent au moment de l'inoculation une microflore insuffisante. Il n'est pas certain qu'il en est de même dans les conditions présentées lors de ces essais. Comme la vérification de l'implantation des levains n'a été réalisée qu'en fin de fermentation malolactique, il n'est pas possible de savoir avec quelle rapidité la microflore indigène est devenue minoritaire et qu'elle a été sa part dans le processus. Pour lever cette ambiguïté, les mêmes déterminations devraient être réalisées plus fréquemment pendant la fermentation malolactique. Les analyses ultérieures de ces vins vont permettre d'évaluer l'incidence des levains, au plan analytique et sensoriel. D'après les premières analyses, malgré la présence d'une forte population indigène, la qualité organoleptique du vin semble bien être modifiée par utilisation de levains malolactiques. Il devient donc important de mieux connaître l'incidence des souches sélectionnées. Leur utilisation pourrait alors être indiquée selon les caractères recherchés.

Remerciements : Les auteurs remercient Cécile Badoures qui a assuré la mise en place de la plupart des essais et Mohamed Kedous, Monsieur Desportes de la cave coopérative de Romagne, Monsieur Berrouet des Ets J.P. Moueix et les fournisseurs des levains malolactiques : Laffort J. et Cie, Littorale Œnologie, Ch. Hansen France, Martin-Vialatte, Groupe Œnologique Lamothe-Abiet-Pinosa.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

DANIEL P., DE WAELE E. and HALLET J.N., 1993. Optimisation of transverse alternating field electrophoresis for strain identification of *Leuconostoc œnos*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **38**, 638-641.

GARBAY S. and LONVAUD-FUNEL A, 1996. Response of *Leuconostoc oenos* to environmental changes. *J. Appl. Bacteriol.*, **81**, 619-625.

GINDREAU E., TORLOIS S. and LONVAUD-FUNEL A., 1997. Identification and sequence analysis of the region encoding the site specific integration system from *Leuconostoc œnos* (*Œnococcus œni*) temperate bacteriophage ϕ MC 10. *FEMS Microbiol. Lett.*, **147**, 279-285.

HENICK-KLING T., ACREE T. E., GAVITT B. K., KRIEGER S. A., LAURENT M. H. and EDINGER W. D., 1993. Modification of wine flavor by malolactic fermentation. *Proceedings of the 8th Australian Wine Technical Conference*. 25-29 October 1992. VIC. Adelaide SA-Winetitles, Melbourne.

JOYEUX A. et LONVAUD-FUNEL A., 1985. Comparaison de diverses préparations industrielles de bactéries lactiques réactivées pour stimuler la fermentation malolactique. *Connaissance Vigne Vin*, **19**, 149-159.

LE JEUNE C. and LONVAUD-FUNEL A., 1997. Sequence DNA 16S/23S spacer region of *Leuconostoc œnos* (*Œnococcus œni*). Application to strain differentiation. *Res. microbiol.*, **148**, 79-86.

NIELSEN J.C., PRAHL C. and LONVAUD-FUNEL A., 1996. Malolactic fermentation in wine by direct inoculation with freeze - dried *Leuconostoc œnos* cultures. *Amer. J. Enol. Vitic.*, **47**, 42-48.

POBLET M. et LONVAUD-FUNEL A., 1996. Les bactériophages de *Leuconostoc œnos In* Œnologie 95. *5° Symp. Int. Œnol.* pp 313-316. Technique et Documentation, Paris.

DE REVEL G., BERTRAND A. et LONVAUD-FUNEL A., 1989. Synthèse des substances acétoïniques par *Leuconostoc oenos*. Réduction du diacétyle. *Connaissance Vigne Vin*, **23**, 39-45.

SAUVAGEOT F. et VIVIER P., 1997. Effects of malolactic fermentation on sensory properties of four burgundy wine. *Amer. J. Enol. Vitic.*, **48**, 187-192.

Manuscrit reçu le 29 novembre 1997 ;
Accepté pour publication le 22 décembre 1997.

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)