Connaissance Vigne Vin 1979, **13**, N° 4, 295-310.

TECHNIQUES SIMPLIFIEES POUR LE DENOMBREMENT ET L'IDENTIFICATION DES MICROORGANISMES VIVANTS DANS LES MOUTS ET LES VINS

S. LAFON-LAFOURCADE et A. JOYEUX

Institut d'Œnologie, Université de Bordeaux II
Institut National de la Recherche Agronomique
351, cours de la Libération, 33405 Talence Cedex (France)

INTRODUCTION

En présence de certaines altérations du vin (mauvais goûts, élévation d'acidité volatile), accompagnées de troubles, afin de préconiser un traitement convenable, l'œnologue doit être en mesure d'établir rapidement : *a)* l'origine microbiologique de l'altération ; *b)* le sens probable de l'évolution. Des critères analytiques (LAFON-LAFOURCADE et RIBÉREAU-GAYON, 1977) permettent d'éclaicir le premier point ; toutefois, seul le dénombrement des populations microbiennes vivantes, peut situer avec précision le moment du processus biochimique engagé ; par exemple moins de 10^2 levures viables par ml, dans un vin en refermentation signifient la fin de l'accident, même si les populations levuriennes apparaissent abondantes au microscope, dans le vin encore riche en sucre ; par contre, 10^6 bactéries lactiques par ml dans un vin dépourvu d'acide malique représentent à coup sûr un danger, même si l'analyse chimique ne décèle aucune anomalie. D'autre part, sans prétendre faire œuvre de taxonomiste, l'œnologue peut être amené à s'interroger sur la pureté d'un levain ou d'une préparation industrielle de microorganismes, c'est-à-dire à procéder à des identifications.

C'est pour répondre à ces préoccupations que nous tentons, dans ce travail, de dégager des techniques simples de dénombrement, isolement, identification, adaptées à la microbiologie du vin.

DENOMBREMENT DES MICROORGANISMES VIVANTS EN MELANGE DANS LES MOUTS ET LES VINS

I. — PRINCIPE DES DENOMBREMENTS SPECIFIQUES

Un microorganisme est dit « viable » ou « vivant » si, placé en milieu nutritif solide, il se multiplie en formant un amas macroscopique, visible

à l'œil nu, appelé « colonie ». Cette capacité ne signifie pas que le micro-organisme se trouve en croissance dans son milieu d'origine ; elle constitue seulement l'indice probable d'une activité métabolique non négligeable.

Dans les moûts et les vins on rencontre des populations mixtes de levures, bactéries lactiques, bactéries acétiques. Leur dénombrement spécifique repose sur la sélection par le milieu nutritif et les conditions de culture, compte tenu des propriétés inhérentes à chaque groupe.

Les levures présentent des exigences nutritionnelles faibles et une bonne acido-résistance. A l'inverse, bactéries lactiques et acétiques partagent des exigences nutritionnelles importantes et un pH optimum de croissance plus élevé (pH 4,5) ; cependant, les premières, microaérophiles, sont activées sous atmosphère de gaz carbonique tandis que les deuxièmes sont aérobies ; de plus, elles réagissent différemment à la coloration de Gram, les bactéries lactiques, positivement (Gram +), les bactéries acétiques, négativement (Gram —), En outre, on connaît des antibiotiques spécifiques des levures (la pimaricine) et des bactéries lactiques (la pénicilline).

II. — TECHNOLOGIE DES DENOMBREMENTS SPECIFIQUES

Milieux

Pour le dénombrement des levures, le moût de raisin dilué deux fois, pH 3, constitue le milieu nutritif le plus favorable ; pour celui des bactéries on utilise un milieu synthétique de composition suivante : extrait de levure : 5 g/l ; acides aminés de caséine : 5 g/l ; glucose : 10 g/l ; pH : 4,5.

La solidification des milieux nutritifs est obtenue par addition d'un égal volume de solution d'agar-agar à 2 p. 100. L'agar-agar ou gélose est un polysaccharide à base de D-galactose produit par des algues marines ; les solutions, liquides vers 40 °C, forment aux températures inférieures, des gels transparents, inertes du point de vue chimique et bactériologique.

Ces divers milieux sont répartis en tubes, à raison de 5 ml par tube et conservés par stérilisation 15 minutes à 115 °C.

Mode opératoire

Les manipulations doivent être effectuées selon les règles de l'asepsie, à proximité d'une flamme, avec du matériel stérile, après flambage de l'orifice des tubes et des pipettes. La culture solide se fait en boîtes de Petri.

A un tube de 5 ml de milieu nutritif, on ajoute 1 ml de la suspension de microorganismes à dénombrer après l'avoir convenablement diluée ou concentrée par centrifugation. On verse le mélange dans une boîte de Petri ; on répand à la suite 5 ml de solution gélosée à 40 °C. Les deux

milieux sont mélangés par translation rotatoire de la boîte sur une surface plane. Après quelques minutes, le milieu solidifié est mis à incuber à 25 °C.

La sélection entre les trois populations nécessite trois cultures en milieu solide ; elle est réalisée de la manière suivante :

levures : on ajoute directement dans une première boîte de Petri au moment de l'emploi : 0,1 ml d'une solution de pénicilline à 0,25 p. 100 (élimination des bactéries lactiques) et 0,15 ml d'une solution alcoolique de diphényl à 0,75 p. 100 (élimination des moisissures) ; incubation en aérobiose ;

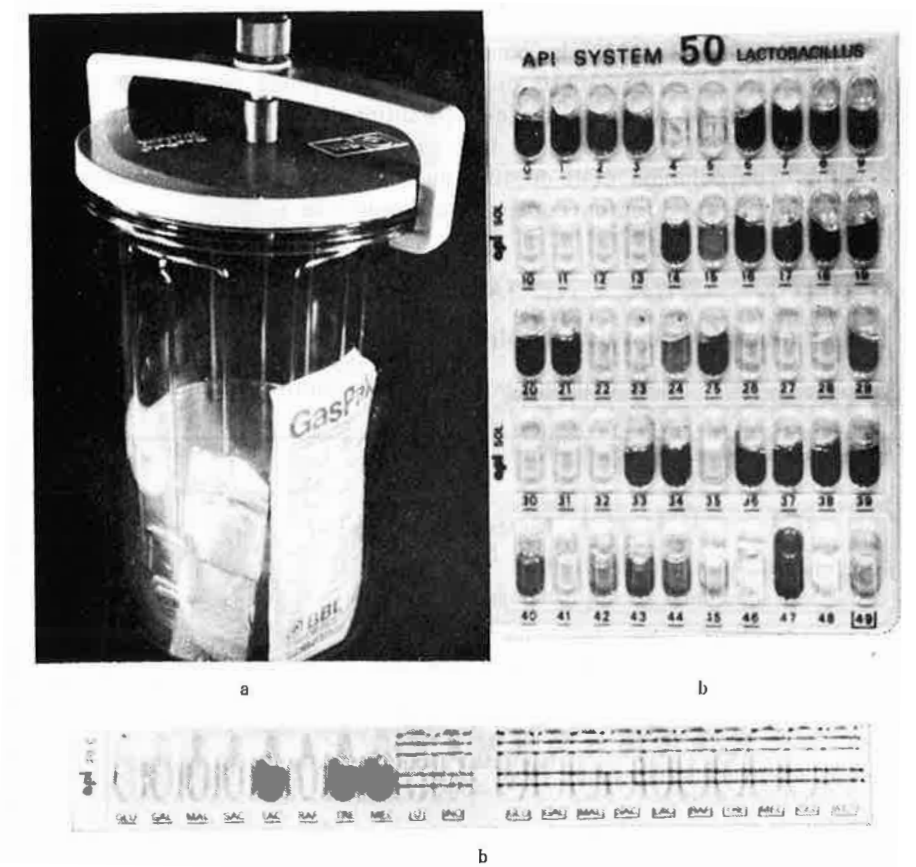


Fig. 1. — a) Jarre — b) API-System Gas Pak

bactéries lactiques : on ajoute dans une deuxième boîte de Petri 0,2 ml d'une solution de pimaricine à 0,25 p. 100 (élimination des levures et des moisissures). L'incubation se fait sous atmosphère de gaz carbonique qui inhibe totalement la croissance des bactéries acétiques. A cet effet, les boîtes de Petri sont placées dans des jarres, munies d'un générateur de gaz carbonique, et pouvant se fermer hermétiquement (fig. 1 a) ;

bactéries acétiques : on ajoute dans une troisième boîte de Petri 0,1 ml d'une solution de pénicilline à 0,25 p. 100 (élimination des bactéries lactiques) et 0,2 ml d'une solution de pimaricine à 0,25 p. 100 (élimination des levures et des moisissures) ; incubation en aérobiose.

Dans la mesure où le mélange des milieux dans les boîtes de Petri est homogène et la concentration cellulaire convenable, chaque cellule viable se trouve isolée dans le milieu solide et donne naissance à une colonie. Les colonies deviennent visibles après deux à trois jours d'incubation pour les levures et après huit à dix jours pour les bactéries.

III. — PRECISION DE LA TECHNIQUE

D'après SENEZ (1968) la concentration cellulaire dans la suspension doit être telle que le nombre de colonies comptées par plaque gélosée soit de l'ordre de 400. « Dans ces conditions, la probabilité est que 19 comptages sur 20, tombent à ± 10 p. 100 de la moyenne. Si, par contre, le nombre de colonies était de 100 seulement, il y aurait une chance sur trois pour que la variation dépasse cet intervalle ».

TABLEAU I

Dénombrement des populations bactériennes dans un vin

(Les chiffres expriment le nombre de cellules x 10^5/ml).

	Echantillons	1	2	3
Vin additionné de ★	Bactéries lactiques (L) *Lactobacillus*	12	28	38
	Bactéries acétiques (A) *Acetobacter*	23	14	28
	Mélange des deux types bactériens (M = L + A)	33	40	70
Dénombrement des bactéries dans M au moyen des méthodes décrites	Bactéries lactiques (L) *Lactobacillus*	9	28	40
	Bactéries acétiques (A) *Acetobacter*	23	16	26

★ Les additions sont faites à partir de fractions aliquotes de culture bactérienne ; elles sont contrôlées par numération de cellules viables sur milieu synthétique en aérobiose pour les deux populations.

D'un autre côté, nous avons vérifié que les procédés décrits précédemment réalisent une séparation satisfaisante des diverses populations, en respectant leur intégrité.

Le dénombrement des levures peut et doit être effectué après un temps relativement court ; en effet, après une huitaine de jours quelques espèces bactériennes parviennent à se développer sur le milieu nutritif des levures ; elles forment généralement des colonies aisément reconnaissables, petites, translucides. Le diphényl, inhibiteur des moisissures, agit aussi sur les levures à concentration supérieure à 2 mg par litre.

On a contrôlé la bonne séparation des deux types bactériens par application systématique de la technique de Gram à des colonies prises au hasard sur les plaques gélosées de cultures bactériennes. On vérifie ainsi l'innocuité de la pénicilline sur les bactéries acétiques alors que, expérimenté sur une vingtaine de bactéries lactiques (*Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus)* cet antibiotique, à la dose indiquée, détruit totalement des populations situées dans une gamme de 10^2 à 10^8 cellules par ml ; on a de même observé que la culture sous atmosphère carbonique n'affecte pas les populations lactiques alors qu'elle inhibe totalement la croissance des bactéries acétiques.

Le tableau I indique pour trois échantillons de vin additionné de populations connues de bactéries lactiques et acétiques le résultat des dénombrements au moyen des techniques décrites ci-dessus.

IDENTIFICATION DES PRINCIPAUX MICROORGANISMES DES MOUTS ET DES VINS

I. — LES CRITERES D'IDENTIFICATION

Compte tenu de leur différence de taille on distingue aisément au microscope levures et bactéries. Mais à l'intérieur de chaque groupe peu de microorganismes sont identifiables à leur forme. Chez les levures, citons : *Hanseniaspora uvarum* et *Klœkera apiculata,* petites levures apiculées ; *Saccharomyces ludwigii,* semblables aux précédentes mais de taille plus importante ; *Schizosaccharomyces* grosse cellule cylindrique, *Torulopsis stellata* au bourgeonnement en étoile. En ce qui concerne les bactéries lactiques, les cellules en forme de bâtonnet appartiennent au genre *Lactobacillus ;* cependant, parfois, entre un bâtonnet « trapu » et un coque « allongé » la différence n'est guère significative.

En fait, l'identification d'un microorganisme repose essentiellement sur la détermination d'un ensemble de propriétés physiologiques spécifiques, notamment, la capacité de dégrader certains substrats. En effet, la dégradation d'un substrat met en jeu une chaîne de systèmes enzymatiques dont la synthèse est génétiquement contrôlée ; elle peut donc être considérée comme le reflet du génome. A partir de ces critères, des clefs conduisent à l'identification ; elles sont dues notamment à LODDER (1970), à BOUCHANAN et GIBBONS (1974) en ce qui concerne respectivement les levures et les bactéries.

La microflore des moûts et des vins est depuis longtemps explorée. Citons entre autres, sur les levures, les travaux de SAPIS-DOMERCQ (1956), de BRECHOT (1962), de LAHO et MINARIK (1970) et plus récemment en France, ceux de PARK (1974), de SOUFLEROS (1978) et de POULARD (1979); sur les bactéries lactiques, des travaux sont dûs à BIDAN (1967), à KUNKEE (1967), à BARRE (1970), à WEILLER et RADLER (1970). A Bordeaux, un important travail de taxonomie relatif aux bactéries lactiques des moûts et des vins revient à PEYNAUD et SAPIS-DOMERCQ (1955-1967).

La documentation ainsi réunie montre qu'en réalité moûts et vins constituent des milieux très sélectifs dans lequels un nombre relativement restreint d'espèces parviennent à s'adapter. On y rencontre couramment une quinzaine d'espèces levuriennes (Tableau II) dans une proportion supérieure à 1 p. 100 ; la présence d'une quarantaine d'autres est fortuite ; dans les vins cependant des populations de *Saccharomyces bailii* et *Saccharomycodes ludwigii* peuvent accidentellement prédominer. En ce qui concerne les bactéries lactiques, on compte environ une dizaine d'espèces (Tableau III).

L'identification d'une levure de vin est basée principalement sur sa capacité d'assimiler certains sucres par la voie oxydative (« assimilation ») ou fermentaire (fermentation) (Tableau IV) ; celle des bactéries lactiques du vin repose essentiellement sur l'observation de la forme et sur la détermination de la nature des pentoses fermentés, de la voie métabolique empruntée pour dégrader le glucose, de la résistance au teepol (ammonium quaternaire).

II. — TECHNOLOGIE DE L'IDENTIFICATION

Dans le cadre d'identification rapide, les « API System » destinés au contrôle de productions industrielles, s'appliquent avec succès aux microorganismes des moûts et des vins (MARET et SOZZI, 1977-1979 ; MARET et *al.*, 1979). Ce procédé normalisé facilite grandement la détermination des critères classiques d'identification. Il s'agit de microtubes (fig. 1 b), incrustés en série dans des plaques et contenant chacun un substrat différent ; on les remplit au moment de l'emploi avec une suspension convenable du microorganisme à étudier dans un milieu nutritif de base fourni par le fabricant. Les réponses sont lues après des temps d'incubation variant de 3 à 48 heures, à 25 °C pour les levures et 30 °C pour les bactéries.

Le matériel proposé pour l'identification des levures comporte 8 tests de fermentation (Zymogramme) et 12 tests d'assimilation (Auxanogramme) (fig. 1). La fermentation entraîne une acidification et un changement de coloration du milieu ; l'assimilation conduit à un trouble qui est comparé à celui qui apparaît dans le microtube témoin.

TABLEAU II

La microflore levurienne des moûts de raisin

Les chiffres indiquent les pourcentages de chaque espèce par rapport au nombre total de levures isolées par chaque auteur.

	DOMERCQ Bordelais 1956	BRÉCHOT Beaujolais 1962	MINARIK LAHO Tchécoslovaquie 1970	PARK Charente 1974
Brettanomyces vini ou *intermedius*	0,2	2,5		
Candida guillermondii		0,9		
Candida intermedia				0,3
Candida krusci		0,5	0,02	
Candida melinii		2,7		
Candida mycoderma			0,08	
Candida parapsilosis			0,02	
Candida pelliculosa		0,5		
Candida sake		1,5		0,6
Candida solani		0,5		
Candida valida				4,6
Candida vini		9,2		
Candida utilis		0,5		
Debaryomyces hansenii	0,2			0,15
Debaryomyces phaffii				
Hansenula anomala	0,3	0,2	1	0,15
Hanseniaspora osmophila				2,1
Hanseniaspora uvarum	27,8	6,5	13	15,5
Kloeckera apiculata				
Kloeckera africana	0,04		0,02	
Kloeckera javanica	0,04	0,5		
Rhodotorula glutinis				0,15
Rhodotorula mucilaginosa		0,2		
Kluyveromyces veronae	0,04		0,08	
Metschnikowia pulcherrima	0,29		9	0,3
Nadsonia elongata				0,15
Pichia fermentans	0,19		0,08	
Pichi membranaefaciens	0,19		0,2	0,4
Pichia polymorpha				0,15
Pichia kluyveri				0,4

TABLEAU II (suite)

La microflore levurienne des moûts de raisin

Les chiffres indiquent les pourcentages de chaque espèce par rapport au nombre total de levures isolées par chaque autreur.

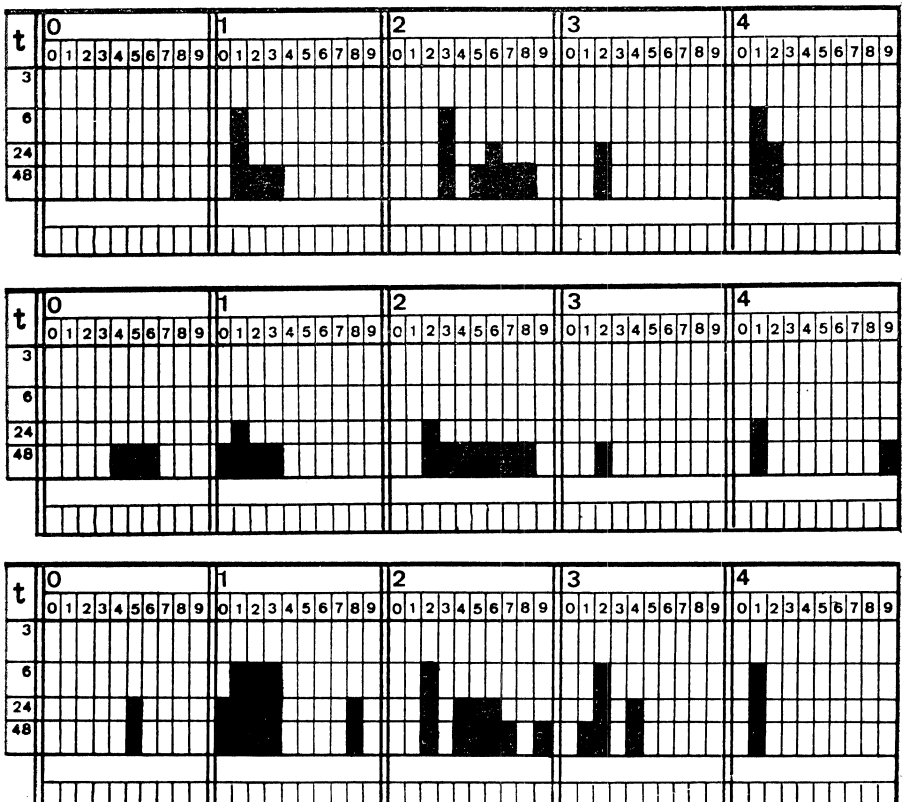
	DOMERCQ Bordelais 1956	BRÉCHOT Beaujolais 1962	MINARIK LAHO Tchécoslovaquie 1970	PARK Charente 1974
Saccharomyces bailii	0,4		0,1	
Saccharomyces bisporus		0,2		
Saccharomyces chevalieri	3,5	1,5	0,2	1,4
Saccharomyces capensis				0,9
Saccharomyces cerevisiae	50	58	64	50
Saccharomyces cidri				0,4
Saccharomyces delbrueckii	0,04			
Saccharomyces diastaticus				0,3
Saccharomyces exiguus		0,2	0,2	
Saccharomyces florentinus	0,29			
Saccharomyces globosus				0,6
Saccharomyces heterogenicus	0,2	0,2	0,08	
Saccharomyces italicus	0,9	7,5	0,1	
Saccharomyces kluyveri				1,5
Saccharomyces oviformis et bayanus	4,8	0,5	4,5	0,6
Saccharomyces pretoriensis				0,4
Saccharomyces prostoserdovii				0,15
Saccharomyces rosei	1,6	0,2	0,9	7,3
Saccharomyces uvarum	0,9		3	6,2
Saccharomycodes ludwigii	0,04			1,8
Torulopsis candida	0,2	0,5		0,3
Torulopsis colliculosa		0,9		
Torulopsis dattila		0,2		
Torulopsis etchellsii				0,4
Torulopsis glabrata			0,08	
Torulopsis holmii		0,2		
Torulopsis inconspicua				0,15
Torulopsis lactis condensi				
Torulopsis stellata			0,08	2,1
Torulopsis versatilis	6,9	1,7	0,2	
Nombre de Souches isolées	2023	398	3739	650

TABLEAU III

Les principales bactéries lactiques des moûts et des vins
(D'après « Bergey's Manual », 1974, RIBÉREAU-GAYON, et al., 1975)

	Caractères différentiels					Fréquence en % du nombre total des souches identifiées (570)
	Forme	Pentoses fermentés		Voies métaboliques de fermentation du glucose	Résistance au Teepol	
		Arabinose	Xylose			
Pediococcus cerevisiae	sphérique	—	—	homofermentation		4,8
Leuconostoc gracile	»	—	—	hétérofermentation		20,6
Leuconostoc oinos	»	+ ou ±	+ ou ±	»		37
Lactobacillus plantarum	bâtonnet			homofermentation	+	2,1
Lactobacillus casei	»			»		1,2
Lactobacillus fructivorans	»	—	—	hétérofermentation	—	3,6
Lactobacillus desidiosus	»	+	—	»		0,4
Lactobacillus hilgardi	»	—	+	»		22,5
Lactobacillus brevis	»	+	+	»		7,7

Le matériel prévu pour les bactéries lactiques propose 50 tests (fig. 1) dont quelques uns seulement sont nécessaires pour l'identification des bactéries du vin. On y trouve les tests de fermentation des pentoses (n° 4, 6, 7) et de la résistance au teepol (41, 42, 43). La mise en évidence du caractère fermentaire de la bactérie est basée sur la considération de propriétés qui accompagnent l'hétérofermentation. Dans les conditions expérimentales de l'API System, les *Lactobacillus* hétérofermentaires dégradent l'arginine avec formation de CO_2 et NH_3 ; la modification du pH provoque le changement de coloration du milieu (test n° 40) ; les coques hétérofermentaires dégradent l'acide citrique avec formation d'acétoïne qui réagit avec l'α naphtol du milieu en donnant une coloration rouge (test n° 49). Dans les cas douteux les bactéries sont cultivées sur milieu synthétique ; après une dizaine de jours d'incubation à 25 °C la détermination par méthode enzymatique des acides lactiques (L) et de l'éthanol (E) lève l'indétermination ; un rapport $E/L > 0,5$ confirme l'hétérofermentation.



Coque homo

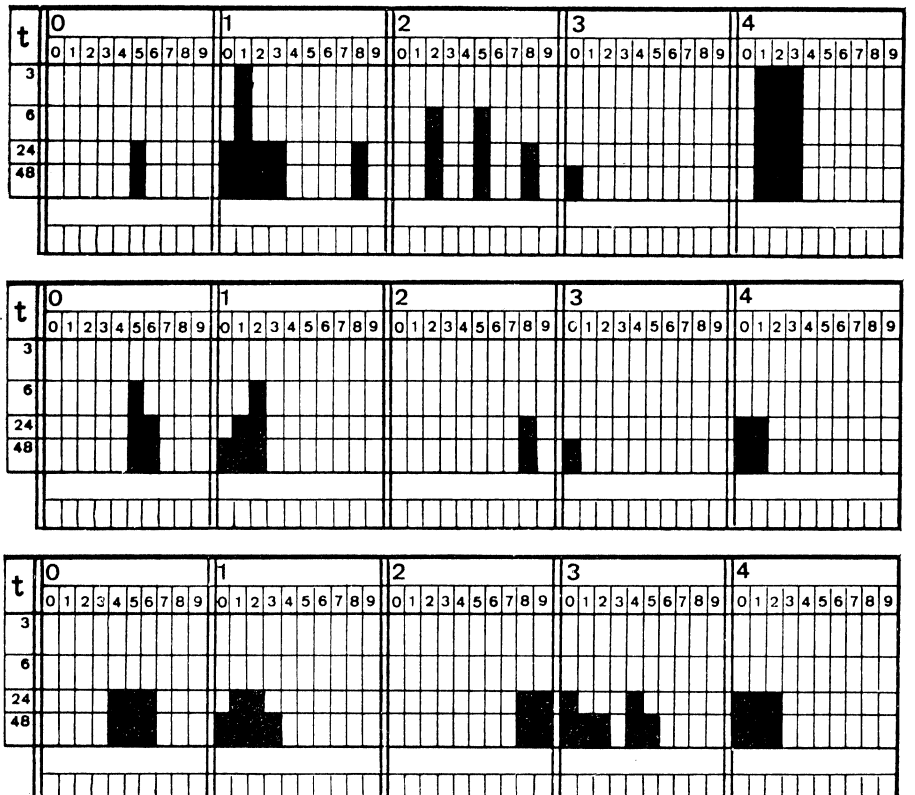
Pediococcus cerevisiae

Coque hétéro

Leuconostoc oinos

Bacille homo

Lactobacillus casei



Bacille homo

Lactobacillus plantarum

Bacille hétéro

Lactobacillus hilgardii

Bacille hétéro

Lactobacillus brevis

Fig. 2. — Profils d'identifications de quelques bactéries lactiques

TABLEAU IV

Caractères différentiels des levures les plus couramment rencontrées sur les raisins, dans les moûts et les vins (d'après LODDER)

	ZYMOGRAMME								AUXANOGRAMME						
	Gl	Gt	Mt	S	L	R	T	Ml	Gl	Gt	Mt	S	L	R	T
Kloeckera apiculata	+	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—
Hanseniaspora uvarum															
Torulopsis stellata	+	—	—	+	—	+	—	—	+	—	—	+	—	+	—
Candida valida	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—
Pichia membranaefaciens	±	—	—	—	—				+	—	—	—	—	—	—
Hansenula anomala	+	±	+	+	—	1/3			+	±	+	+	—	+	+
Sacch. cerevisiae	+	+	+	+	—	1/3	±	—	+	+	+	+	—	+	±
Sacch. chevalieri	+	+	—	+	—	1/3	+	—	+	+	±	+	—	+	+
Sacch. oviformis	+	—	+	+	—	1/3	±	—	+	—	+	+	—	+	±
Sacch. rosei	+	—	—	+	—	1/3	+	—	+	—	±	+	—	+	+
Sacch. bailii	+	—	—	∓	—	+	∓	—	+	±	—	±	—	∓	±
Saccharomycodes ludwigii	+	—	—	+	—	+		—	+	—	—	+	—	+	—
Schizosaccharomyces pombe	+	—	+	+	—	1/3	—	—	+	—	+	+	—	+	—
Brettanomyces vini	+	+	+	+	+	—	+	—	+	+	+	+	+	+	—

Gl : Glucose ; Gt : Galactose ; Mt : Maltose ; S : Saccharose ; L : Lactose ; R : Raffinose ; T : Tréhalose ; Ml : Mélibiose.

Les réponses d'un microorganisme à l'API System se transforment aisément en « profil » sur des cartes où chaque caractère biochimique testé est représenté par une colonne que l'on noircit dans le cas d'une réponse positive (fig. 2). A partir de ce profil la référence aux clefs taxonomiques classiques (Tableaux III et IV) permet l'identification de l'espèce levurienne ou bactérienne.

CONCLUSION

L'œnologue maîtrise bien l'analyse chimique, par contre il hésite à pratiquer les techniques microbiologiques réputées délicates, longues et aléatoires. Cependant, la microbiologie du vin, limitée à un nombre restreint de microorganismes non pathogènes, n'exige que des manipulations faciles et sans danger. L'application de connaissances fondamentales (propriétés spécifiques des microorganismes, antibiotiques) l'utilisation de matériels communément trouvés dans le commerce et relativement peu onéreux, ont servi de base à la mise au point de techniques simples et rapides permettant à la fois le dénombrement et l'identification des populations microbiennes. Leur fiabilité est suffisante pour permettre des contrôles de bonne précision. L'emploi systématique de ces techniques apporterait sans aucun doute des informations suceptibles d'aider à une meilleure interprétation de certains problèmes rencontrés dans la pratique des chais et contribuerait à établir des diagnostics plus assurés.

REMERCIEMENTS

Nous remercions M. O. GEIGES (Eidg. Technische Hochschule, Zürich) pour les conseils qu'il nous a prodigués pendant la mise au point de ces techniques.

Manuscrit reçu le 3 octobre 1979.

RÉSUMÉ

Les microorganismes rencontrés dans les moûts et les vins : levures, bactéries lactiques et acétiques, sont représentés par un nombre limité d'espèces. Les auteurs proposent une technique rapide de dénombrement sélectif des trois populations en mélange et l'application de l'Api-system pour identifier les levures et les bactéries lactiques du vin.

SUMMARY

The number of microorganisms species occuring in musts and wines (yeasts, lactic and acetic bacteria) is limited. It is presented a quick, selective technique to count these miscillanous microorganisms and application of Api-system for identification of yeasts and lactic bacteria of wine.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Mikroorganismen, die sich in Wein und Most befinden (Hefen, Milchbakterien und Essigbakterien) gehören einer begrenzten Zahl von Arten an.

Die Autoren schlagen ein Schnellverfahren vor für eine selektive Aufzählung der 3 Populationen und das Anwenden des sogenannten Afi-Systems zur Erkennung der Hefen und Milchbakterien.

RESUMEN

Los microorganismos encontrados en los mostos y los vinos : levaduras, bacterias lácticas y acéticas, pertenencen a un número limitado de especies. Los autores proponen una técnica rápida de catalogación selectiva de tres poblaciones mezcladas y la aplicación del sistema Api para identificar las levaduras y las bacterias lácticas del vino.

RIASSUNTO

I micro-organismi incontracti in mosti e vini lieviti, batteri lattici ed acetici sono rappresentati con un numero limitato di specie. Gli autori propongono una tecnica rapida di conto selettivo delle tre popolazioni mischiate e l'applicazione dell'Api-system per identificare i lieveti ed i batteri lattici del vino.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BARRE P., 1970. Taxonomie numérique de *Lactobacillus* isolés des vins. Document de travail OIV n° 36.

BIDAN P., 1967. Etude de la fermentation lactique du vin. Taxonomie des bactéries lactiques du vin. Document du travail OIV n° 14.

BRECHOT P., CHAUVET J. et GIRARD H., 1962. Identification des levures d'un moût de Beaujolais au cours de sa fermentation. *Ann. Technol. agric.*, **11**, N° 3, 235-244.

BOUCHANAN R.E. et GIBBONS N.E., 1974. « Bergey's Manual of Determinative Bacteriology ». The Williams and Wilkins Company, Baltimore ed.

DOMERCQ S., 1956. Etude et classification des levures de vin de la Gironde. *Thèse Docteur ingénieur*, Bordeaux.

LAFON-LAFOURCADE S. et RIBÉREAU-GAYON P., 1977. Origines de l'acidité volatile des grands vins liquoreux. *C.R. Acad. Agric.*, **63**, N° 9, 551-558.

LODDER J., 1970. « The Yeasts ». North-Holland Publishing Company — Amsterdam-London.

LAHO L., MINARIK E., NAVARA A., 1970. « Vinarstvo » Bratislava.

MARET R. et SOZZI T., 1977. Flore malolactique de moûts et de vins du Canton du Valais (Suisse). II. — Evolution des populations de lactobacilles et de pédiocoques au cours de la vinification d'un vin blanc (un Fendant) et d'un vin rouge (une Dole). *Ann. Tech. agric.*, **28**, N° 1, 31-40.

MARET R., SOZZI T. et SCHELLENBERG D., 1979. Flore malolactique de moûts et de vins du Canton du Valais (Suisse). III. — Les leuconostocs. *Ann. Tech. agric.*, **28**, N° 1, 41-55.

PAULE R., 1971. Contribution à l'étude du genre *Lactobacillus* par une méthode normalisée. *Thèse de doctorat en pharmacie.* Lyon.

PARK Y., 1974. Contribution à l'étude des levures de Cognac. *Thèse de Doctorat de 3e Cycle,* Bordeaux.

POULARD A., 1979. Recherches sur la microflore levurienne fermentaire et oxydative du vignoble Nantais. *Thèse d'Université,* Nantes.

PEYNAUD E. et SAPIS-DOMERCQ S., 1955-1967, dans *Sciences et Techniques du Vin,* Tome 2, 1975, Dunod, éd., Paris.

RIBÉREAU-GAYON J., PEYNAUD E., RIBÉREAU-GAYON P. et SUDRAUD P., 1975. « *Sciences et Techniques du Vin* », Tome 2. Dunod, éd., Paris.

SENEZ J.-C., 1968. « *Microbiologie générale* ». Douin, éd., Paris.

SOUFLEROS E., 1978. Les levures de la région viticole de Naoussa (Grèce). *Thèse de Docteur Ingénieur,* Bordeaux.

WEILLER H.-G. et RADLER F., 1970. Zents. Bakt. Parasit. Infekt Hygiene, **124**, 707.

NOTE DE LABORATOIRE

METHODE DE RECHERCHE DE TRES FAIBLES QUANTITES D'ACIDE SORBIQUE DANS LES VINS

D. CHRETIEN, L. PEREZ et P. SUDRAUD

Station Agronomique et Œnologique de Bordeaux
351, cours de la Libération, 33405 Talence Cedex

L'utilisation de l'acide sorbique n'est pas autorisée dans tous les pays. Certains d'entre-eux, l'Autriche en particulier, refusent systématiquement les vins présentant même des traces de cet antiseptique. Il est donc nécessaire de posséder une méthode très sensible et spécifique pour rechercher ce produit même si elle est sans intérêt sur le plan technologique.

La technique de recherche globale des antiseptiques par chromatographie en couche mince proposée par Mme JUNGE (1967, 1970) est intéressante. Elle est sensible (elle permet de déceler 5 mg d'acide sorbique par litre), et spécifique. Mais elle est assez longue et nécessite un volume de vin relativement important ; de plus la concentration sous vide de l'extrait éthéré exige un matériel que ne possèdent pas tous les laboratoires privés. La technique de chromatographie sur papier préconisée par GUIMBERTEAU (1962) manque de sensibilité car elle permet difficilement de descendre au-dessous de 20 mg par litre. La méthode de dosage par entraînement à la vapeur et spectrophotométrie dans l'ultra-violet est également critiquable pour de très faibles doses. D'une part, elle n'est pas rigoureusement spécifique et d'autre part les valeurs de densité optique faibles sont difficiles à interpréter ; d'ailleurs nombreux sont les vins qui donnent une très faible valeur de densité optique à 256 nm en l'absence de toute addition d'acide sorbique; la modification proposée par MANDROU et *al.* (1975) pour de faibles traces d'acide sorbique complique le mode opératoire et augmente sensiblement la durée du dosage. Les méthodes par chromatographie en phase gazeuse sont assez délicates pour de faibles teneurs (BERTRAND et SARRE, 1975 et 1978) ou bien longues et nécessitant un important volume de vin (BANDION, 1974 et 1979) pour atteindre une sensibilité très grande (1 mg par litre).

Nous avons donc depuis quelques mois mis en œuvre une technique semblable à celle préconisée par GUIMBERTEAU mais utilisant la chromatographie en couche mince comme méthode de séparation.

METHODE PROPOSEE

Matériels et réactifs.

Lampe à ultra-violet à 254 nm.

Plaques pour chromatographie en couche mince de polyamide sur feuille d'aluminium contenant un indicateur de fluorescence (par exemple polyamide 11 F 254 de chez Merck) d'épaisseur de couche 0.15 mm.

Micropipette de 5 µl ou microseringue de 1 ou 10 µl.

Acide sulfurique 1/3 (V/V).

Ether sulfurique.

Acide sorbique en solution hydroalcoolique (10 p. 100 d'éthanol environ en volume) à 20 mg par litre.

Solvant : hexane, pentane, acide acétique (20-20-3).

Mode opératoire :

Dans un tube à essai de 25 ml environ bouchant à l'émeri, on place 10 ml de vin, 1 ml d'acide sulfurique 1/3 et 5 ml d'éther sulfurique. On agite avec précaution par retournement successifs et on laisse décanter les deux phases. On prélève 5 µl de la phase éthérée que l'on dépose à 2 cm du bord inférieur de la plaque. On opère de la même façon avec des solutions d'acide sorbique de 2, 4, 6, 8 et 10 mg par litre, obtenues par dilution à partir de la solution à 20 mg par litre. Les points d'application des extraits éthérés doivent être distants de 2 cm.

La plaque est placée dans une cuve parallélépipédique pour chromatographie en couche mince, son bord inférieur plongeant dans environ 0,5 cm de solvant. On laisse le chromatogramme se développer sur 12-15 cm ce qui demande environ 30 minutes, puis la plaque est séchée sous un courant d'air froid provoqué par un ventilateur.

Après dessication complète, on examine la plaque sous une lampe à ultra-violet de courte longueur d'onde, 254 nm ; les taches d'acide sorbique apparaissent en violet sombre sur fond jaune fluorescent ; on peut ainsi facilement détecter une teneur de 2 mg par litre et en doublant la quantité d'extrait éthéré déposé (10 µl au lieu de 5 µl) une quantité de 1 mg par litre) d'acide sorbique est nettement perceptible. De même en déposant sur la plaque des quantité plus faibles, à l'aide d'une microseringue pour chromatographie en phase gazeuse par exemple, 0,5 ou 1 µl on peut estimer la quantité d'acide sorbique contenu dans un vin normalement traité.

CONCLUSIONS

Afin de détecter de faibles quantités d'acide sorbique éventuellement présentes dans les vins, nous décrivons une méthode par chromatogra-

phie en couche mince permettant de mettre en évidence la présence des teneurs très faibles, de l'ordre de 1 mg par litre de cet antiseptique. Cette technique très rapide et très simple permet en particulier de confirmer si les faibles teneurs trouvées lors du dosage par entraînement à la vapeur et absorption dans l'ultra-violet correspondent réellement à de l'acide sorbique et ne proviennent pas d'un artéfact donné par d'autres substances absorbant à 256 nm.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BANDION F., 1974. Zum Nachweiss von Sorbinsäure in wein. *Mitt Klosterneuburg,* **24**, 259-264.

BANDION F., 1979. Mise en évidence d'acide sorbique dans le vin. *Feuillets verts O.I.V.*, n° 683.

BERTRAND A. et SARRE Ch., 1975. Dosage de l'acide sorbique par chromatographie en phase gazeuse. *Connaissance Vigne Vin,* **9**, n° 4, 267-272.

BERTRAND A. et SARRE Ch., 1978. Dosage de l'acide sorbique par chromatographie en phase gazeuse. *Feuillets verts O.I.V.*, n° 654.

GUIMBERTEAU G., 1962. Méthode pratique de caractérisation et d'estimation de l'acide sorbique dans les vins. *Ind. Alim. Agric.*, **79**, n° 2, 99-101.

JUNGE Ch. 1970. Recherche de produits conservateurs par chromatographie sur couche mince. *Feuillets verts O.I.V.*, n° 350.

MANDROU B., ROUX E. et BRUN S., 1975. Constituants volatils pertubant le dosage de l'acide sorbique dans les vins, fruits et produits dérivés *Ann. Fals Chim.*, n° 725, 29-48.