Connaissance Vigne Vin, 1983, **17**, N° 1, 55-71.

INDUCTION DE LA FERMENTATION MALOLACTIQUE DES VINS PAR INOCULATION D'UNE BIOMASSE INDUSTRIELLE CONGELÉE DE *L. OENOS* APRÈS RÉACTIVATION

Suzanne LAFON-LAFOURCADE, E. CARRE, Aline LONVAUD-FUNEL et P. RIBÉREAU-GAYON

Institut d'Œnologie, Université de Bordeaux II
351, cours de la Libération, 33405 Talence Cédex (France)

INTRODUCTION

Malgré tous les travaux qui lui ont été consacrés, la fermentation malolactique reste, dans la pratique, mal maîtrisée. Des études récentes confirment que, dans les régions viticoles du Sud-Ouest, l'agent de la fermentation malolactique est *L. oenos* (CARRE, 1982). Cette espèce, rare sur le raisin, devient prédominante en fin de fermentation alcoolique ; dans le vin, la concentration cellulaire augmente brusquement après les manipulations qui suivent la fermentation, du fait d'une inoculation par les bactéries qui se trouvent sur le matériel vinaire. Il est certain que le développement de l'hygiène dans les chais, par ailleurs souhaitable, peut contribuer à la raréfaction de l'ensemencement naturel et aux difficultés de la fermentation malolactique.

On a cherché depuis longtemps à stimuler la fermentation malolactique par ensemencement bactérien, mais sans grand succès. On observe, dans les heures qui suivent le transfert des bactéries dans le vin, une forte régression des populations (RIBÉREAU-GAYON et *al.*, 1975) variable selon la composition du vin, la nature de la souche bactérienne et les conditions de sa préculture ; ce phénomène laisse prévoir l'importance de l'état physiologique de l'inoculum à l'égard de la résistance cellulaire en milieu vin ; mais cette question n'a jamais été précisée. D'autre part, jusqu'ici, on s'est heurté au problème de l'approvisionnement en quantité suffisante de biomasses de qualité convenable.

Dans ce travail, on examine d'abord, les possibilités offertes par l'utilisation d'une préparation industrielle de *L. oenos,* présentée sous forme congelée ; elle a été mise à notre disposition à titre expérimental par Gewürzmüller, Klagenfurter Strasse 1-3, D 7000 Stuttgart 30 (R.F.A.). Les propriétés de la souche ont été déterminées ; on a ensemencé les vins avec ces biomasses après simple décongélation ; les premières observations ont montré la nécessité de réactiver les cellules avant l'emploi.

Diverses modalités de réactivation ont été étudiées qui nous permettent de proposer des procédés aisément réalisables.

Par ailleurs, la souche levurienne responsable de la fermentation alcoolique intervient par les produits de son métabolisme sur la fermentescibilité malolactique (LAFON-LAFOURCADE, 1973) ; cette observation revêt un intérêt technique évident au moment où se développe l'utilisation des levures sèches. Parmi les principales préparations de *Saccharomyces*, commercialisées sous forme de levure sèche active, on a déterminé les plus favorables. Enfin, le taux d'ensemencement et le moment le plus convenable à l'inoculation bactérienne ont été précisés. L'ensemble de ces résultats a été mis à l'épreuve de la pratique.

MATERIELS ET METHODES

Les microorganismes expérimentés sont : *Leuconostoc oenos* (GM.) *S. cerevisiae* C 1 (Fermivin) et C 2 (Hefix) ; *S. bayanus* B 1 (Fermichamp) et B 2 (Hefix), sous forme de levure sèche active.

Les milieux utilisés sont : un jus de raisin Muscat du commerce conditionné en bouteilles, des moûts de raisin et des vins prélevés dans des chais de vinification, dont les caractéristiques sont indiquées pour chaque expérimentation.

Les expérimentations sont conduites au laboratoire, en bouteilles de 500 ml complètement remplies, bouchées avec une fermeture de type « limonade ». D'autres sont effectuées dans des chais en fûts et en barriques.

Les dénombrements de cellules vivantes sont effectués en milieu nutritif solide (LAFON-LAFOURCADE et JOYEUX, 1979). Les acides malique, lactique acétique sont dosés par méthode enzymatique (BERGMEYER, 1971), les sucres par méthode chimique (méthode Lüff).

Pour la mesure de l'activité malolactique des extraits acellulaires, les biomasses, décongelées et précultivées pendant des durées d'incubation variables en culture pure, sont centrifugées, lavées trois fois dans du sérum physiologique. Elles sont reprises dans un tampon phosphate 0,2 M à pH 5,9 et broyées aux ultra-sons. On centrifuge pour éliminer les débris cellulaires à 30.000 g, pendant 20 minutes à 4 °C. Le surnageant constitue l'extrait acellulaire. Son activité malolactique est déterminée par la mesure des p CO_2 avec une électrode spécifique (LONVAUD, 1975), dans 2,3 ml de tampon phosphate contenant en outre le mélange réactionnel suivant : L-malate : 500 µmol ; NAD : 1 µmol ; Mn Cl_2 : 0,2 µmol. La réaction est déclenchée par injection de l'extrait. On mesure l'augmentation de p CO_2 en fonction du temps. D'autre part,, on détermine la concentration en protéines dans l'extrait par la méthode de LOWRY.

RESULTATS

I. — UTILISATION DE LA PREPARATION INDUSTRIELLE DE *L. OENOS* APRES DECONGELATION.

La préparation industrielle décongelée contient environ 110 mg de biomasse par ml correspondant à une concentration bactérienne de 2 à 7 x 10^{10} cellules par ml. Elle est constituée d'une souche de *L. oenos* qui peut se développer en présence de l'une des trois conditions limites suivantes : pH : 3,2 ; éthanol : 12 p. 100 vol. ; anhydride sulfureux libre : 10 mg/l. Parmi les 50 substances tests des microgaleries « Api-System » *L. oenos* GM dégrade seulement l'arabinose, le fructose et l'esculine. La préparation industrielle a été expérimentée après simple décongélation, selon les indications du fabricant, au cours de la campagne de vinification 1980.

Le vin rouge utilisé est issu d'une vendange de Cabernet Sauvignon, sulfité à 3 g par hectolitre, titrant 202 g de sucre par litre, 5,6 g d'acidité totale par litre (en acide sulfurique) et 4,2 g par litre d'acide malique. Il est écoulé en barriques et conservé entre 18 et 20 °C (Tableau I).

TABLEAU I

Stimulation de la fermentation malolactique en vinification en rouge par ensemencement des vins avec une préparation industrielle de *L. oenos* GM

Population bactérienne indigène : 3 x 10^5 cellules par ml.
Teneur initiale en acide malique : 4,2 g par litre.

Ensemencement (cellules par ml)	Nombre de jours			
	6	19	26	29
0	0	1,7	4,0	4,2
+ 10^5	0	2,0	4,0	4,2
+ 10^6	0	4,2	4,2	4,2

La population lactique indigène est de 3 x 10^5 cellules par ml. On ajoute au vin respectivement 10^5 et 10^6 bactéries décongelées par ml. Leur transfert dans le vin provoque immédiatement une perte de viabilité de l'ordre 80 p. 100, de sorte que les populations indigènes et la croissance bactérienne sont peu modifiées. Néanmoins, on observe une dégradation un peu plus rapide de l'acide malique, laquelle, dans le cas du plus fort

ensemencement, est terminée avec deux ou trois jours d'avance sur le témoin, pour une durée globale de 26 jours.

En vinification en blanc, le vin expérimenté est issu d'un moût clarifié provenant d'un mélange de Colombard, Uni blanc et Merlot blanc, sulfité à 8 g par hl. Il titre 210 g de sucre par litre et son pH est de 3,2. La population lactique indigène du vin non sulfité, après achèvement de la fermentation alcoolique est 3,9 x 10^2 cellules par ml. Le transfert des bactéries dans le vin après décongélation, diminue d'un facteur 100 à 1000 les populations viables ajoutées. Dans aucune des conditions on n'observe de fermentation malolactique.

Ces résultats montrent que les biomasses congelées ne peuvent pas être directement utilisées. Des observations analogues ont été effectuées par GNAEGI (1982).

II. — ETUDE DE LA REACTIVATION DE LA BIOMASSE BACTERIENNE CONGELÉE EN CULTURE PURE.

La réactivation de la biomasse industrielle est envisagée essentiellement dans le but d'amener les populations dans un état physiologique susceptible de leur conférer une meilleure résistance au transfert dans le milieu-vin. L'augmentation du nombre de cellules par prolifération, qui accompagne cette opération, plus ou moins importante selon le cas, est un avantage supplémentaire, mais ne constitue pas le but recherché essentiel.

1) **Choix du milieu de préculture**

Le moût de raisin dilué au demi (80 g de sucre par litre), additionné d'extrait de levure (5 g/l) amené à pH 4,5, constitue l'un des milieux assurant aux biomasses bactériennes l'activité malolactique maximale (LAFON-LAFOURCADE, 1970). L'autolysat de levure, outre les substances nutritives, contient des petits peptides, facteurs de croissance des bactéries lactiques (FEUILLAT et *al.*, 1977). Dans le cas de *L. oenos,* la préculture dans le moût de raisin dilué deux fois, additionné de 5 g par litre d'autolysat de levure industriel (Fould Springer, 103, rue Jean-Jaurès, 94701 Maisons-Alfort), pH 4,5 fournit des biomasses riches en enzyme malolactique et qui présentent une meilleure résistance au milieu vin. Cette stimulation est induite par des substances de poids moléculaire inférieur à 1000 (CHAUMET, 1981). Ce milieu « M » a été choisi pour la réactivation des biomasses congelées.

2) **Modalités de réactivation.**

Une partie aliquote de la biomasse décongelée est transférée dans le milieu M, à raison de 10^6 cellules par ml à 25 °C ; on fait varier la durée d'incubation. Les populations dans les précultures sont de 10^6, 10^7 et 10^9 cellules par ml, respectivement après 2 heures, 24 heures et 6 jours.

L'ensemencement du vin au taux de 10^6 cellules par ml nécessite dans les deux premiers cas une concentration de la population par centrifugation. Les bactéries simplement décongelées ou réactivées servent à inoculer un vin issu d'un moût dont la fermentation a été assurée par *S. cerevisiae* sous forme de levure sèche (pH 3,3 ; éthanol : 11 p. 100 vol. ; acide malique : 4,5 g par litre). (Tableau II).

TABLEAU II

Incidence de la durée de préculture de la biomasse bactérienne décongelée sur son activité

Résultats 12 jours après l'ensemencement : température : 19 °C ; acide malique : 4,5 g par litre ; ensemencement bactérien : 10^6 cellules par ml.

	Ensemencement par biomasse décongelée	Ensemencement par biomasse réactivée Durée de la préculture		
		2 heures	24 heures	6 jours
Population (cellules par ml)	10^5	3×10^7	$4,4 \times 10^7$	$9,4 \times 10^7$
Acide malique dégradé (g/l)	0	2,3	3,7	3,6

Après 12 jours d'incubation à 19 °C on n'observe aucune dégradation malolactique dans le vin ensemencé avec la biomasse seulement décongelée. Par contre, les inoculations avec les biomasses réactivées induisent les croissances maximales de l'ordre de 3 à 9,4 x 10^7 cellules par ml et la dégradation porte sur 51, 82 et 80 p. 100 de l'acide malique initial, selon que la préculture a duré 2 h, 24 h ou 6 jours. (Tableau II).

Cet essai montre qu'il n'est pas nécessaire de prolonger la durée de réactivation au-delà de 24 h. Néanmoins une culture de 2 à 6 jours peut être utilisée avec succès. Une culture de 5 à 6 jours présente l'avantage d'atteindre 2 à 5 x 10^9 cellules par ml (concentration maximale possible dans ce milieu) à partir d'une ensemencement de 10^6 cellules par ml ; pour obtenir la même concentration cellulaire avec une culture de 24 h il faut un ensemencement de 10^8 cellules par ml.

L'activité malolactique des extraits acellulaires de chacune de ces biomasses a été déterminée. Elle est respectivement de 0,49 ; 0,60 ; 0,89 ; 0,35 µmol de CO_2 par minute et par mg de protéine, selon qu'il s'agit de biomasses simplement décongelées ou réactivées 2 h, 24 h et 6 jours.

III. — INCIDENCE DE LA NATURE DE LA LEVURE ASSURANT LA FERMENTATION PRINCIPALE, SUR LA FERMENTATION MALOLACTIQUE.

Les bactéries réactivées par préculture pendant 24 h servent à inoculer 4 vins, à raisin de 10^6 cellules par ml. Ceux-ci sont issus de la fermentation d'un moût, ensemencé respectivement avec les levures sèches actives *S. cerevisiae* C 1, C 2 et *S. bayanus* B 1, B 2 ; ils sont amenés à pH 3.3, 11 p. 100 vol. éthanol et à une teneur de 4,5 g/l d'acide malique (Tableau III).

TABLEAU III

Incidence de la nature de la levure assurant la fermentation principale sur la fermentescibilité malolactique du vin

Résultats 12 jours après l'ensemencement par des bactéries réactivées 24 heures
Acide malique : 4,5 g par litre ; ensemencement bactérien : 10^6 cellules par ml.

	S. cerevisiae		*S. bayanus*	
	C_1	C_2	B_1	B_2
Population (cellules par ml x 10^7)	6,1	4,4	1,7	1,6
Acide malique (g/l)	3,5	3,7	2,5	2,5

Les bactéries se multiplient dans les différents vins et y induisent la fermentation malolactique ; néanmoins les populations au 12e jour sont environ trois fois plus importantes dans les vins issus de la fermentation de *S. cerevisiae,* 80 p. 100 de l'acide malique est dégradé, pour 55 p. 100 seulement dans les vins issus de *S. bayanus.* On observe un phénomène analogue à partir des inoculum réactivés pendant 6 jours ; en moyenne pour les 4 vins 68 p. 100 de l'acide malique est dégradé pour une réactivation de 24 heures et 51 p. 100 pour une réactivation de 6 jours.

IV. — ETUDE DE LA REACTIVATION EN CULTURE MIXTE LEVURES/BACTERIES.

Le but essentiel de cette expérience est de rechercher les conséquences d'une éventuelle réactivation des bactéries congelées, à partir du moût de raisin dans des conditions non stériles telles qu'on les rencontre dans la pratique, avec présence simultanée de bactéries et de levures.

TABLEAU IV

Incidence de la réactivation de la biomasse en présence de levures sur la croissance bactérienne et l'activité malolactique

Résultats 12 jours après inoculation de quatre vins issus de la fermentation du même moût par quatre souches levuriennes (levain réactivé 6 jours en présence de levures)

Ethanol : 11 % vol ; pH : 3,3 ; acide malique : 4,5 g par litre.

	Levure associée au levain bactérien				Moyennes
	C_1	C_2	B_1	B_2	
LEVURE DE FERMENTATION C_1					
Population bactérienne (cellules par ml x 10^7)	7,6	5,2	2,8	3,7	4,8
Acide malique dégradé (g par litre)	4,5	4,0	3,4	3,5	3,85 (86%)
LEVURE DE FERMENTATION C_2					
Population bactérienne (cellules par ml x 10^7)	7,0	4,9	2,8	5,6	5,1
Acide malique dégradé (g par litre)	4,5	1,6	3,8	1,8	2,93 (65%)
LEVURE DE FERMENTATION B_1					
Population bactérienne (cellules par ml x 10^7)	5,6	4,3	3,1	5,0	4,5
Acide malique dégradé (g par litre)	2,5	2,7	2,4	2,4	2,5 (56%)
LEVURE DE FERMENTATION B_2					
Population bactérienne (cellules par ml x 10^7)	5,4	5,4	3,3	4,6	4,7
Acide malique dégradé (g par litre)	2,6	2,7	2,6	2,4	2,6 (57%)
Pourcentage moyen d'acide malique dégradé	78	61	68	56	

On ensemence simultanément le milieu « M » avec 10^6 cellules par millilitre de bactéries décongelées et 10^4 cellules par ml de levures sèches actives, respectivement *S. cerevisiae* C 1, C 2 *S. bayanus* B 1, B 2. Les levures et les bactéries se développent simultanément ; les phénomènes d'antagonisme observés dans d'autres conditions ne semblent pas intervenir ; le sucre est transformé en alcool. Les bactéries réactivées pendant 6 jours servent à inoculer à raison de 10^6 cellules par ml les quatre vins issus de la fermentation du même moût par les mêmes levures, et ramenés aux mêmes caractéristiques de pH, titre alcoométrique et teneur en acide malique.

Les observations sont relevées 12 jours après l'inoculation des vins (Tableau IV). Les bactéries associées en préculture à la levure C 1 sont les plus efficaces avec 78 p. 100 de l'acide malique dégradé en moyenne dans les quatre vins. Certains couplages levure de fermentation/levure associée à la préculture, fournissent les fermentations malolactiques les plus rapides ; c'est le cas de *S. cerevisiae* C 1 (l'acide malique est totalement dégradé). La quantité d'acide malique dégradé en moyenne pour les quatre vins varie de 56 à 78 p. 100 selon la levure associée à la préculture bactérienne. Cette expérience montre que la présence des levures n'affecte pas l'efficacité des levains bactériens ; on confirme également dans ces essais que les vins issus de la fermentation de *S. cerevisiae* C 1, C 2 sont plus favorables à la dégradation malolactique (86 et 65 p. 100 de l'acide malique dégradé).

V. — INCIDENCE DE L'IMPORTANCE DE L'ENSEMENCEMENT SUR LA CROISSANCE BACTERIENNE ET LA FERMENTATION MALOLACTIQUE

A partir d'un levain de 6 jours en culture pure on réalise, dans les vins issus de la fermentation du même moût par *S. serevisiae* C 2 et *S. bayanus* B 1, des ensemencements de $1{,}8 \times 10^5$, $2{,}1 \times 10^6$ et $1{,}9 \times 10^7$ bactéries par ml ; compte tenu de la concentration cellulaire du levain (2×10^9 cellules par ml) la dilution est de 10^{-4}, 10^{-3}, 10^{-2}.

Dans le cas d'un ensemencement du vin de l'ordre de 10^7 cellules par ml, on n'observe pas de croissance (Tableau V). Les populations se maintiennent aux taux d'inoculation pendant les douze premiers jours et la totalité de l'acide malique est dégradée sensiblement à la même vitesse quelle que soit la levure responsable de la fermentation alcoolique ; la fermentation malolactique est terminée au 12e jour.

Avec un ensemencement de l'ordre de 10^6 cellules par ml, les populations maximales atteignent 10^7 cellules par ml environ au 12e jour. La fermentation malolactique porte sur 80 et 44 p. 100 de l'acide malique, selon que la souche levurienne responsable de la fermentation alcoolique est *S. cerevisiae* C 2 ou *S. bayanus* B 1.

Avec un ensemencement de l'ordre de 10^5 cellules par ml, on relève une population six fois plus abondante dans le vin issu de la fermentation de *S. cerevisiae* C 2 ; la dégradation porte respectivement sur 20 et 11 p. 100 de l'acide malique initial.

TABLEAU V

Incidence du taux d'ensemencement sur la croissance bactérienne et la fermentation malolactique dans les vins

Résultats 12 jours après inoculation des vins.
Ethanol : 11 % vol ; pH : 3,3 ; acide malique : 4,5 g par litre.

Ensemencement cellules par ml	Vins issus de la fermentation par			
	S. cerevisiae C_2		*S. bayanus* B_1	
	Population cellules par ml x 10^5	Acide malique dégradé (g par litre)	Population cellules par ml x 10^5	Acide malique dégradé (g par litre)
$1,8 \times 10^5$	59	0,9	10	0,5
$2,1 \times 10^6$	94	3,6	110	2,0
$1,9 \times 10^7$	150	4,5	150	4,5

VI. — INOCULATION DE *L. OENOS* GM A DIFFERENTES ETAPES DE LA FERMENTATION ALCOOLIQUE DU MOUT DE RAISIN.

Dans les conditions de la pratique, un moût extrait d'un mélange de cépages blancs Colombard et Ugni blanc, titrant 195 g de sucre par litre, pH 3,3 est sulfité à 9 g par hl. Après clarification par débourbage statique, il est réparti en fûts de 100 litres. On ensemence avec 10 g/hl de *S. cerevisiae* (LSA) et 10^6 cellules par ml de *L. oenos* simplement décongelé ou réactivé deux jours à 25 °C (Fig. 1).

On observe, dès le départ en fermentation une régression brutale de la population bactérienne de l'inoculum réactivé ou non. La fermentation alcoolique dure 10 jours ; on compte alors 10 à 100 bactéries par ml. On garde ensuite un échantillon de vin sur lie pendant 45 jours à 20 °C ; la teneur en acide malique reste inchangée (Figure 1).

Par contre, un ensemencement de bactéries réactivées ajoutées après l'achèvement de la fermentation alcoolique à raison de 5 x 10^6 cellules par ml a provoqué une dégradation totale de l'acide malique en une semaine.

Dans un deuxième exemple (Figure 2) le moût titrant seulement 166 g/l de sucre, fermente sans clarification ni sulfitage entre 18 et 28 °C par litre avec et sans addition de levain bactérien. La fermentation alcooli-

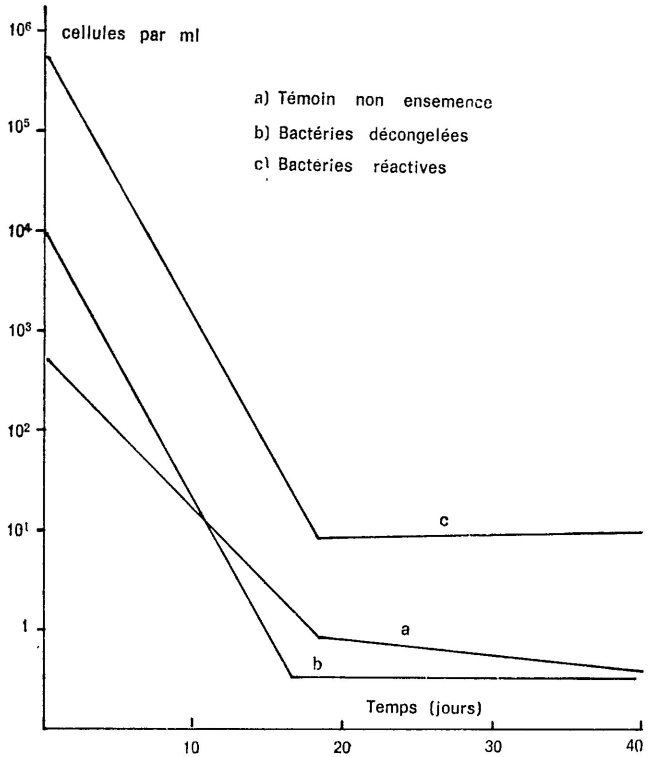


Fig. 1. — Evolution des populations lactiques lors d'un ensemencement d'un moût blanc. Sucres : 195 g par litre, SO_2 total : 90 mg par litre ; pH : 3,3

que extrêmement rapide dure 4 jours ; pendant ce temps, la population lactique indigène croît de 10^4 à 5 x 10^4 cellules par ml ; la population de l'inoculum de l'ordre de 5 x 10^5 par ml reste quasi-stationnaire. Dans les deux conditions, dès l'épuisement total du sucre et l'arrêt de l'activité levurienne, le taux de croissance s'accélère et porte la population maximale à 2 x 10^8 cellules par ml. L'acide malique est totalement dégradé au 12e jour.

Dans un troisième essai, on étudie l'intérêt éventuel d'ensemencements bactériens importants, à différentes étapes de la fermentation alcoolique.

Au laboratoire, du moût de raisin pH 3,3 enrichi à 204 g/l de sucre par addition de saccharose est ensemencé avec 100 mg par litre de *S. cerevisiae* (LSA) et fermenté à 19 °C. Les inoculations bactériennes (levain réactivé) sont effectuées à raison de 10^7 cellules par ml à quatre stades : (1) avant fermentation ; (2) dans le milieu titrant 25 g/l de sucre résiduel correspondant à la phase quasi-stationnaire de la population levu-

TABLEAU VI

Incidence sur la composition du vin d'inoculation de *Leuconostoc oenos* réactivé à différentes étapes de la fermentation alcoolique du moût

Moût de raisin : teneur en sucre : 204 g par litre ; pH : 3,3 ; acide malique : 4,7 par litre.

Moment de l'ensemencement bactérien	Durée d'incubation à 25°C	Glucose	Fructose	Acide malique	Acide citrique	Acide D (-) lactique	Acide acétique
Avant fermentation	1 mois	3,33	21,67	0,05	0,015	0,41	0,70
Pendant la phase stationnaire levurienne (sucres résiduels = 25 g par litre)	1 mois	0,06	1,57	3,98	0,170	0,17	0,36
	2 mois	0,01	0,08	3,20	-	0,18	0,38
Pendant la phase de déclin des levures (sucres résiduels = 5 g par litre)	1 mois	0,39	3,17	0,08	0,040	0,30	0,53
	2 mois	0,01	0,12	0	-	0,38	0,69
Dans le vin	1 mois	0,01	1,5	3,65	0,218	0,20	0,36
	2 mois	-	-	0	-	0,20	0,32

rienne ; (3) dans le milieu titrant 5 g de sucre par litre, correspondant à la phase de déclin levurienne ; (4) après épuisement du sucre (Tableau VI).

Un mois après les inoculations, les fermentations alcooliques sont arrêtées dans tous les cas ; mais les sucres résiduels sont respectivement de : 25 ; 1,6 ; 3,5 ; 1,5 g par litre dans les milieux 1, 2, 3, 4. Dans les milieux (1) et (3) l'acide malique est totalement dégradé mais les teneurs en acides acétique et D (—) lactique sont fortement augmentées par rapport à celles des milieux 2 et 4. La fermentation malolactique a été accompagnée d'une piqûre lactique ; l'activité bactérienne a géné la fermentation alcoolique.

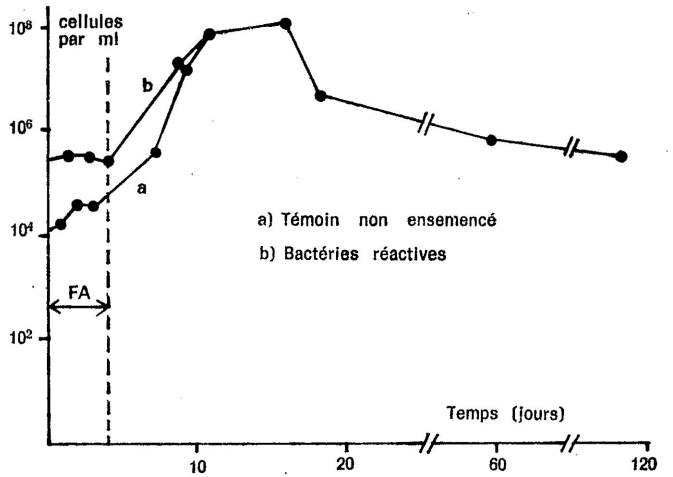


Fig. 2. — Evolution des populations bactériennes lors d'un ensemencement d'un moût blanc. Sucres : 166 g par litre SO_2 : absence ; pH : 3,2

Après deux mois, la fermentation malolactique est terminée dans le milieu 4 sans augmentation d'acidité volatile ; elle est à peine commencée dans le milieu 2.

DISCUSSION

Ce travail apporte un certain nombre de résultats concernant la stimulation de la fermentation malolactique des vins par ensemencement bactérien.

1. — La préparation industrielle de *L. oenos* expérimentée, livrée sous forme congelée, possède un taux de viabilité important après décongélation ; néanmoins, elle tolère mal le transfert dans le milieu défavorable que constitue le vin ; on observe une régression parfois considérable des populations. Il est indispensable de la réactiver avant l'emploi.

2. — La réactivation consiste essentiellement à porter les bactéries en phase de prolifération, dans un milieu induisant en particulier la synthèse d'une importante réserve d'enzyme malolactique.

En conséquence, de cette étude, on peut suggérer deux modalités de réactivation rapides et simples :

a) on suspend la biomasse décongelée dans dix fois son volume de moût de raisin stérile, dilué deux fois, désacidifié pour amener le pH à une valeur de 4,5, et enrichi par 5 g d'autolysat de levure par litre ; la population initiale est de 2 à 7 x 10^9 cellules par ml. Après 24 h d'incubation à 25 °C, on obtient une culture en phase de prolifération contenant de 5 x 10^9 à 10^{10} cellules par ml ; celle-ci est utilisée à 1 pour 1000, ce qui assure au vin une population initiale viable de 10^6 à 10^7 cellules par ml, nécessaire pour induire la croissance dans les délais convenables. Dans ce cas, la prolifération qui accompagne la réactivation est limitée ; elle n'est pas le but recherché essentiel.

b) On suspend la biomasse décongelée dans 10.000 fois son volume de moût de raisin frais, avec ses levures indigènes après l'avoir dilué et enrichi en autolysat de levures comme dans le cas précédent. La population initiale est de l'ordre de 10^6 cellules par ml. Après 4 à 6 jours d'incubation à 25 °C le sucre est épuisé par les levures et le milieu contient de 2 à 5 x 10^9 cellules bactériennes par ml ; il peut s'utiliser comme indiqué précédemment. Dans ce cas on réalise à la fois une multiplication et une réactivation. Ce procédé est plus long mais moins onéreux ; il faut moins de bactéries et la stérilisation n'est plus nécessaire.

Malgré leur simplicité apparente ces procédés supposent un contrôle régulier, pour éviter en particulier des déviations bactériennes et des contaminations par les bactéries acétiques. Pour plus de sécurité, il serait souhaitable que la réactivation soit assurée par des laboratoires spécialisés.

3. — La vitesse de dégradation de l'acide malique est directement liée, toutes choses égales, au taux d'inoculum dans le vin ; au-dessous de 10^6 cellules par ml de bactéries réactivées, la croissance devient aléatoire et, dans le cas où elle se produit, la durée de la fermentation malolactique est prolongée.

4. — On confirme l'incidence de la souche de levure assurant la fermentation principale sur la fermentescibilité malolactique des vins ; un ensemencement bactérien important permet de l'atténuer. Dans ces essais les deux souches de *S. cerevisiae* (LSA) fournissent des vins plus favorables à l'activité malolactique que les deux souches de *S. bayanus* (LSA). La production de SO_2 n'est pas en cause ; elle est voisine dans les deux cas, variant de 8 à 16 mg/l. Par contre, une croissance bactérienne facilitée pourrait être expliquée par une plus grande richesse en azote aminé

et peptidique des vins issus de la fermentation de *S. cerevisiae* (CIOLFI, 1982). Les préparations à base de cette espèce devraient être préférées pour l'ensemencement des moûts pour lesquels la désacidification bactérienne est souhaitée au niveau du vin. Ces résultats permettent en outre, d'interpréter certaines différences dans la fermentescibilité malolactique des vins, observées dans les conditions de la pratique, parfois entre deux crus voisins.

5. — En ce qui concerne le moment le plus favorable aux inoculations bactériennes, nos essais montrent la complexité du problème et l'impossibilité, en l'état actuel de nos connaissances de donner une solution valable dans tous les cas. On explique ainsi la variabilité des suggestions émises par les différents auteurs (PEYNAUD, 1959 ; WEBB et INGRAHAM, 1960, 1962 ; KUNKEE et *al.*, 1964 ; RIBEREAU-GAYON et *al.*, 1976 ; GALLANDER, 1979). On a préconisé l'ensemencement, au niveau du moût avant, pendant, ou en fin de fermentation, au niveau du vin ; pour d'autres auteurs le moment est sans importance.

Pour interpréter ces différences, il serait indispensable d'étudier systématiquement l'ensemble des facteurs et leur interaction, qui contrôlent l'antagonisme des levures et des bactéries cherchant à se développer simultanément dans le moût de raisin. A notre connaissance une recherche de cet ordre n'a jamais été conduite. Il intervient a priori : la nature des populations levuriennes et bactériennes, leur rapport en nombre, initialement ; la composition du moût, sa richesse nutritionnelle, la teneur éventuelle en substance antilevure et antibactérie, la concentration en sucre, la teneur en anhydride sulfureux, la température de la fermentation alcoolique, sa durée, le pH, etc.. Nos essais montrent qu'un ensemencement bactérien au niveau du moût peut entraîner, selon les conditions, à différentes situations :

— Une inhibition importante des bactéries, qui se solde par une extinction quasi-totale des populations ; c'est le cas le plus fréquemment observé en vinification en Bordeais, dans des conditions de la pratique, avec des moûts sulfités et relativement riches en sucre, dont la fermentation se prolonge plusieurs jours.

— Une inhibition partielle des bactéries qui se traduit par le maintien de la population en latence ou laisse place à une croissance limitée pendant la fermentation alcoolique ; c'est le cas observé en particulier en vinification des vins de base des Cognac, correspondant à des moûts moins riches en sucre, non clarifiés et non sulfités, dans lesquels la fermentation alcoolique est rapide.

— Une inhibition partielle des levures, qui se manifeste par un arrêt de la fermentation principale avant l'épuisement total du sucre et par une piqûre lactique. C'est le cas dans l'expérimentation citée (Tableau VI) où

sont réunis une fermentation alcoolique lente (1 mois) et un fort ensemencement bactérien.

Le moment de l'introduction des bactéries à forte concentration influe sur l'inhibition des levures. 1°) avant le départ en fermentation cette incidence est importante ; 2°) en phase de déclin l'action est limitée ; 3°) en phase quasi stationnaire elle n'intervient pas. Ces remarques permettent d'interpréter sur le plan pratique certains arrêts de fermentation ; ils incitent à modifier le sulfitage selon les conditions, afin de retarder suffisamment le développement bactérien.

Dans le cas le plus général de la vinification, en particulier en Bordelais, il est impératif de ne pratiquer l'ensemencement qu'au niveau du vin.

CONCLUSION

L'ensemble de ces résultats définit des conditions permettant une bonne maîtrise de la fermentation malolactique et une réduction notable de sa durée. L'inoculation des vins, conservés à une température voisine de 19 °C, doit être faite par des biomasses de *L. oenos* portées dans un état favorable au moyen d'un procédé particulier, et mises en œuvre dans des conditions déterminées. On ne saurait trop encourager la biotechnologie industrielle à produire des bactéries lactiques œnologiques comme elle produit déjà des levures. Un tel procédé doit permettre de généraliser la fermentation malolactique lorsqu'elle est particulièrement difficile (vins blancs) ; de toute façon, le coût des inoculum bactériens serait aisément compensé pour l'utilisateur par les économies de chauffage.

Ce travail s'inscrit dans le programme de recherches conduit par l'Institut d'Œnologie en collaboration avec le Conseil Interprofessionnel du vin de Bordeaux et la D.G.R.S.T. (convention n° 81 C 1337 du 2-12-1981).

Manuscrit reçu le 3 janvier 1983 ; accepté pour publication le 4 mars 1983.

RÉSUMÉ

La stimulation de la fermentation malolactique peut être obtenue par ensemencement des vins à l'aide d'une biomasse de **L. oenos** industrielle. L'utilisation de celle-ci, présentée sous forme congelée, nécessite une réactivation préalable de fermentation alcoolique dont les modalités sont précisées. La levure responsable intervient sur la fermentescibilité malolactique des vins, ce qui explique certaines différences observées dans la pratique ; parmi les souches de levures sèches commercialisées celles de **S. cerevisiae** paraissent plus favorables que **S. bayanus.**

SUMMARY

Stimulation of malolactic fermentation can be obtained by adding to wine an industrial biomass of **L. oenos.** Before use, deepfreeze bacteria need to be reactivated according to some special conditions which have been studied. Yeasts

concerned in alcoholic fermentation have an influence on malolactic fermentation capacity of wines ; this fact is in connection with some differences observed in wine technology. Among the strains of commercial dry yeasts, the influence of **S. cerevisiae** is lower than that of **S. bayanus.**

ZUSAMMENFASSUNG

Die Aktivierung der malolaktischen Gärung kann durch Zusat z einer industriell hergestellten Biomasse von **L. oenos** erfolgen. Die Anwendung dieser Biomasse in tiefgefrorener Form benötigt eine vorherige Reaktivierung bei der präzise modalitäten, die zu beachten sind. Die bei der alkoholischen Gärung vorkommende Hefe beeinflusst die malolaktische Gärung, was dazu führt, dass in der Praxis Differenzen aufgetreten sind : bei denen im Handel zu findenden Trockenhefen hat sich herausgestellt, dass **S. cerevisiae** einen besseren Einfluss als **S. bayanus** ausübt.

RESUMEN

La aparición de la fermentación maloláctica se puede obtener por siembra de los vinos biomasa industrial de **L. oenos.** Esta biomasa que se presenta congelada necesita una previa reactivación en condiciones que se describen. La levadura responsable de la fermentación alcohólica interviene en la fermentabilidad maloláctica de los vinos, lo que explica algunas diferencias observadas en la práctica ; las cepas de levaduras secas comerciales de **S. Cerevisiae** aparecen como más favorables que las de **S. bayanus.**

RIASSUNTO

La stimolazione della fermentazione malolattica puô esser ottenuta con seminatura dei vini con una biomazza di **L. oenos** industriale. L'utilisazione di quella, presentata sotto forma congelata, necessita una reattivazione preliminare, le cui modalità sono precisate. Il lievito responsabile della fermentazione alcolica intervienne sulla fermentescibilità malolattica dei vini, ciò che spiega certe differenze osservate nella pratica ; tra le specie di lieviti secchi commercializzate, quelle di **S. cerevisiae** sembrano più efficaci che **S. bayanus.**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BERGEMEYER H.U., 1974. Methods of enzymatic analysis. Academic Press, London.

CARRE E. 1982. Recherches sur la croissance des bactéries lactiques en vinification. Désacidification biologique des vins. *Thèse de 3e cycle,* Université de Bordeaux II.

CHAUMET P., 1981. Stimulation de l'activité métabolique des levures et des bactéries lactiques dans les moûts et les vins. *Diplôme d'Etudes Approfondies,* Université de Bordeaux II.

CIOLFI B., 1982. Contribution à l'étude de la nutrition azotée des bactéries du vin. *Diplôme d'Etudes Approfondies.* Université de Dijon.

FEUILLAT M., BIDAN P. et ROSIER Y., 1977. Croissance des bactéries lactiques à partir des principaux constituants azotés du vin. *Ann. Technol. Agric.*, **26**, N° 4, 435-447.

GNAEGI F., 1982. La désacification des vins. *Rev. Suisse Vitic. Arboric. Hortic.*, **14**, 147-154.

KUNKEE R.E., OUGH C.S. et AMERINE M.A., 1964. Introduction of malolactic fermentation by inoculation of must and wine with bacteria. *Am. J. Enol. Vitic.*, **15**, N° 4, 178-183.

LAFON-LAFOURCADE S., 1970. Etude de la dégradation de l'acide L malique par les bactéries lactiques non proliférantes isolées des vins. *Ann. Technol. Agric.*, **19**, N° 2, 141-154.

LAFON-LAFOURCADE S., 1973. De la fermentescibilité malolactique des vins. Interactions levures-bactéries. *Connaissance Vigne Vin*, **7**, N° 3, 203-207.

LAFON-LAFOURCADE S. et JOYEUX A., 1979. Techniques simplifiées pour le dénombrement et l'identification des microorganismes vivants dans les moûts et les vins. *Connaissance Vigne Vin*, **13**, N° 4, 295-310.

LONVAUD M., 1975. Recherche sur l'enzyme des bactéries lactiques du vin assurant la transformation du malate en lactate. *Thèse de 3e cycle.* Université de Bordeaux II.

PEYNAUD E. et DOMERCQ S., 1959. Possibilité de provoquer la fermentation malolactique en vinification à l'aide de bactéries cultivées. *C.R. Acad. Agric.*, **45**, 355.

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

WEBB R.B. and INGRAHAM J.L., 1960. Induced malolactic fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.*, **11**, N° 2, 59-63.

WEBB R.B., 1962. Laboratory studies of the malolactic fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.*, **13**, N° 3. 189-195.