ÉTUDE MICROBIOLOGIQUE DES BACTÉRIES DE LA FERMENTATION MALOLACTIQUE (1)

F. RADLER,

Professeur de microbiologie à la Faculté des Sciences de Mayence,
Directeur de l'Institut de Recherches sur le Vin.

C'est un très grand honneur pour moi de parler dans cette université de renommée internationale. Je vous remercie très cordialement pour l'invitation amicale qui m'a été adressée.

Un des plus importants composants du goût des vins, c'est son acidité. C'est pourquoi dans l'élaboration des vins une des tâches essentielles est la fixation de l'acidité totale à une valeur convenable. Dans les moûts de raisins, qui à la suite d'une bonne maturation n'ont qu'une très petite teneur en acide, on s'efforcera de maintenir cette acidité; dans les vins élaborés à partir de raisins moins mûrs, on sera obligé de l'abaisser.

Pour diminuer l'acidité des vins, à part le coupage avec des vins peu acides il existe les méthodes chimiques et biologiques. La plus importante méthode chimique est l'addition de carbonate de calcium dans le moût. Par ce moyen, l'acide tartrique est précipité. Ces dernières années cette désacidification par la chaux fut un peu améliorée par le procédé dit méthode du sel double. Par ce procédé il est possible de faire précipiter non seulement l'acide tartrique mais encore en même temps une quantité équimolaire d'acide malique. La méthode du sel double, pendant ces dernières années, a été appliquée en Allemagne avec succès, et récemment, elle fut légalement autorisée. Une autre méthode chimique, mais qui n'est pas autorisée en Allemagne pour les vins, est l'utilisation des échangeurs d'ions.

Par la méthode biologique, une forte acidité du moût de raisins peut être diminuée par l'utilisation de la levure **Schizosaccharomyces.** Toutefois cette possibilité est actuellement encore au stade de l'expérimentation, elle n'est utilisée qu'à titre d'essais à l'échelle industrielle. Par contre, la fermentation malolactique est actuellement un procédé répandu et généralement connu, qui entraîne une forte diminution de l'acidité du vin. Cette fermentation malolactique est provoquée par des bactéries, plus précisément par les bactéries lactiques.

(1) Conférence donnée le 5 décembre 1967 à la Faculté des Sciences de Bordeaux.

L'existence des bactéries dans le vin est une découverte de PASTEUR, qui les a considérées cependant comme nuisibles et qui a décrit les changements indésirables qu'elles peuvent provoquer dans le vin. Ce n'est qu'à la fin du siècle dernier que l'on a su que les bactéries pouvaient provoquer une diminution de l'acidité du vin et qu'elles peuvent, lorsque les circonstances s'y prêtent, influencer favorablement la qualité du vin. Nous sommes redevables de la description exacte des bactéries en question à MULLER-THURGAU et OSTERWALDER qui ont publié leurs travaux au début de ce siècle.

Dès lors, la fermentation malolactique est devenue l'objet de nombreuses recherches. Je me permettrai de dire, sans exagérer, que les plus importantes recherches ont été effectuées ici, à la Station Œnologique de Bordeaux. Parallèlement, dans de nombreux autres Instituts, la fermentation malolactique était devenue l'objet de recherches intensives : en Amérique, en Russie, au Japon, en Australie, en Afrique du Sud et dans tous les pays viticoles de l'Europe.

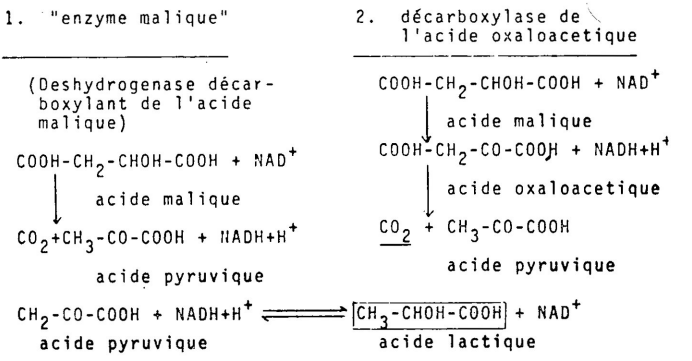
Grâce à la recherche intensive on connaît à présent les facteurs qui conditionnent le déroulement de la fermentation malolactique. Ainsi, la mise en caves tempérées, un soutirage tardif, une petite addition ou même sans l'addition d'acide sulfureux, ainsi que par l'augmentation de la valeur du pH par désacidification avec du carbonate de calcium et éventuellement en y ajoutant les lies récentes d'un vin après une fermentation malolactique ou par l'inoculation de souches de bactéries appropriées, on peut influencer favorablement la fermentation malolactique. Les mesures contraires mènent vers l'empêchement de la fermentation malolactique. Il n'est pas exagéré de dire que, sous certaines conditions favorables à l'écoulage, on peut actuellement, avec une assez grande certitude, déclencher ou empêcher la fermentation malolactique. Mais souvent les difficultés proviennent de ce que les conditions techniques ne sont pas favorables ou qu'elles ne sont pas telles que l'on aurait voulu. Je reviendrai, vers la fin de mon exposé, sur quelques problèmes particuliers de la fermentation malolactique.

La plus importante transformation pendant la fermentation bactérienne est la décarboxylation de l'acide malique en acide lactique et gaz carbonique (Tabl. 1). Dans ce cas, la réaction se déroule en plusieurs phases. Il est possible que l'acide malique, par une déshydrogénation, soit oxydé d'abord en acide oxalacétique qui est décarboxylé en acide pyruvique et ce dernier est réduit en acide lactique. Une deuxième réaction possible est la décarboxylation oxydative de l'acide malique en acide pyruvique. Dans les deux cas, la dernière réaction sera la même, c'est-à-dire la réduction de l'acide pyruvique en acide lactique. A la base des travaux de JERCHEL et de ses collaborateurs, les effets des deux réactions enzymatiques ont été démontrés pour les bactéries lactiques du vin. Cependant,

il est probable que, dans les conditions du vin, il en résulte une décarboxylation oxydative directe de l'acide malique avec l'enzyme que l'on désigne comme « enzyme malique ».

TABLEAU 1

La décarboxylation bactérienne de l'acide malique



Les responsables de la fermentation malolactique sont les bactéries, et notamment les bactéries lactiques. Pratiquement toutes les bactéries lactiques importantes ayant une température optimum de développement basse ont été décelées dans le vin : les **Lactobacillus, Leuconostoc** et **Pediococcus** (fig. 1). Toutes les bactéries lactiques importantes apparaissent dans le vin et tous ces organismes sont en état de transformer l'acide malique en acide lactique et gaz carbonique.

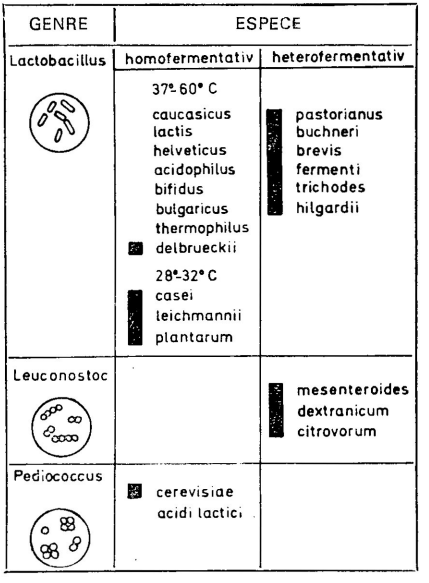


Fig. 1. — Bactéries lactiques (selon BERGEY'S MANUAL) décarboxylant l'acide L-malique. ■ Espèces isolées du vin

Le phénomène de la fermentation malolactique n'est pas homogène. Des organismes très différents y prennent part et il en résulte que divers chercheurs obtiennent des résultats différents s'ils travaillent avec des espèces différentes, voire même des genres très différents de bactéries. La situation devient encore plus embrouillée car les bactéries qui apparaissent dans le vin peuvent, dans certaines circonstances, non seulement effectuer la fermentation désirée de l'acide malique, mais accomplir aussi d'autres transformations qui sont très nuisibles au vin, telles que la fermentation du sucre en acide lactique, la transformation du glycérol ou de l'acide tartrique. Il est évident qu'il n'est pas possible de traiter à fond, en si peu de temps, un domaine aussi complexe que la fermentation malolactique.

C'est pourquoi je voudrais me limiter à trois petits chapitres de la fermentation malolactique dont je me suis particulièrement occupé :

1°) l'importance biologique de la transformation enzymatique,

2°) les changements possibles du vin par les bactéries de la fermentation malolactique,

3°) la présence de cette fermentation dans les vins de qualité supérieure allemands.

Longtemps on a considéré que la fermentation de l'acide malique fournissait aux bactéries l'énergie nécessaire pour leur croissance. Pourtant, en 1943 déjà, SCHANDERL a indiqué que la chaleur de combustion de l'acide malique est plus basse que la chaleur de combustion de l'acide lactique. Des calculs plus précis, fondés sur les renseignements de KREBS, montrent que la transformation de l'acide malique en lactate est effectivement une réaction exothermique et que, à cette occasion, se dégage une petite quantité de chaleur (Tabl. 2).

TABLEAU 2

La décarboxylation de l'acide malique : une réaction exothermique

	ΔG =
$Malate^{--} + NAD^{+} \rightarrow Oxalacetate^{--} + NADH + H^{+}$;	+8,30 kcal
$Oxalacetate^{--} + H_2O \rightarrow Pyruvate^{-} + HCO_3^{-}$;	-5,25 kcal
$Pyruvate^{-} + NADH + H^{+} \rightarrow Lactate^{-} + NAD$;	-4,60 kcal
$Malate^{--} + H_2O \rightarrow Lactate^{-} + HCO_3^{-}$;	-1,55 kcal

Il se peut que les réactions partielles mentionnées ci-dessus ne correspondent pas exactement à la réalité. Cependant, il est certain que la décarboxylation de l'acide malique produit une petite quantité de chaleur. Cette production de chaleur a été mesurée également par SCHMIDT, qui a trouvé une valeur pour ΔQ d'environ + 2 kilocalories pour chaque molécule.

Toutefois, il est évident que ce gain d'énergie est trop petit pour que les bactéries puissent l'utiliser. La suite de la réaction ne permet aucune possibilité, de quelque manière que ce soit, pour que des combinaisons riches en énergie puissent apparaître pendant la décarboxylation de l'acide malique en acide lactique. Il n'y a aucune possibilité ni pour une phosphorylation du substrat, ni pour une phosphorylation oxydative, d'autant plus que les transformations de l'acide malique en acide lactique et gaz carbonique se font quantitativement, comme on l'avait démontré, depuis des dizaines d'années déjà, ici, à Bordeaux.

Il est très facile de démontrer par un essai, que la décarboxylation de l'acide malique ne mène pas vers une augmentation de la masse bactérienne (Tabl. 3). Lors de cet essai, il en est résulté une très petite quantité de bactéries, mais exactement déterminée, dans un milieu synthétique, qui contenait toutes les substances excepté des hydrates de carbone.

TABLEAU 3

Influence de l'acide L-malique sur la croissance de **Lactobacillus** (souche 2 L) dans le milieu synthétique en absence des hydrates de carbone

Poids des bactéries	pour l'inoculation mg/ml	0,1	0,2
	au fin d'expérience mg/ml	0,1	0,2
acide (L)-malique	ajouté mg/ml	0	20,0
	décarboxylé mg/ml	-	17,4
pH		5,92	5,85
addition pendant l'expérience pour constance du pH		1,4 µl n/10 NaoH	0,13 ml n HCl

Avec ou sans acide malique dans le milieu, la croissance des bactéries n'a pas eu lieu. La valeur pH dans cet essai était restée constante. En y ajoutant 20 mg d'acide malique, l'acide malique était complètement décarboxylé mais la croissance significative des bactéries n'a pas eu lieu.

Dans des expériences avec de l'acide malique radioactif, SCHMIDT et ses collaborateurs ont pu démontrer que l'acide malique radioactif n'est pas utile pour la synthèse de la masse bactérienne. La fermentation de l'acide malique est un processus purement catabolique, qui ne mène

pas vers la biosynthèse d'une substance cellulaire. En effet, dans le cas d'une inoculation minime de masse bactérienne, les bactéries utilisent l'hydrate de carbone pour la croissance et en même temps pour la décarboxylation de l'acide malique. Ceci est indiqué dans un essai (Tabl. 4) montrant la relation entre la décarboxylation de l'acide malique et la quantité d'hydrate de carbone existant dans le milieu. Si dans le milieu

TABLEAU 4

Décarboxylation de l'acide L-malique par des bactéries lactiques en relation avec la quantité de sucre du milieu (milieu semi synthétique, hydrolysat de saccharose, 7 jours à 23°C.)

sucre en milieu		mg/ml	0	0,08	0,15	0,38	0,76	2,2	7,5
Lacto-bacillus plantarum	poids de bactéries	mg/ml	0	0,05	0,05	0,12	0,27	0,65	1,0
	acide malique décarboxylée	mg/ml	0	1,2	1,6	3,0	3,7	3,7	3,7
		%	0	32	43	81	100	100	100
Lacto-bacillus souche 2L	acide malique décarboxylée	mg/ml	0,2	3,3	3,7	3,7	3,7	3,7	3,7
		%	5	89	100	100	100	100	100
Lacto-bacillus s. 16a	acide malique décarboxylée	mg/ml	0	0	1,0	1,6	-	1,6	3,7
		%	0	0	27	43	-	43	100

n'existe aucun hydrate de carbone, aucune quantité ou seulement une quantité minime d'acide malique sera décarboxylée. Avec l'existence des très petites quantités d'hydrate de carbone il s'ensuit une décarboxylation. Pour l'espèce **Lactobacillus plantarum** déjà 0,08 mg d'hydrate de carbone suffisent pour la fermentation de plus de 30 % de l'acide malique primitivement existants. Bien que chacune des espèces de bactéries soit différente l'une de l'autre, on peut dire pour simplifier, que pour décarboxyler 1 g d'acide malique il faut développer environ 10 mg de masse bactérienne. Pour leur croissance ces bactéries ont besoin de 100 mg d'hydrate de carbone. Selon le type de leur fermentation, les sucres seront transformés par les bactéries lactiques, ou bien de manière homofermentative en acide lactique ou bien de manière hétérofermentative en acide lactique, éthanol et gaz carbonique.

Sans la présence d'une très petite quantité, même minime, d'hydrate de carbone, aucune croissance ne peut se produire chez de nombreuses souches. Si la croissance des cellules n'est pas possible, il est naturel qu'il n'y ait pas d'acide malique décarboxylé. Ainsi la présence d'hydrate de carbone est indirectement nécessaire pour que l'acide malique puisse être décarboxylé. Je dois cependant souligner que, pour la réaction de décarboxylation elle-même, la présence d'hydrate de carbone, bien sûr, n'est pas obligatoire. Au contraire, l'hydrate de carbone peut avoir un effet de retardement. De plus, en l'absence d'hydrate de carbone, il est possible de transformer avec quelques mg de masse bactérienne sèche à peu près

1 g d'acide malique. Ceci est également compréhensible, étant donné que la décarboxylation de l'acide malique en acide lactique est finalement une réaction exothermique, donc une réaction qui fournit de l'énergie. L'énergie qui se dégage pendant une transformation quantitative de l'acide malique ne peut pas être utilisée par les bactéries.

Bien que la quantité d'hydrate de carbone utilisée par les bactéries soit minime, déjà en 1938 il a été démontré par RIBÉREAU-GAYON et plus tard par MELAMED et DUPUY, que simultanément avec la fermentation malolactique commence une diminution du sucre résiduel dans le vin. Sans doute, si les circonstances s'y prêtent, l'inositol peut être transformé par les bactéries, et je voudrais admettre — cela peut être démontré dans des essais — que les organismes peuvent utiliser, à la place d'hydrates de carbone, de l'acide glutamique ou peut-être d'autres substances. Une telle transformation des acides aminés serait tout à fait en accord avec les constatations expérimentales. Il faut dire qu'il a été prouvé, entre autres par ARCHINARD et auparavant par HENNING et OHSKE que pendant la fermentation malolactique il y a augmentation de la teneur en ammonium du vin.

La nécessité d'hydrates de carbone pour les bactéries de la fermentation malolactique peut être démontrée aussi par d'autres méthodes. Déjà peu de temps après la découverte de « l'enzyme malique », BLANCHARD et OCHOA avaient montré que cet enzyme dans **Lactobacillus arabinosus** est inductible.

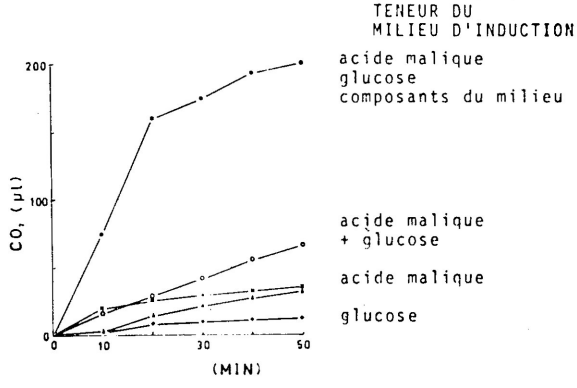


Fig. 2. — Présomption de l'induction de l' « enzyme malique » de **Lactobacillus** (souche 2 L)

Pour l'induction de cet enzyme, qui, normalement, se trouve dans cet organisme seulement en faible concentration dans les cellules, les composants normaux du milieu, hydrate de carbone et le substrat, donc l'acide malique, sont nécessaires. Comme le montre la figure 2, dans un essai, en l'absence de l'acide malique, les bactéries ont été précultivées et ensuite incubées pendant trois heures et demie en milieux de compositions différentes pour l'induction de « l'enzyme malique ». C'est seulement si l'acide

malique, l'hydrate de carbone et les composants du milieu sont présents en même temps qu'il peut apparaître dans ces conditions, une importante quantité d'enzymes, ce que montre la formation accrue d'acide carbonique à partir de l'acide malique.

TABLEAU 5

Influence de l'acide malique sur la formation inductive de l' « enzyme malique » de **Lactobacillus** (souche 2 L)

acide D,L-malique dans le milieu d'induction (mol)	l'activité de l'enzyme (μl CO_2/mg poids secs des bactéries. min)
0	0,39
0,003	1,9
0,015	4,6
0,075	6,5
0,22	7,3
0,75	0,6

Comme l'indique le tableau 5, des quantités minimes d'acide malique suffisent pour l'induction. Déjà avec 0,07 mole d'acide malique dans le milieu d'induction, sera atteinte une induction maximum. Sous les mêmes conditions, une concentration de 10 % de glucose se trouve être la plus favorable pour l'induction (Tabl. 6).

TABLEAU 6

Influence du glucose sur la formation inductive de l' « enzyme malique » de **Lactobacillus** (souche 2 L)

glucose dans le milieu d'induction (%)	l'activité de l'enzyme (μl CO_2/mg poids secs des bactéries. min)
0	0,52
0,01	1,0
0,1	2,9
1,0	4,1
10	6,6
40	2,8

Mais déjà, 0,01 % ou 100 mg de glucose par litre suffisent pour mettre en marche le mécanisme d'induction. Les inductions, dans des conditions données, ne nécessitent pas n'importe quel hydrate de carbone, en effet, celui-ci doit être fermentescible.

Dans l'essai d'induction de la figure 3 ont été employées des cellules qui avaient été précultivées ou bien normalement en milieu glucosé ou bien en milieu lactosé. Les cellules précultivées au glucose sont indiquées par un trait continu, celles précultivées au lactose par un trait pointillé. Les cellules précultivées au glucose ne peuvent former « l'enzyme malique » si comme hydrate de carbone il leur est fourni un milieu d'induction au lactose. D'autre part les cellules précultivées non seulement au lactose mais encore au glucose ne peuvent pas former d'« enzyme induit ».

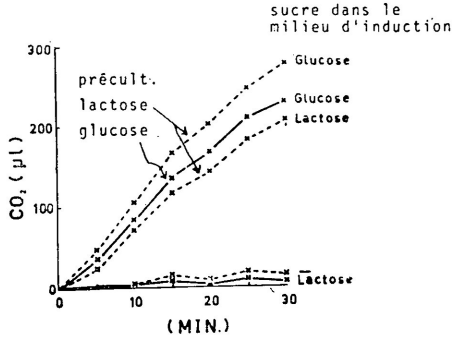


Fig. 3. — Induction de l' « enzyme malique » de **Lactobacillus** (souche 2 L) en présence de glucose et de lactose par des cellules précultivées au glucose (—) ou au lactose (- - -)

L'explication en est simple : ces cellules ont été amenées, par la préculture au lactose, à former l'enzyme β-galactosidase; elles sont donc capables de décomposer le lactose et de provoquer la fermentation des monosaccharides. La nécessité d'un hydrate de carbone montre clairement qu'il n'y a ainsi aucun effet, nommé « glucose » dans la formation induite de l' « enzyme malique » par des bactéries lactiques, effet qui est connu pour de nombreux autres enzymes induits et qui empêche la formation d'enzymes.

Le mécanisme d'induction pour l'enzyme malique est totalement spécifique. NATHAN a fait des recherches sur l'aptitude de 30 acides carboxyliques à induire l'enzyme malique. Seuls le fumarate, le mésaconate et le DL-méthylsuccinate avaient une aptitude restreinte à l'induction d'enzyme. En ce qui concerne l'acide oxalacétique et l'acide acétoacétique la situation est plus compliquée, dans la mesure où les décarboxylases de l'acide oxalacétique peuvent être induites séparément et où aussi les perméases peuvent être induites séparément.

L'acide D-malique, stéréoisomère de l'acide L-malique n'induit pas « l'enzyme malique ». Mais ce n'est pas du tout exact que l'acide D-malique soit totalement inerte comme le dit BLANCHARD.

J'ai trouvé qu'à fortes concentrations l'action inductive de l'acide L-malique est supprimée par l'acide D-malique. L'acide L-malique et une dose double d'acide D. L-malique ont la même action inductive. Avec un excédent d'acide D-malique l'induction d'enzyme ne se produit pas cependant.

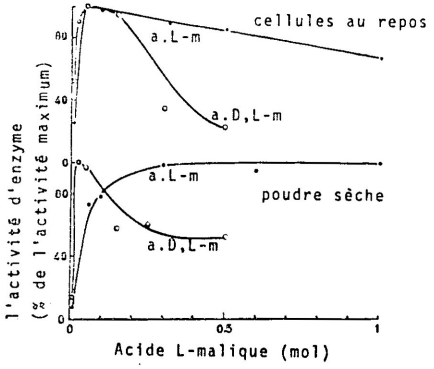


Fig. 4. — Freinage de la décarboxylation de l'acide L-malique par l'acide D-malique

Comme la figure 4 le montre, l'activité enzymatique d'une poudre sèche préparée à l'acétone n'est pratiquement pas freinée par un excès de substrat de l'acide L-malique. Par contre, les acides D et L-malique produisent une inhibition à 50 % lorsque des quantités équimolaires d'acide L et D-malique sont utilisées. Si des cellules au repos sont employées à la place d'une préparation d'enzyme le freinage de l'acide D-malique est encore plus fort. La perméase est probablement également gênée dans ce cas.

Lors d'une représentation graphique de la concentration de l'acide D-malique pour i. $\alpha/1-\alpha$ on obtient une droite qui indique un ralentissement compétitif de l'acide D-malique (fig. 5). L'action de ralentissement de l'acide D-malique est naturellement d'un intérêt purement théorique puisque cette liaison n'a pas lieu dans le vin. Il est plus intéressant de noter que l'induction de l'enzyme malique peut être fortement influencée par l'acide sulfureux. Déjà 8 mg par litre d'acide sulfureux produisent un freinage de 82 % de l'activité enzymatique dans les conditions de l'expérience, dans lesquels l'acide sulfureux se trouve sous une forme libre et aucune liaison n'existe dans le milieu qui puisse fixer l'acide sulfureux en quantité appréciable. Donc, la croissance des bactéries lactiques, ainsi que l'induction « d'enzyme malique » sont freinées par l'acide sulfureux.

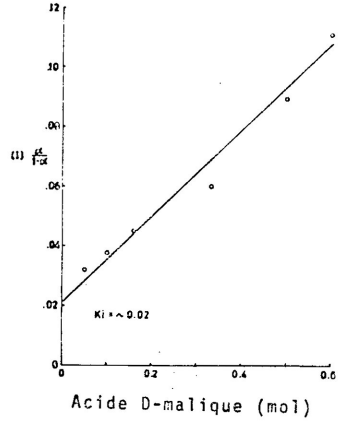


Fig. 5. — Freinage compétitif de la décarboxylation de l'acide L-malique par l'acide D-malique

L'exposé ci-dessus a dû donner l'impression que pour la plupart des bactéries qui se trouvent dans le vin, « l'enzyme malique » ou l'enzyme qui produit la décarboxylation de l'acide malique doit exister comme enzyme inductif. Ce n'est pourtant pas le cas comme le montre le tableau 7. L'enzyme est inductible par **Lactobacillus plantarum** et **casei.** Pour les autres souches l'enzyme semble déjà exister comme constituant.

TABLEAU 7

Formation des enzymes décarboxylant l'acide L-malique

Souche	L'activité d'enzyme (µl CO_2/mg matière seche.min)	
	bactéries induites avec l'acide malique	non induites
Lactobacillus casei	5,6	1,0
Lactobacillus 11a	14,4	6,3
Lactobacillus brevis	1,6	1,9
Pediococcus cerevisiae	10,9	4,0
Leuconostoc 12a	24,3	1,5 - 16,2
Leuconostoc 16a	18,6	5,0 - 16,2
Leuconostoc 45b	8,7 - 15,1	6,3 - 15,3
Leuconostoc M6	3,2 - 6,1	6,2 - 14,0

La situation est cependant, dans une certaine mesure peu claire, lorsque par exemple pour les souches de **Leuconostoc** la durée de l'activité enzymatique est relativement insignifiante. Aussitôt que la phase de croissance stationnaire est atteinte il en résulte une très rapide chute de l'activité enzymatique. Dans les cellules croissant activement l'activité enzy-

matique peut être substantiellement plus haute (la quantité de substance sèche étant toujours calculée) que pour **Lactobacillus arabinosus** ou **casei.**

L'activité enzymatique des bactéries lactiques, même lorsqu'elles sont cultivées en l'absence de l'acide malique peut être extrêmement forte. Elle représente jusqu'à 20 mmoles transformées pour chaque mg de substance sèche et par minute. On peut maintenant se demander quelle signification biologique a un enzyme qui, ou bien se trouve constitutif à haute concentration dans la cellule, ou bien est formé par induction utilisant de l'énergie. J'avais montré auparavant qu'une accélération de la croissance des cellules par l'acide malique n'est pas démontrable si la valeur pH du milieu n'est pas tenue constante.

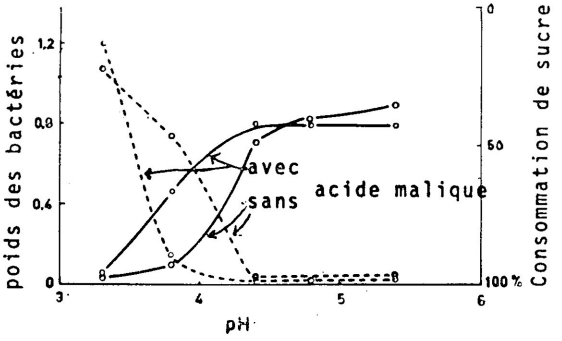


Fig. 6. — Croissance et consommation de sucre par **Lactobacillus** en relation avec le pH du milieu et la présence de l'acide malique

Une action d'accélération de la croissance des cellules par l'acide malique peut cependant être démontrée par des valeurs pH moindres. Le métabolisme normal des bactéries lactiques est la fermentation du sucre qui est transformé en acide lactique et, découlant de ce type de fermentation, autres produits de métabolisme — il en résulte une élévation de la concentration en ions hydrogène. La conséquence nécessaire est une détérioration permanente du milieu, puisque, du fait de la concentration accrue en ions hydrogène, le domaine optima de pH pour les conditions de croissance disparaît. Les conditions de croissance sont améliorées par la décarboxylation de l'acide malique. Des ions hydrogène seront constamment utilisés lors de la décarboxylation et seront, pour ainsi dire, rendus non nuisibles. La reproduction de la figure 6 montre un résultat d'expérience typique. Dans un milieu synthétique on cultive une couche de **Lactobacillus casei.** Le pH varie de 3.3 à 5.5. Dans un cas on ajoute de l'acide malique et, dans l'expérience parallèle, on omet l'addition d'acide malique. La croissance est suivie par la détermination du poids de substance bactérienne et de la quantité de sucre utilisé. Pour un pH de plus de 4,5 environ, le sucre est totalement utilisé

et la masse de bactéries est approximativement la même en absence ou en présence d'acide malique. Pour un pH de moins de 4 il y a accélération de la croissance des bactéries et en même temps, naturellement, une plus forte diminution de la concentration en sucre. En l'absence de l'acide malique il s'ensuit une croissance moindre des bactéries et donc une plus petite masse de sucre utilisée. Des expériences semblables avec différentes sortes de bactéries conduisent à des résultats identiques. La décarboxylation de l'acide malique apparaît ainsi comme une réaction appropriée. Dans des conditions défavorables, la diminution de la concentration en ions hydrogène accélère la croissance des bactéries. La possession d'un enzyme actif, décarboxylant l'acide malique, peut être un avantage sélectif pour les bactéries qui peuvent croître en milieu acide.

La décarboxylation bactérienne de l'acide malique dans le vin n'est pas seulement un problème théorique, mais un mécanisme à signification pratique. La diminution de la teneur en acide est un phénomène important qui a conduit aussi, à l'origine, à la découverte de la fermentation malolactique. Les produits du métabolisme des bactéries, qui résultent de la fermentation de l'hydrate de carbone, pour l'essentiel, ont peu d'importance. Ce sont, de plus, des matières qui, par ailleurs, se trouvent dans le vin, telles que l'acide lactique, l'alcool éthylique, le gaz carbonique et, le cas échéant, une petite quantité d'acide acétique. Seulement si une grande quantité d'hydrate de carbone est fermentée par les bactéries lactiques cela aboutit à une piqûre lactique.

Dans la pratique, on discute souvent pour savoir si le vin est transformé dans son goût par la fermentation malolactique, outre la diminution d'acidité. WINDISCH a déjà discuté de cette question en 1906, mais il a réfuté la transformation du goût puisque l'acide malique et l'acide lactique sont à peine discernables au goût.

Cependant, il est connu que les bactéries lactiques peuvent produire des éléments actifs sur le goût. On pense seulement à l'arôme du beurre, qui repose essentiellement sur la production de diacétyle. Cette substance a un goût extrêmement prononcé, elle est formée par des bactéries lactiques à partir d'acide pyruvique sur α -acétolactate. Les bactéries lactiques produisent en premier lieu de l'acétoïne qui peut être oxydée en diacétyle ou être réduite en butanediol-2,3. Normalement, les bactéries lactiques produisent bien moins de diacétyle que d'acétoïne. Déjà CHARPENTIÉ en 1954 a montré que l'acétoïne et le butanediol-2,3 peuvent être formés par les bactéries lactiques à partir de l'acide citrique. FORNACHON a indiqué plus tard que la quantité d'acétoïne qui est formé dans le vin est proportionnelle à l'acide pyruvique. La situation est pourtant encore plus compliquée car, non seulement les bactéries lactiques mais aussi les levures peuvent former une quantité d'acétoïne appréciable, si la fermentation a lieu en présence d'air. Il n'y a aucun doute,

des bactéries lactiques isolées à partir du vin, peuvent produire de l'acétoïne et du diacétyle. La formation de ces corps est cependant extrêmement variable, elle ne dépend pas seulement de la souche de bactéries mais aussi du milieu dans lequel ces bactéries sont cultivées Des expériences simples le montrent : elles sont reproduites sur le tableau 8. On observe aussi (Tabl. 9) dans des cultures mixtes avec des levures la formation d'acétoïne et de diacétyle, et par là donc, des différences considérables entre les souches bactériennes sont constatées.

TABLEAU 8

La production d'acétoïne dans différents milieux par des bactéries lactiques du vin

SOUCHE	Acetoine (+ diacetyl) dans le milieu de culture (mg / l)		
	moût		JUS de tomate
	Sylvaner	Morio-Muskat	
Lactobacillus 2L	35,0	8,5	40,0
Leuconostoc 12a	0,3	23,0	6,9
Leuconostoc 16a	0,3	23,0	6,3
Leuconostoc 45b	0,3	6,9	3,7

TABLEAU 9

La production de l'acétoïne (+ diacétyle) par des bactéries lactiques La teneur des vins en acétoïne et la fermentation malolactique

Souche de bactérie (cultivée avec une levure de vin)	Production de l'acetoine (+ diacetyl)
-	1,5
Lactobacillus 2L	39,6
Leuconostoc 12a	2,5
Leuconostoc 16a	4,0
Leuconostoc 45b	15,5

Du fait de la grande signification de cette question on effectue sur un grand nombre de vins la détermination de leur teneur en acide lactique et en acide malique et, même, en diacétyle et acétoïne. Je ne veux pas entrer plus dans les détails ici sur les résultats de cette recherche. Le tableau 10 le montre clairement. 101 vins, pour lesquels la fermentation malolactique était effectuée contenaient en moyenne une teneur de 9,3 mg d'acétoïne et diacétyle. Les valeurs extrêmes étaient de 0,9 et

34,9 mg. Par contre, 41 vins pour lesquels la fermentation malolactique n'avaient pas eu lieu, contenaient une teneur en acétoïne de 4,3 mg. Les valeurs extrêmes allaient, dans ce cas de 0,7 à 15,8 mg. De ces résultats on peut déduire : que l'acétoïne ainsi que le diacétyle, dont la quantité n'était pas déterminée, peut aussi se trouver dans les vins dans lesquels aucune fermentation malolactique n'a eu lieu. Les vins où la fermentation malolactique a eu lieu ont, en moyenne, une haute teneur significative de ces composés. En outre, on a observé que des vins ayant une teneur supérieure à 20 mg d'acétoïne et de diacétyle par litre présentaient un goût de piqûre lactique plus ou moins prononcée.

TABLEAU 10

La teneur des vins en acétoïne et la fermentation malolactique

fermentation malolactique	+	—
no. des vins	101	41
moyenne teneur en acetoine (+ diacetyl) mg/l	9,3	4,3
valeurs extrêmes d'acetoine mg/l	0,9 - 34,9	0,7 - 15,8

En fonction de ces résultats on ne peut en aucun cas exclure l'idée qu'un vin subit une transformation du goût par la fermentation malolactique. Mais en général, on trouve des vins qui ont achevé une complète diminution de l'acide malique et dans lesquels ne se trouve qu'une quantité extrêmement faible d'acétoïne et de diacétyle.

Entre la quantité de diacétyle et d'acétoïne, il n'existe d'ailleurs aucune relation établie puisque le diacétyle peut être facilement réduit en acétoïne ou en butanediol-2,3. Les observations d'un changement possible de goût ne donnent aucune indication sur la valeur de ce changement. Il semble que dans les vins rouges il y ait une élévation de la teneur en acétoïne et en diacétyle.

Pour les vins blancs la fermentation malolactique semble être laissée de côté par les cavistes. Cet abandon est probablement fondé sur la possibilité indiquée ici d'un changement de goût.

Pour établir dans quelles conditions les meilleurs vins allemands subissent la fermentation malolactique un très grand nombre de vins, qui avaient été présentés au concours fédéral, ont eu leur teneur en acide lactique et malique déterminée par la méthode chromatographique. On

utilisa à cette occasion la méthode chromatographique en couche mince qui est meilleure et plus rapide que la méthode chromatographique sur papier. L'avantage de la chromatographie en couche mince est que la durée d'exécution est très courte et, de plus, seulement 2 µl de substance doivent être utilisés. On a analysé des vins des onze régions viticoles allemandes.

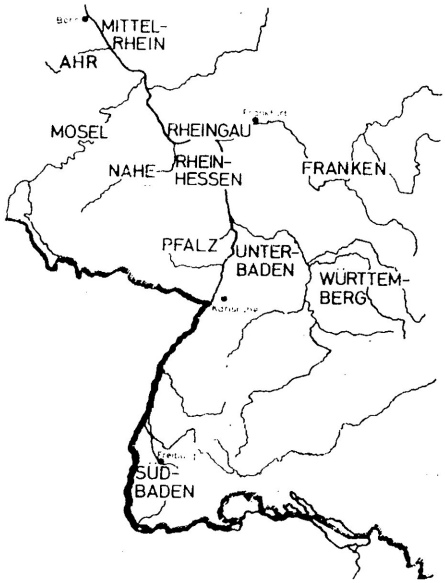


Fig. 7. — Les régions viticoles en Allemagne

Je voudrais cependant insister sur le fait que ces vins ne sont aucunement représentatifs d'une moyenne générale, car la participation à ce concours dépend du hasard et de l'activité variable à cet égard des différentes régions viticoles.

Sur la base de la teneur en acide malique et lactique les vins ont été partagés en trois groupes :

1°) les vins sans fermentation malolactique, avec seulement une faible teneur en acide lactique;

2°) les vins avec une fermentation malolactique incomplète, qui montrent clairement une teneur en acide lactique plus élevée avec une teneur en acide malique moindre;

3ï) les vins avec une fermentation malolactique complète, qui ne contiennent pas d'acide malique.

Une fermentation malolactique incomplète peut, lorsque des vins prêts à la vente sont analysés, être la conséquence naturelle d'un coupage de deux vins différents.

Comme le montre le tableau 11, 1.217 vins qui provenaient surtout des années 1964 et 1965 avaient été analysés. Dans 43 % de ces vins une fermentation malolactique partielle ou complète était observable. La fermentation malolactique a lieu, dans la majeure partie des cas, dans le vin rouge, et seulement dans 36 % des cas dans le vin blanc. La petite quantité de vin rosé occupe une position moyenne. Une fermentation malolactique complète était présente seulement dans 10 % des vins blancs mais dans les trois-quarts des vins rouges.

TABLEAU 11

La fréquence de la fermentation malolactique dans des vins allemands de qualité supérieure

	total	vins blancs	vins rouges	vins rosés
No des vins	1217	1034	145	38
% avec la fermentation malolactique	43,1	36,5	87,5	53
% avec une fermentation de l'acide malique total complète		10,7	77,2	21,1

TABLEAU 12

La fréquence de la fermentation malolactique dans des vins blancs des régions viticoles en Allemagne

Région viticole	No de vins	% avec fermentation malolactique	% avec une fermentation l'acide malique total complète
Tous les régions	1034	36,5	10,7
Südbaden	231	47,6	15,2
Württemberg	109	44,9	29,4
Unterbaden	74	41,9	18,9
Franken	69	40,6	11,6
Rheinhessen	186	34,3	5,9
Nahe	21	33,3	-
Pfalz	172	28,5	4,7
Rheingau	71	26,7	2,8
Mosel	82	21,9	-
Mittelrhein	19	15,8	5,2

Le tableau 12 montre la fréquence de la présence de la fermentation malolactique dans les vins blancs des régions viticoles allemandes. En moyenne, la fermentation malolactique a lieu comme déjà mentionné

dans 36 % des vins blancs. Sa présence se retrouve dans les quatre régions viticoles du sud, Südbaden, Württemberg, Unterbaden et Franken avec une fréquence particulière (fig. 7). Dans les autres régions la fermentation malolactique est moins fréquente dans la moyenne des vins et une fermentation malolactique complète est très rarement observée.

Il n'est pas possible de donner une explication certaine sur les différences régionales de la fréquence des fermentations malolactiques. L'essentiel peut être dans la différence de technique de cave, dans l'époque des vendanges et la nature du cépage. Il semble que dans les régions viticoles allemandes du Sud, avec, en général, une faible teneur en acide dans le moût de raisin, la fermentation malolactique soit plus fréquente.

TABLEAU 13

Proportions des vins qui n'ont pas gagné un prix et la fermentation malolactique

Type	No. de vins	% de vins sans prix		
		sans fermentation malolactique	avec fermentation malolactique	avec fermentation malolactique complète
Vins blancs	1034	10	15,3	23,4
Vins rouges	145	-	5,5	5,3

Il est à retenir, avec un intérêt particulier, de quelle manière la présence d'une fermentation malolactique produit tout son effet sur la valeur d'un vin. Au concours fédéral du vin, seuls sont admis les vins qui ont déjà reçu, auparavant, une distinction régionale. Il s'ensuit donc que la plupart des vins reçoivent une distinction. Le tableau 13 montre la proportion des vins qui n'ont reçu aucune distinction au concours fédéral. 10 % de vins blancs sans fermentation malolactique ne reçurent aucune distinction mais, par contre, presque 1/4 des vins à fermentation malolactique complète ne fut pas distingué.

Il est certain qu'on doit se préserver d'en tirer de trop rapides conclusions, car sur la qualité du moût il n'y a aucune indication; en outre, il est connu, qu'il n'existe aucune frontière déterminée entre la fermentation malolactique et les maladies du vin. On pourra cependant dire que la présence d'une fermentation malolactique, dans le vin blanc allemand ne conduit pas obligatoirement à une augmentation de la qualité. Ces résultats peuvent peut-être expliquer l'aversion contre la fermentation malolactique qu'ont beaucoup de fabricants allemands de vin blanc. Au contraire, il semble que, pour la fabrication du vin rouge, la fermentation malolactique soit très importante. Je pense que cela est également valable pour le vin rouge français de qualité.

Sans aucun doute, la fermentation malolactique est un procédé microbiologique et biochimique très intéressant et il n'est actuellement pas encore complètement connu. Avec les transformations continuelles de la technique de fabrication du vin, ainsi qu'avec les nombreuses et différentes méthodes de chaque pays, on ne peut pas encore aujourd'hui prédire si on recherchera systématiquement l'introduction de ce phénomène à l'aide de cultures pures de bactéries ou, au contraire, une inhibition plus importante de la diminution microbiologique de l'acidité.