SUR L'ACTION ANTIBACTERIENNE DE L'ANHYDRIDE SULFUREUX SOUS FORME LIBRE ET SOUS FORME COMBINEE

S. LAFON-LAFOURCADE et E. PEYNAUD
Institut National de la Recherche Agronomique
Institut d'Œnologie de Bordeaux
351, cours de la Libération, 33405 Talence (France)

On sait que l'anhydride sulfureux, utilisé au cours de la vinification et pour la conservation des vins, forme des combinaisons d'addition avec différents constituants de ces milieux, de sorte qu'il s'y trouve sous deux états en équilibre : la forme dite « libre » et la forme dite « combinée ». L'étude de ces combinaisons a fait l'objet de nombreux travaux récents (RIBEREAU-GAYON et PEYNAUD, 1960, 1961 ; KIELHOFER, 1963 ; BLOUIN, 1965 ; SAPIS et PEYNAUD, 1971).

En ce qui concerne son action inhibitrice sur la microflore du vin, il a été établi que l'effet fongicide de l'anhydride sulfureux relevait presque uniquement de la seule fraction « libre » de l'antiseptique, la partie « combinée » demeurant quasi inactive sur les levures. De la même manière la plupart des auteurs n'attribuait à l'anhydride sulfureux « combiné » qu'un effet antibactérien négligeable (MALAN et **al.**, 1968 ; RANKINE et BRIDSON, 1971).

FORNACHON (1963) a montré qu'au cours de leur développement en milieu sucré en présence d'acide aldéhyde-sulfureux certaines bactéries, principalement les hétérofermentaires, attaquent la partie aldéhydique de la combinaison d'addition libérant ainsi des taux suffisants d'anhydride sulfureux libre pour interdire une croissance bactérienne ultérieure. L'auteur concluait que, loin d'être biologiquement inerte comme on le croyait jusqu'alors, l'anhydride sulfureux combiné à l'acétaldéhyde pouvait, à forte concentration, inhiber les bactéries des vins et s'opposer à leur activité malolactique.

De notre côté, nous avons observé (LAFON-LAFOURCADE, 1970, 1973) que même sous ses formes combinées, l'anhydride sulfureux constitue un facteur limitant de l'activité malolactique des cellules bactériennes non proliférantes.

Dans le présent travail, nous étudions l'action inhibitrice vis-à-vis des bactéries lactiques isolées de vins, de l'anhydride sulfureux sous diverses formes : libre, combiné à l'acide pyruvique et combiné à l'acétaldéhyde. L'acide aldéhyde-sulfureux présente une grande stabilité aux pH étudiés (constante chimique $0{,}0024\text{-}10^{-3}$) ; l'acide pyruvique-sulfureux a une stabilité moins grande (constante $0{,}3\text{-}10^{-3}$). Nous essayons de préciser son action dans différentes conditions : son effet immédiat sur des populations de diverses bactéries en milieu simple, son influence sur la croissance bactérienne liée d'une part à la fermentation lactique du sucre, d'autre part à la fermentation malolactique, et sur la dégradation de l'acide malique obtenue par une masse importante de cellules non proliférantes.

TECHNIQUES EXPERIMENTALES

Nous décrivons dans ce paragraphe les conditions générales de notre expérimentation. Nous préciserons dans une courte rubrique « Protocole d'essai » les conditions exactes dans lesquelles ont été effectués les essais considérés, en tête de chaque partie relative aux résultats obtenus.

Souches bactériennes utilisées :

Coque hétérofermentaire : **Leuconostoc gracile** Cf 34

Coque homofermentaire : **Pediococcus cerevisiae** Ja 2

Bacille hétérofermentaire : **Lactobacillus hilgardii** BC 2

Bacille homofermentaire : **Streptobacterium** E 1

Concentrations en anhydride sulfureux : L'action de l'anhydride sulfureux sous forme libre, sous forme d'acide pyruvique-sulfureux et d'acide aldéhyde-sulfureux a été étudiée pour sept doses différentes : 0 - 5 - 10 - 20 - 30 - 50 - 100 mg par litre.

Milieux utilisés :

— Solution phosphatée (1) : 2 g de phosphate dipotassique par litre ;

— Milieu de Carr modifié (2). Composition par litre : caséine hydrolysée, 5 g ; extrait de levure Difco, 4 g ; glucose, 40 g ; ClK, 0,425 g ; Cl_2 Ca, 0,125 g ; SO_4 Mg, 0,125 g ; SO_4 Mn, 0,0025 g ; acide DL malique, 5 g ; pH, 4,8.

— Moût enrichi (3) : moût de raisins blancs à 8° Baumé, dilué deux fois et additionné de 5 g d'extrait de levure par litre ; pH 4,8.

— Milieu simple (4). Composition par litre : $PO_4 H_2 K$, 2 g ; $SO_4 Mg$, 0,125 g ; $SO_4 Mn$, 0,025 g ; acide malique, 50 à 70 méq ; pH ajusté à 4.

— Vin (5) : vin rouge conservé par pasteurisation et dépourvu d'anhydride sulfureux, titrant 10°8 d'alcool et 30 méq par litre d'acide malique ; pH 3,3. Le degré alcoolique est amené à 10° par dilution, le pH à 3,5 par addition de soude et la concentration en acide malique à 50 méq par litre. Le vin est stérilisé par chauffage à 50 °C.

Préparation des levains. — Les bactéries sont précultivées à 30 °C, dans le moût enrichi (3). Après 4 à 5 jours d'incubation, on centrifuge le milieu de culture à 9000 tours par minute à 0 °C. Le dépôt bactérien est lavé à l'eau distillée stérile, centrifugé, pesé et remis en suspension dans de l'eau distillée stérile à concentration convenable.

Conditions expérimentales :

— **Essais en tubes :** Le milieu est réparti à raison de 10 ml dans des tubes stériles bouchés d'ouate. On stérilise 5 mn à 110 °C. Après refroidissement on effectue les additions des diverses formes d'anhydride sulfureux, puis les ensemencements bactériens. On laisse incuber à 30 °C.

— **Essais en bouteilles :** Le milieu est réparti dans des bouteilles de 600 ml avec bouchage système à pression, en ne laissant subsister qu'une chambre d'air de faible volume. On stérilise 15 mn à 115 °C. Après refroidissement on effectue les additions des diverses formes d'anhydride sulfureux, puis les ensemencements bactériens. On laisse incuber à 22 °C.

Déterminations effectuées :

— Numération des bactéries vivantes sur boîte de Petri, dans le moût enrichi (3), gélosé à 20 p. 100, après 8 jours d'incubation à 25 °C.

— Dosage de l'acidité totale par la soude N/20, en présence de phénolsulfonephtaléine.

— Dosage de l'acide L-malique en milieu synthétique ou même dans le vin non sucré ; un dosage acidimétrique avant et après l'addition de la masse bactérienne donne par différence l'acide malique disparu.

— Dosage de l'acétaldéhyde par la méthode de JAULMES et ESPEZEL modifiée (RIBEREAU-GAYON et **al.** 1972).

— Dosage de l'anhydride sulfureux libre et total par la méthode RIPPER.

RESULTATS ET DISCUSSION

I. ACTION BACTERICIDE IMMEDIATE DE L'ANHYDRIDE SULFUREUX.

Protocole d'essai : Ces essais ont été menés en tubes à 22 °C pour les quatre souches dans le milieu phosphaté (1), porté à pH 3,0 — 3,2 — 3,4. L'ensemencement est de l'ordre de 10^6 cellules par ml. Les numérations de bactéries vivantes sont effectuées **immédiatement** après les additions d'anhydride sulfureux et les ensemencements.

TABLEAU I

Action bactéricide directe de l'anhydride sulfureux sur une suspension de bactéries lactiques à différents pH

Les valeurs sont des pourcentages de cellules restées vivantes par rapport à la population du milieu témoin

		Anhydride sulfureux libre (mg de SO_2)			Acide pyruvique-sulfureux (mg de SO_2)			Acide aldéhyde-sulfureux (mg de SO_2)		
	pH	5	30	100	5	30	100	5	30	100
Leuconostoc gracile	3,0	0	0	0	68	33	14	67	63	55
	3,2	0	0	0	87	56	42	89	79	67
	3,4	0	0	0	90	70	62	95	87	68
Pediococcus cerevisiae	3,0	7	0	0	25	0	0	100	0	0
	3,2	52	0	0	85	0	0	76	48	1
	3,4	60	15	0	85	75	25	100	75	50
Lactobacillus hilgardii	3,0	48	5	0	86	13	6	50	35	5
	3,2	49	6	1	88	107	79	74	37	32
	3,4	70	8	7	96	75	54	84	68	35
Streptobacterium	3,0	70	10	1	83	66	53	98	96	89
	3,2	60	23	1	96	88	70	88	76	85
	3,4	66	33	1	86	82	60	96	85	83

Résultats : Le tableau I donne les pourcentages de bactéries vivantes par rapport au témoin sans addition d'anhydride sulfureux, en fonction du pH du milieu, de la souche bactérienne, de la forme libre ou combinée de l'anhydride sulfureux pour trois concentrations

Comme on pouvait s'y attendre, c'est sous forme libre que l'anhydride sulfureux développe la plus forte activité antibactérienne. Celle-ci se trouve considérablement renforcée lorsque le pH est plus bas ; une différence de 0,2 unité pH exerce une action très nette.

Les quatre souches bactériennes sont toutes très sensibles à l'anhydride sulfureux libre, bien qu'à des degrés variables ; les coques paraissent moins résistants que les bacilles. Les populations bactériennes sont fortement diminuées par l'addition de 5 mg d'anhydride sulfureux libre par litre et sont pratiquement détruites, sur le champ, par une dose de 100 mg ; seules survivent en nombre considérablement réduit quelques cellules de **Streptobacterium** (0,6 p. 100 par rapport au témoin).

Si l'on admet que toute cellule incapable de former une colonie en milieu gélosé est un organisme mort, l'anhydride sulfureux libre apparaît comme un bactéricide puissant, dont l'action est instantanée, même à concentration faible.

L'anhydride sulfureux combiné exerce également un pouvoir bactéricide, mais à un degré bien inférieur. A la dose de 5 mg par litre, l'effet de l'acide aldéhyde-sulfureux est généralement peu important, cependant il diminue de 50 p. 100 la population de **Lactobacillus hilgardii** à pH 3. L'action varie suivant la souche, elle augmente en fonction de la concentration en produit et de l'abaissement du pH. En présence de 100 mg par litre sous forme d'acide aldéhyde-sulfureux, le nombre de cellules vivantes est réduit de 38 à 45 p. 100 pour **Leuconostoc gracile,** de 25 à 100 p. 100 pour **Pediococcus cerevisiae,** de 65 à 95 p. 100 pour **Lactobacillus hilgardii.** La souche de **Streptobacterium** est peu affectée.

L'effet inhibiteur de l'acide pyruvique-sulfureux est assez comparable à celui de l'acide aldéhyde-sulfureux ; à concentrations équivalentes il est souvent un peu plus fort.

Ces essais montrent de façon formelle que si l'anhydride sulfureux sous sa forme libre possède, même à faible dose, un pouvoir bactéricide considérable, ses combinaisons à l'acétaldéhyde et à l'acide pyruvique sont elles-mêmes actives, quoique à un degré moindre. Bien que cela soit difficile à évaluer d'après ces essais, on peut dire que les formes combinées sont cinq à dix fois moins actives que la forme libre. L'activité bactéricide apparaît dès que les combinaisons de l'anhydride sulfureux sont mises en contact avec les cellules bactériennes, avant même que puisse

intervenir un quelconque métabolisme bactérien qui agirait sur l'acide pyruvique ou l'acétaldéhyde. C'est donc une première preuve précise d'un effet bactéricide direct de l'anhydride sulfureux combiné.

II. ACTION DE L'ANHYDRIDE SULFUREUX SUR LA FERMENTATION LACTIQUE DES SUCRES.

Protocole d'essai : Les essais ont été menés en bouteilles, à 22 °C, avec les quatre souches bactériennes dans le milieu de Carr modifié (2) et le moût enrichi (3). Les ensemencements sont de l'ordre de 10^5 cellules par ml. La fermentation lactique est contrôlée, à intervalles réguliers, par dosage de l'acidité fixe dans les milieux et par numération des cellules vivantes.

Résultats : On constate que l'addition d'anhydride sulfureux sous ses trois formes modifie la croissance et la vitesse de la fermentation lactique du sucre.

— 1°) **Action de l'anhydride sulfureux sur la fermentation lactique :**

Cette action se manifeste d'abord par un retard de l'acidification par rapport au témoin dépourvu d'antiseptique, retard d'autant plus grand que la concentration en anhydride sulfureux est plus élevée. Si la dose de produit est plus forte, l'inhibition est plus poussée, et la fermentation cesse avant la transformation complète de la totalité du sucre ; certaines concentrations peuvent interdire toute attaque du sucre.

Nous définissons par « seuil de sensibilité » la dose d'antiseptique à partir de laquelle on peut observer un retard dans l'acidification et par «seuil d'inhibition » la concentration à partir de laquelle aucune attaque du sucre n'est décelable par dosage acidimétrique. Le tableau II donne ces seuils en fonction de la souche bactérienne, du milieu et de la forme sous laquelle a été introduit l'anhydride sulfureux.

Il apparaît nettement que la fermentation lactique est inhibée par l'anhydride sulfureux sous les trois formes. Cependant, on doit faire une remarque : l'anhydride sulfureux ajouté libre dans les milieux nutritifs se combine partiellement à certains constituants du jus de raisin notamment, plus complexe que le milieu de Carr, ce qui pourrait expliquer l'efficacité plus grande de l'anhydride sulfureux libre dans ce dernier milieu.

TABLEAU II

Seuils de sensibilité et seuils d'inhibition des bactéries lactiques à l'anhydride sulfureux libre et combiné

Concentrations exprimées en mg par litre

		Anhydride sulfureux libre		Acide aldéhyde-sulfureux		Acide pyruvique-sulfureux	
		Seuil de sensibilité	Seuil d'inhibition	Seuil de sensibilité	Seuil d'inhibition	Seuil de sensibilité	Seuil d'inhibition
Leuconostoc gracile	Moût enrichi	5	30	5	100	5	75
	Milieu de Carr	5	30	5	20	5	30
P. cerevisiae	Moût enrichi	20	75	30	> 100	15	50
	Milieu de Carr	5	75	5	> 100	5	30
L. hilgardii	Moût enrichi	10	> 100	30	> 100	20	> 100
	Milieu de Carr	5	50	20	100	10	50
Streptobacterium	Moût enrichi	20	75	50	> 100	50	100
	Milieu de Carr	5	30	50	> 100	5	75

Les seuils de sensibilité s'observent à des taux très faibles d'antiseptique : ainsi, ce seuil est de 5 mg par litre pour les trois formes d'anhydride sulfureux en ce qui concerne **Leuconostoc gracile.** Mais bien entendu, c'est l'anhydride sulfureux libre qui exerce le plus fort pouvoir antifermentaire, comme l'indiquent les seuils d'inhibition. La fermentation lactique est interdite avec 30 à 100 mg d'anhydride sulfureux libre, selon la souche (exception faite pour **Lactobacillus hilgardii,** plus résistant).

Les seuils d'inhibition se situent à des taux plus élevés lorsque l'anhydride sulfureux est introduit sous forme de combinaison avec l'acide pyruvique ; ils n'excèdent 100 mg par litre que dans le seul cas de **Lactobacillus hilgardii.**

L'acide aldéhyde-sulfureux est bien moins efficace, les seuils d'inhibition se situent souvent à des teneurs en antiseptique supérieures à 100 mg par litre. Notons, cependant, que 100 mg suffisent pour interdire la fermentation par **Leuconostoc gracile** dans le moût enrichi et 20 mg dans le milieu de Carr.

Quel que soit le mode d'action de l'antiseptique (action directe ou après libération de l'anhydride sulfureux par les bactéries métabolisant l'acide pyruvique ou l'acétaldéhyde), ces essais confirment les résultats de FORNACHON (1963) : les formes combinées de l'anhydride sulfureux exercent un effet inhibiteur sur la fermentation bactérienne des sucres, atténué par rapport à celui de l'anhydride sulfureux libre, mais indiscutable.

— 2°) **Action de l'anhydride sulfureux sur la croissance bactérienne en milieu sucré :**

L'anhydride sulfureux intervient directement sur la croissance bactérienne, de manière différente selon qu'il se trouve sous la forme libre ou combinée.

Nous prendrons pour exemple le développement de **Leuconostoc gracile** dans le moût enrichi à pH 4,8. La figure 1 montre les courbes de croissance de cette bactérie dans le milieu témoin et en présence de 20 mg d'anhydride sulfureux par litre ajouté sous diverses formes. A cette concentration au septième jour d'incubation, la formation d'acide lactique par rapport au témoin est inférieure de 69, 37 et 32 p. 100, selon que l'antiseptique se trouve sous forme libre ou qu'il est combiné à l'acide pyruvique ou à l'acétaldéhyde.

Dans le milieu témoin, la croissance prend aussitôt après l'ensemencement une allure exponentielle. La population maximale est atteinte dès le troisième jour ; la phase stationnaire se maintient cinq à six jours. Au dixième jour, 90 p. 100 du sucre sont transformés et la croissance entre dans la phase de régression.

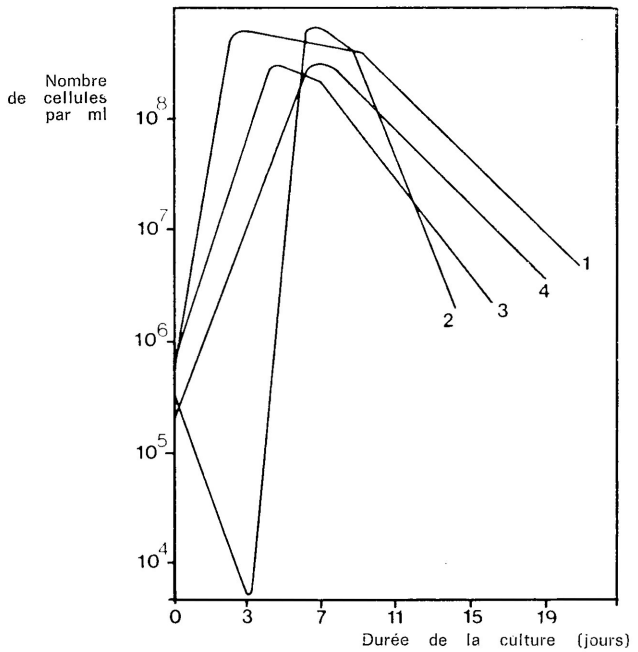


Fig. 1. — Action de l'anhydride sulfureux libre et combiné à l'acétaldéhyde et l'acide pyruvique sur la croissance de **Leuconostoc gracile Cf 34** dans un milieu nutritif sucré à pH 4,8

(1) Croissance bactérienne témoin.
(2) Croissance bactérienne en présence de 20 mg par litre d'anhydride sulfureux libre.
(3) Croissance bactérienne en présence de 20 mg par litre d'anhydride sulfureux combiné à l'acétaldéhyde.
(4) Croissance bactérienne en présence de 20 mg par litre d'anhydride sulfureux combine à l'acide pyruvique.

En présence de 20 mg d'anhydride sulfureux libre, la courbe de croissance (courbe 2) affecte une forme caractérisée par un point de rebroussement. La population bactérienne peu affectée sur le champ par l'introduction d'antiseptique, diminue ensuite progressivement pendant les trois premiers jours et passe de 3×10^5 à 4×10^3. Puis, à partir des cellules survivantes, se développe une croissance exponentielle qui en quatre jours amène la population totale sensiblement au même niveau que dans le témoin. Si la concentration en anhydride sulfureux libre est plus forte, 30 mg par exemple, on assiste à une régression continue de la population d'ensemencement jusqu'à son extinction complète après sept jours.

En présence de 20 mg d'anhydride sulfureux par litre combiné à l'acétaldéhyde ou à l'acide pyruvique (courbes 3 et 4) les courbes de

croissance présentent la même forme que celle de la croissance témoin, mais les droites qui expriment graphiquement la phase exponentielle ont une pente plus faible.

En présence de doses plus élevées d'acide aldéhyde-sulfureux, 50 ou 75 mg par litre, la population bactérienne croît jusqu'à un certain niveau : elle passe de 10^5 à 10^7 pendant les six premiers jours, puis se maintient stationnaire pendant la même durée. A ce moment s'amorce l'acidification du milieu simultanément à une augmentation du taux de croissance. En présence de 100 mg par litre une phase de régression intervient rapidement, et il n'y a pas attaque du sucre.

En milieu nutritif sucré à pH 4,8, l'anhydride sulfureux libre détruit une part plus ou moins importante des cellules de l'ensemencement et dans le cas où survient un développement, la population paraît se reconstituer à partir des cellules survivantes avec un taux de croissance élevé. Lorsque l'antiseptique se trouve sous forme combinée, son action se manifeste surtout par une diminution du taux de croissance, sans effet bactéricide évident. Même en présence de fortes doses d'acide aldéhyde-sulfureux, on observe toujours une croissance bactérienne, mais le métabolisme bactérien aux dépens du glucose est inhibé.

III. ACTION DE L'ANHYDRIDE SULFUREUX SUR LA CROISSANCE BACTERIENNE LIEE A LA FERMENTATION MALOLACTIQUE.

Protocole d'essai : L'essai a été mené en bouteilles, à 22 °C, avec quatre souches différentes, sur un vin rouge (pH 3,5, degré 10°). Les ensemencements sont de l'ordre de 10^5 cellules par ml. La fermentation malolactique est contrôlée à intervalles réguliers par dosage de l'acidité fixe et la croissance bactérienne par numération des cellules vivantes.

Résultats : Pour simplifier l'exposé, ici encore, nous présentons les résultats en nous référant à l'exemple de **Leuconostoc gracile.**

La figure 2 montre les courbes de croissance de **Leuconostoc gracile** en présence de 0, 10 et 30 mg d'anhydride sulfureux sous diverses formes.

Dans le vin témoin dépourvu d'antiseptique, après un premier développement très lent qui suit une courte phase de latence, le taux de croissance augmente brusquement et on observe une phase exponentielle

au terme de laquelle la population atteint 4,8 x 10^6 cellules par ml. Entre le 22ème et le 29ème jour, pendant le temps où la population demeure à son niveau maximum, 30 p. 100 de l'acide malique sont fermentés.

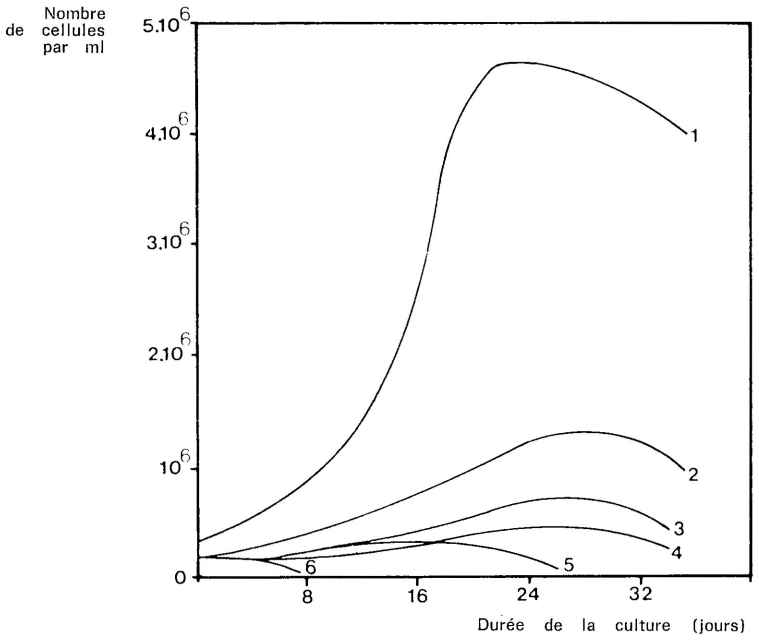


Fig. 2. — Action de l'anhydride sulfureux libre et combiné à l'acétaldéhyde et à l'acide pyruvique sur la croissance **de Leuconostoc gracile Cf 34** dans un vin.

(1) Croissance bactérienne témoin.
(2) Croissance bactérienne en présence de 10 mg par litre d'anhydride sulfureux combiné à l'acétaldéhyde.
(3) Croissance bactérienne en présence de 10 mg par litre d'anhydride sulfureux combiné à l'acide pyruvique.
(4) Croissance bactérienne en présence de 10 mg par litre d'anhydride sulfureux libre.
(5) Croissance bactérienne en présence de 30 mg par litre d'anhydride sulfureux combiné à l'acétaldéhyde.
(6) Croissance bactérienne en présence de 30 mg par litre d'anhydride sulfureux combiné à l'acide pyruvique.

En présence de 10 mg d'anhydride sulfureux libre par litre à pH 3,5, le nombre de cellules vivantes est instantanément diminué à 50 p. 100. Après 8 jours, il ne reste que 25 p. 100 de bactéries survivantes. A partir de celles-ci s'amorce un développement très lent et limité qui porte la population à 6 x 10^5 cellules par ml. L'addition de 30 mg d'anhydride sulfureux libre réduit aussitôt de 75 p. 100 la population initiale et la détruit presque totalement en 8 jours (0,004 p. 100 de cellules survivantes). Dans les deux cas précités, l'acide malique n'est pas touché.

L'action de l'anhydride sulfureux combiné à l'acide pyruvique se rapproche de celle de l'anhydride sulfureux libre, cependant, l'effet bactéricide initial ne se poursuit pas les jours suivants, du moins en présence de 10 mg par litre de produit. On observe au contraire un faible et pro-

gressif développement du 8ème au 29ème jour qui atteint son maximum à 8 x 10^5 cellules par ml. A la concentration de 30 mg par litre le nombre de cellules ne cesse de décroître jusqu'au 8ème jour. Aucune dégradation de l'acide malique n'est décelable.

L'acide aldéhyde-sulfureux à la dose de 10 mg par litre permet un développement bactérien légèrement supérieur, puisque la population maximum atteint 15 x 10^5 cellules par ml. Avec 30 mg par litre, après la chute immédiate du nombre de bactéries vivantes, la population se maintient stationnaire pendant une vingtaine de jours et décroît brusquement ensuite. Aucune attaque de l'acide malique n'est observée dans ces deux dernières conditions.

L'action antibactérienne de l'anhydride sulfureux dans le vin présente donc sensiblement les mêmes caractères qu'en milieu nutritif sucré. Les trois formes de l'anhydride sulfureux sont inhibitrices à des degrés divers. L'anhydride sulfureux libre agit comme bactéricide, les combinaisons de l'antiseptique affectent seulement le taux de croissance. La fermentation malolactique est toujours inhibée. Il est difficile d'établir clairement si cette inhibition provient d'une insuffisance de population ou si elle s'exerce sur les processus enzymatiques de la fermentation malolactique.

IV. ACTION DE L'ANHYDRIDE SULFUREUX SUR L'ACTIVITE MALOLACTIQUE DES BACTERIES LACTIQUES NON PROLIFERANTES.

Protocole d'essai : L'essai a été conduit en tubes, à 30 °C, avec quatre souches bactériennes dans le milieu simple (4) et le vin (5). Les ensemencements sont effectués à raison de 0,5, 1 et 5 mg de cellules fraîches par litre. La dégradation malolactique est contrôlée par dosage de l'acidité totale après 5, 24 et 48 heures.

Résultats : Le tableau III donne pour deux bactéries les pourcentages d'acide malique transformé par rapport à la teneur initiale, après 24 heures d'incubation à 30 °C, par 1 g de cellules fraîches par litre en milieu synthétique et dans le vin en fonction de la concentration en anhydride sulfureux libre et combiné.

Nous commenterons les principales observations.

Chaque bactérie possède une capacité propre à dégrader l'acide malique, c'est-à-dire dispose d'un potentiel « enzyme malique » spécifi-

TABLEAU III

Action de l'anhydride sulfureux sur la fermentation malolactique des bactéries lactiques non proliférantes

Pourcentages d'acide L-malique dégradé en 24 h à 30 °C par 1 g de cellules fraîches par litre de milieu simple ou de vin

Bactéries utilisées		Leuconostoc gracile					Lactobacillus hilgardii				
mg de SO_2 ajouté		0	10	30	50	100	0	10	30	50	100
Milieu simple	Anhydride sulfureux libre	75	63	37	25	0	100	100	100	40	0
	Acide aldéhyde-sulfureux	75	63	37	25	0	100	100	80	40	37
	Acide pyruvique-sulfureux	75	63	37	25	0	100	100	100	38	15
Vin	Anhydride sulfureux libre	60	44	20	20	0	100	100	86	71	54
	Acide aldéhyde-sulfureux	60	48	40	32	27	100	100	100	100	100
	Acide pyruvique-sulfureux	60	48	32	27	8	100	100	100	75	35

ISVV

que, puisque toutes conditions égales, la quantité d'acide malique transformé varie avec la souche. En milieu synthétique, dans ces essais, ce taux varie de 52 à 100 p. 100 selon qu'il s'agit de **Streptobacterium** ou de **Lactobacillus hilgardii** par exemple.

L' « activité malolactique » développée en milieu synthétique est modifiée lorsque les bactéries non proliférantes sont mises en contact avec l'acide malique dans les vins. Elle peut être favorisée ou plus souvent inhibée, et nous avons émis l'hypothèse que les vins contiennent des substances susceptibles de freiner ou d'activer la fermentation malolactique. Ces substances confèrent au vin sa « fermentescibilité », c'est-à-dire sa capacité de promouvoir cette fermentation. Les bactéries sont plus ou moins sensibles à ces substances de sorte que la fermentescibilité malolactique d'un vin dépend aussi de la souche bactérienne mise en œuvre. Ainsi ce même vin, très fermentescible pour **Lactobacillus hilgardii** (100 p. 100 d'acide malique fermenté), l'est beaucoup moins pour **Streptobacterium** (36 p. 100 d'acide malique fermenté).

Mais un fait essentiel en ce qui concerne ce travail est que la fermentation malolactique, au moyen d'une masse importante de cellules non proliférantes, peut s'effectuer à des concentrations en antiseptiques où toute croissance bactérienne, et partant toute attaque de l'acide malique, seraient inhibées. Ainsi, 25 p. 100 de l'acide malique sont transformés par **Leuconostoc gracile** en 24 heures, en présence de 50 mg d'anhydride sulfureux libre ou combiné par litre, alors que, nous l'avons vu plus haut, 10 mg suffisent pour interdire tout développement bactérien à partir d'un ensemencement faible.

D'autre part, en milieu synthétique, les différentes formes de l'anhydride sulfureux présentent une égale puissance inhibitrice sur la fermentation malolactique. Ainsi les seuils de sensibilité et d'inhibition sont situés aux mêmes concentrations en anhydride sulfureux libre et combiné pour les bactéries **Leuconostoc gracile** et **Streptobacterium.** Par contre, dans le vin, l'anhydride sulfureux libre ajouté se montre plus efficace que ses combinaisons. On pourrait expliquer dans une certaine mesure cette différence par un effet bactéricide immédiat accru dans le vin à pH 3,5 (le milieu synthétique est à pH 4).

Ces essais montrent bien que l'anhydride sulfureux intervient non seulement sur la croissance bactérienne, mais aussi directement sur l'activité malolactique elle-même, non seulement lorsqu'il se trouve sous la forme libre, mais aussi, et parfois avec la même intensité, lorsqu'il se trouve sous les formes combinées.

CONCLUSIONS

Ces essais confirment les résultats de FORNACHON en apportant des preuves supplémentaires de l'effet inhibiteur de l'anhydride sulfureux combiné. Nous avons montré que, dès son premier contact avec les bactéries, l'anhydride sulfureux libre exerce un effet bactéricide qui s'accentue encore par la suite.

Sous la forme combinée, l'anhydride sulfureux présente un effet bactéricide plus atténué ; il affecte le développement bactérien en agissant sur le taux de croissance qu'il diminue d'autant plus fortement que sa concentration est plus élevée. Il en résulte un ralentissement de l'activité cellulaire plus ou moins poussé qui peut se transformer en une inhibition totale pour les plus fortes doses d'acide aldéhyde-sulfureux ou d'acide pyruvique-sulfureux.

L'effet de l'anhydride sulfureux sous les trois formes essayées se renforce lorsque le pH s'abaisse ou lorsque le milieu s'appauvrit : il est plus manifeste dans le vin que dans les milieux nutritifs sucrés. D'autre part, les combinaisons de l'anhydride sulfureux peuvent interdire la fermentation malolactique obtenue au moyen de cellules non proliférantes parfois avec la même intensité que l'anhydride sulfureux libre.

Une application technologique découle de manière immédiate de ces observations. Dans tous les cas où la fermentation malolactique s'avère souhaitable, il paraît nécessaire d'effectuer avec une extrême prudence les additions d'anhydride sulfureux à la vendange. La forme combinée de l'anhydride sulfureux qui persistera dans le vin pourrait constituer un des principaux obstacles au déclenchement ultérieur du développement des bactéries et à leur activité malolactique.

Les résultats de cette expérimentation, nous semble-t-il, éclairent d'un jour nouveau le mode d'action de l'anhydride sulfureux en vinification.

On admettait jusqu'à maintenant que le sulfitage de la vendange, utilisé entre autres raisons pour inhiber les bactéries, agissait sur celles-ci uniquement dans la courte période entre son addition et le départ de la fermentation, c'est-à-dire durant le temps où il reste libre. En réalité, s'il en était seulement ainsi, sa combinaison rapide aux constituants des raisins et du moût devrait l'inactiver complètement. On admettait encore qu'après son passage à l'état d'acide aldéhyde-sulfureux, forme sous

laquelle se retrouve après la fermentation tout l'anhydride sulfureux ajouté à la vendange, il n'exerçait plus de rôle inhibiteur

En fait, comme nous venons de le démontrer, l'anhydride sulfureux combiné est lui-même inhibiteur sur les bactéries lactiques et s'il est cinq à dix fois moins actif que l'anhydride sulfureux libre, il faut tenir compte de ce qu'il peut être cinq à dix fois plus abondant. Son rôle pratique est donc important, à tel point qu'il apparaît qu'au-dessus de 80 à 100 mg d'anhydride sulfureux combiné, la fermentation malolactique devient impossible dans certains types de vins à bas pH, 3,20 à 3,30 par exemple.

Lorsqu'on cherche à éviter la fermentation malolactique (cas des vins blancs secs par exemple) il faut savoir que la stabilité du vin n'est pas due à l'action bactéricide de l'anhydride sulfureux ajouté au moût, mais plutôt à la dose d'anhydride sulfureux combiné que le vin conserve après la vinification dont l'action est durable au cours de la conservation.

Manuscrit reçu le 5 avril 1974.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BLOUIN J., 1966. « Contribution à l'étude des combinaisons de l'anhydride sulfureux dans les moûts et les vins ». Thèse Dr-ing., **Ann. Tech. agric., 15,** 223-287.

FORNACHON J.C.M., 1963. Inhibition of certain lactic acid bacteria by free and bound sulfur dioxide. **Journ. Sci. Food agric., 14,** 857-862.

KIELHOFER E., 1963. Etat et action de l'acide sulfureux dans les vins. Règles de son emploi. Symposium international d'Œnologie, Bordeaux juin 1963. **Ann. Tech. agric., 12,** n° hors série, 1, p. 77.

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,** 141.

LAFON-LAFOURCADE S., 1973. Sur les facteurs de la fermentation malolactique des vins. Symposium de Long Ashton.

MALAN C.E., TARANTOLA C., DOTTRI E., GANDINI A., OZINO O.I., CURZEL V. et CASTINO, 1968. Fermentazione malo-lattica indotta in vini piemontesi. **Atti Accad. ital. Vite. Vino,** 295.

RANKINE B.C. et BRIDSON D.A., 1971. Bacterial spoilage in dry red wine and its relationship to malolactic fermentation. **Australian Wine Brew. and Spirit. Review, 90,** 3.

RIBÉREAU-GAYON J. et PEYNAUD E., 1960-1961. Traité d'Œnologie : 2 tomes. Librairie Ch. Béranger, Paris.

RIBEREAU-GAYON J., PEYNAUD E., SUDRAUD P. et RIBEREAU-GAYON P., 1972. **Sciences et techniques du vin,** Tome 1. **Analyse et contrôle des vins.** Dunod, Paris.

SAPIS J.C. et PEYNAUD E. (1971). Etude des substances combinant l'anhydride sulfureux dans les moûts et les vins. **Conn. Vigne Vin, 5,** 217.