

Contribution à l'étude de la dégradation de l'acide L-malique par les bactéries lactiques isolées du vin: Effet stimulant des autolysats de levures

par

M. GUILLOUX-BENATIER, M. FEULLAT et B. CIOLFI¹⁾

Degradation of L-malic acid by lactic bacteria isolated from wine: Stimulating effect of yeast autolysates

S u m m a r y : Five yeast autolysates used in the present study showed very different levels of proteolysis. They had a major effect on the growth and the malolactic activity of four strains of lactic acid bacteria isolated from wine (*Lactobacillus hilgardii*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc oenos* strain 44—40 and *Leuconostoc oenos* strain B). This effect was always stimulating, but there was considerable interaction between the type of autolysate and the bacterial strain on the one hand and the composition of the culture medium (pH, ethanol) on the other hand.

K e y w o r d s : yeast, autolysis, protein, lactic acid, bacteria, malo-lactic fermentation.

Introduction

La fermentation malolactique est recherchée dans les régions viticoles septentrionales notamment en vinification en rouge. En effet, la transformation bactérienne de l'acide L-malique en acide lactique conduit à une désacidification partielle du vin en lui donnant de la souplesse tout en assurant sa stabilité microbienne. Cependant, la fermentation malolactique reste dans la pratique une fermentation mal maîtrisée car les bactéries lactiques ne trouvent pas dans le vin des conditions de développement particulièrement favorables: pH bas, présence d'éthanol, d'anhydride sulfureux et de composés phénoliques, peu de nutriments disponibles, basse température de conservation des vins . . .

De nombreuses études portant sur les facteurs nutritionnels des bactéries lactiques ont été conduites: faibles besoins énergétiques mais nécessité de traces d'hydrates de carbone pour l'activité malolactique (21); nécessité de la présence de certains sels minéraux (16); exigences en certaines vitamines (19); influence de la concentration initiale en acide malique du moût sur le déclenchement de la fermentation malolactique (3); rôle des acides malique et citrique comme substrats de croissance des bactéries lactiques (5, 6); effet autostimulant de la fermentation malolactique sur la croissance bactérienne (20).

Un rôle important semble être joué par les composés azotés sur la croissance et l'activité malolactique des bactéries lactiques du vin: rôle essentiel de certains acides aminés comme source azotée (2) et comme source carbonée (12); stimulation du développement de la population bactérienne par les bases puriques et pyrimidiques (19); rôle de facteurs de croissance des peptides et notamment des oligopeptides (1, 8, 9, 17);

¹⁾ Avec la collaboration technique de J. GUERREAU.

effet stimulant des autolysats de levures sur les taux de croissance et de dégradation de l'acide L-malique (4, 7, 9, 11, 13); effet positif de la fermentation alcoolique par des souches de levure à caractère protéolytique sur la fermentescibilité malolactique des vins (10, 11).

Dans ce travail, alors que l'on commence à ensemercer les vins en bactéries lactiques (11, 15), il nous a paru intéressant de préciser l'influence dans le milieu de la teneur et de la nature des composés azotés sur la croissance des bactéries lactiques et sur leur capacité à dégrader l'acide L-malique. Comme sources d'azote, nous avons testé plusieurs autolysats de levures préparés au laboratoire ou industriellement et présentant des degrés de protéolyse différents. Ces autolysats ont été ajoutés soit à des milieux de culture favorables à la croissance: pH élevé et absence d'éthanol, soit à des milieux de culture limitant: pH bas et absence d'éthanol ou même pH bas et présence d'éthanol, c'est à dire dans ce dernier cas à un milieu ayant une composition proche de celle du vin. L'étude a été conduite pour quatre souches de bactéries lactiques isolées du vin: un bacille hétérofermentaire (*Lactobacillus hilgardii*) et trois coques hétérofermentaires (*Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc oenos* souche 44—40 et *Leuconostoc oenos* souche B).

Les trois premières souches sont conservées par repiquage sur gélose, la quatrième est actuellement disponible sous la forme lyophilisée et nous l'avons déjà utilisée pour ensemercer des vins (11).

Matériel et méthodes

1 Préparation et analyse des autolysats de levures

Cinq autolysats ont été utilisés comme source d'azote pour la croissance des bactéries lactiques. Trois d'entre eux désignés autolysats «F1», «F2», «F3» ont été préparés industriellement ou en pilote avec les teneurs en extrait sec et les taux d'azote donnés dans le tableau suivant:

Nature des autolysats	Extrait sec (%)	Azote/extrait sec (%)
F1	80,6	12,3
F2	72,5	9,4
F3	66,5	13,0

Les deux autres autolysats ont été préparés au laboratoire de la façon suivante: 120 g de levures sèches *Saccharomyces bayanus* sont mis à incuber dans un tampon aqueux ajusté à pH 3 et renfermant 10 % d'éthanol, 4 g/l d'acide tartrique, 3 g/l d'acide malique, 0,1 g/l d'acide acétique, 0,1 g/l de sulfate de potassium et 0,025 g/l de sulfate de magnésium. La composition de ce tampon a été choisie comme étant proche de celle du vin. Les levures sont mises à incuber dans ce tampon pendant 48 h à 30 °C pour l'un des lots et à 50 °C pour l'autre lot. En fin d'autolyse, les surnageants sont séparés par centrifugation et sont désignés comme étant respectivement les autolysats «30» et «50». L'autolysat préparé à 30 °C renferme 475 µg/ml d'azote total et celui préparé à 50 °C en renferme 930 µg/ml.

Les dosages d'azote sont effectués selon la méthode de Kjeldahl à l'aide d'un matériel de minéralisation et de distillation «Büchi». Afin de pouvoir analyser et utiliser

ces autolysats dans les mêmes conditions que ceux de la série «F», on prépare à partir de chaque autolysat séché ou liquide, des solutions renfermant environ 5 µg/ml d'azote total.

Dans ces solutions on sépare et on dose les acides aminés selon la méthode de MOORE et STEIN (18). L'état de protéolyse de chaque autolysat est précisé par chromatographie des solutions correspondantes sur colonne de Sephadex G 25 selon la technique suivante:

10 ml de solution sont concentrés sous vide à 5 ml, dont la concentration en azote est alors voisine de 10 µg/ml. Ces 5 ml sont chromatographiés sur une colonne de Sephadex G 25 de 45 cm de longueur, de 4,9 cm² de section, et dont le volume d'exclusion est déterminé par passage d'une solution de dextran bleu à 2 ‰. L'éluion des composés azotés est effectuée selon la technique décrite par FEULLAT *et al.* (9).

L'azote contenu dans les principaux groupes de fractions repérés en UV à 278 nm dans l'éluat de Sephadex et séparés en fonction de leur poids moléculaire est dosé en continu selon la réaction de BERTHELOT à l'aide d'une chaîne d'analyse automatique séquentielle équipée d'un module de minéralisation (9).

2 Cultures bactériennes

2.1 Souches de bactéries lactiques

Quatre souches ont été testées:

- *Lactobacillus hilgardii*: bacille hétérofermentaire
- *Leuconostoc mesenteroides*: coque hétérofermentaire
- *Leuconostoc oenos* 44—40: coque hétérofermentaire
- *Leuconostoc oenos* B: coque hétérofermentaire

Ces souches sont conservées par repiquage bimensuel sur un milieu gélosé à 17 g/l ou non gélosé, contenant 10 g/l de glucose, 5 g/l d'autolysat de levures du commerce, 5 g/l d'hydrolysate acide de caséine et 5 g/l d'acide D, L-malique avec ajustement du pH à 4,5. Les souches sont gardées à +4 °C en milieu solide ou liquide, excepté *L. oenos* B qui étant sous forme lyophilisée est conservée à -18 °C.

2.2 Préculture et réactivation des bactéries lactiques

La préculture est faite sur 200 ml de moût de raisin pasteurisé dilué au demi, titrant 90 g/l de sucres, additionné de 5 g/l d'autolysat de levures et amené à pH 4,5 avec de la soude 10 N (4). Le milieu de réactivation utilisé pour la souche de bactérie lactique lyophilisée *L. oenos* B est le même que celui de la préculture. Les bactéries lactiques lyophilisées sont incorporées dans ce milieu à un taux voisin de 10⁸ cellules/ml et placées 24 h à 25 °C.

Les contrôles de populations dans la préculture ou le milieu de réactivation sont effectués par dénombrement sur boîtes de Pétri (milieu MRS modifié; 22).

2.3 Cultures des bactéries lactiques

Le milieu synthétique utilisé a la composition suivante:

- glucose: 5 ou 20 g/l
- acétate de sodium: 5 g/l
- sulfate de magnésium: 200 mg/l
- sulfate de manganèse: 50 mg/l
- hydrogénophosphate di-potassique: 2 g/l
- acide L-malique: 2,5 g/l pour les cultures de *L. hilgardii* et *L. mesenteroides*; 5 g/l pour les cultures des deux souches de *L. oenos*.

Les milieux testés diffèrent par leur pH: 5,4, 4,5 ou 3,5; par la présence ou l'absence d'éthanol et par la source azotée. En ce qui concerne celle-ci, les additions d'autolysats ont été faites de telle sorte que la concentration en azote total soit voisine de 500 mg/l ou de 200 mg/l.

Les cultures sont réalisées en erlenmeyer de 250 ml à 25 °C. Les ensemencements sont effectués à 1 % en volume c'est à dire à partir de 2,5 ml de préculture (bactéries prélevées au milieu de la phase de croissance exponentielle) ou à partir de 2,5 ml de milieu de réactivation pour la souche lyophilisée. Les populations initiales en bactéries lactiques sont voisines de 10⁶ cellules/ml. La croissance bactérienne est évaluée par la mesure de la densité optique à 620 nm, la dégradation de l'acide L-malique par dosage enzymatique de l'acide restant dans le milieu et l'assimilation du glucose par dosage colorimétrique à l'orcinol du sucre restant.

Compte tenu de l'intérêt particulier que présente pour la fermentation malolactique des vins l'espèce *L. oenos*, nous présenterons successivement d'une part les essais de culture conduits avec *L. hilgardii* et *L. mesenteroïdes* et d'autre part les essais réalisés avec les deux souches de *L. oenos*: *L. oenos* 44—40 et *L. oenos* B. Cette dernière souche, présentée sous une forme lyophilisée, a retenu plus particulièrement notre attention. Outre l'effet stimulant des autolysats vis-à-vis de la croissance de cette souche et de son activité malolactique, nous avons étudié l'influence de la teneur en azote et de la concentration en éthanol du milieu de culture.

Résultats

1 Composition azotée des autolysats de levures

Les teneurs en azote aminé déterminées pour chacune des solutions correspondant aux différents autolysats et dont on connaît les teneurs en azote total permettent de calculer les pourcentages d'acides aminés (Tableau 1). Ces pourcentages sont élevés dans les trois autolysats de la série «F» et en particulier dans l'autolysat «F3» pour

Tableau 1
Composition azotée des différents autolysats de levures
Nitrogen composition of various yeast autolysates

Nature des autolysats	Azote total des solutions (mg/l)	Azote aminé (% d'N total)	Part des fractions azotées (% d'N total)			
			I	II	III	IV
F1	4 500	40	23	69	5	3
F2	6 625	25	12	80	4	4
F3	4 725	57	6	82	7	5
30	4 325	3	40	36	— 24 —	
50	5 250	2	42	49	9	0

Fractions séparées sur la colonne Sephadex G 25

- I: Protéines et polypeptides PM \geq 5 000.
- II: Peptides courts et acides aminés PM <5 000.
- III et IV: Acides aminés aliphatiques et aromatiques.

Fractions separated on Sephadex G 25 column

- I: Proteins and polypeptides MW \geq 5 000.
- II: Short peptides and amino acids MW <5 000.
- III and IV: Aliphatic and aromatic amino acids.

lequel l'azote aminé représente près de 60 % de l'azote total, ce qui indique un fort degré de protéolyse.

Par contre les deux autolysats «30» et «50» préparés au laboratoire ont des teneurs en acides aminés très faibles puisqu'elles ne représentent que 2—4 % de l'azote total. Ces autolysats sont donc très peu dégradés.

Indépendamment du dosage de l'azote aminé, le degré de protéolyse des différents autolysats peut être apprécié par la chromatographie sur colonne de Sephadex G 25. Les pourcentages des différentes fractions azotées séparées en fonction de leur poids moléculaire pour chacun des autolysats sont donnés également dans le Tableau 1. Les deux autolysats préparés au laboratoire sont les plus riches en protéines et polypeptides d'un poids moléculaire supérieur ou égal à 5 000 (Fraction I). Inversement les autolysats de la série «F» sont surtout riches en peptides courts et en acides aminés (Fraction II) et ceci est particulièrement vrai pour les autolysats «F2» et «F3».

Du point de vue composition en acides aminés (Tableau 2) les autolysats de la série «F» sont particulièrement riches en acides aminés basiques: lysine, histidine et arginine ainsi qu'en thréonine, en acide glutamique, en α -alanine, en valine et en leucine. Les deux autolysats préparés au laboratoire signalés précédemment comme très pauvres en acides aminés renferment seulement trois acides aminés à plus de 10 mg/l exprimés en azote: l'histidine, l'acide glutamique et l' α -alanine. Il convient de noter que ces autolysats sont pauvres en arginine qui est l'acide aminé le plus abondant dans le vin et qui constitue la source d'azote quantitativement la plus importante pour la croissance des bactéries lactiques (11).

Tableau 2

Composition en acides aminés (mg/l de l'azote et % d'azote total) des différents autolysats de levures

Amino acid composition (mg/l of nitrogen and % from total nitrogen) of various yeast autolysates

Nature des acides aminés	F1		F2		F3		30		50	
	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%
Lysine	219	4,9	214	3,2	389	8,2	12	0,3	8	0,2
Histidine	67	1,5	31	0,5	184	3,9	28	0,6	17	0,3
Arginine	209	4,6	126	1,9	379	8,0	12	0,3	8	0,2
Ac. aspartique	66	1,5	33	0,5	118	2,5	8	0,2	5	0,1
Thréonine	152	3,4	86	1,3	234	5,0	13	0,3	6	0,1
Sérine	91	2,0	47	0,7	136	2,9	6	0,1	3	0,05
Ac. glutamique	184	4,1	432	6,5	172	3,6	8	0,2	10	0,2
Glycine	95	2,1	44	0,7	163	3,4	4	0,1	2	0,05
Alanine	219	4,9	363	5,5	210	4,4	13	0,3	10	0,2
Valine	122	2,7	102	1,5	163	3,4	6	0,1	4	0,1
Méthionine	24	0,5	12	0,2	40	0,8	3	0,1	2	0,05
Isoleucine	99	2,2	37	0,6	152	3,2	7	0,2	4	0,1
Leucine	171	3,8	65	1,0	247	5,2	14	0,3	8	0,2
Tyrosine	21	0,5	21	0,3	14	0,3	4	0,1	2	0,05
Phénylalanine	79	1,8	36	0,5	107	2,3	7	0,2	4	0,1
Total	1818	40	1 649	25	2708	57	145	3	93	2

2 Influence des autolysats de levures sur la croissance des bactéries lactiques et sur la dégradation de l'acide malique en milieu synthétique

2.1 Etude d'une souche de *Lactobacillus hilgardii* et d'une souche de *Leuconostoc mesenteroides*

Pour ces deux bactéries, parallèlement à l'étude de l'effet stimulant des différents autolysats de levures ajoutés au milieu de culture, nous avons testé l'influence du pH et de la présence ou l'absence d'éthanol sur la croissance et l'activité malolactique.

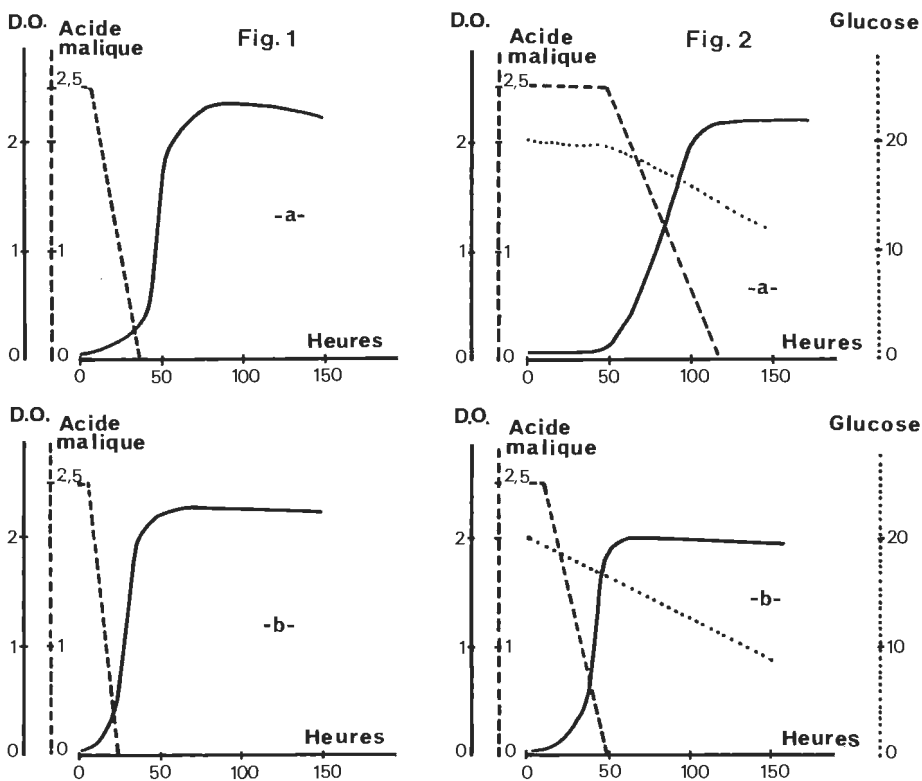


Fig. 1: Cultures sur milieu de croissance optimum (pH 5,4; absence d'éthanol) de *Lactobacillus hilgardii* avec l'autolysat «F1» (a) et de *Leuconostoc mesenteroides* avec l'autolysat «30» (b). — croissance (D.O. à 620 nm); - - - - acide malique (g/l).

Fig. 2: Cultures sur milieu de croissance limitant (pH 3,5; absence d'éthanol) de *Lactobacillus hilgardii* avec l'autolysat «F1» (a) et de *Leuconostoc mesenteroides* avec l'autolysat «30» (b). — croissance (D.O. à 620 nm); - - - - acide malique (g/l); glucose (g/l).

Fig. 1: Cultures on 'optimum growth medium' (pH 5.4; without ethanol) of *Lactobacillus hilgardii* with yeast autolysate 'F1' (a) and of *Leuconostoc mesenteroides* with yeast autolysate '30' (b). — bacterial growth (D.O. 620 nm); - - - - L-malic acid (g/l).

Fig. 2: Cultures on 'restrictive growth medium' (pH 3.5; without ethanol) of *Lactobacillus hilgardii* with yeast autolysate 'F1' (a) and of *Leuconostoc mesenteroides* with yeast autolysate '30' (b). — bacterial growth (D.O. 620 nm); - - - - L-malic acid (g/l); glucose (g/l).

2.1.1 Cultures sur milieu de croissance à pH élevé (5,4) et ne renfermant pas d'éthanol

Dans ces milieux de culture que l'on peut considérer comme optimum, on note pour les deux bactéries une croissance de type logarithmique (Fig. 1). Trois résultats intéressants apparaissent:

— La fermentation malolactique a été obtenue pour les deux cultures pendant la phase de latence et le tout début de la phase de croissance exponentielle. La dégradation de l'acide malique pourrait donc être le fait d'une biomasse non proliférante qui fonctionnerait comme une préparation enzymatique (14).

— Il n'y a pas obligatoirement une relation entre le taux de croissance le plus élevé et la plus grande vitesse de dégradation de l'acide malique. Ainsi pour *L. hilgardii*, les taux de croissance sont comparables avec les autolysats «F2» et «50» mais la dégradation de l'acide malique est beaucoup plus rapide avec le premier de ces autolysats (Tableau 3).

— En comparant les deux autolysats préparés au laboratoire «30» et «50», la durée de la fermentation malolactique est plus courte avec le premier de ces autolysats qu'avec le second et ceci est particulièrement vrai pour la culture de *L. hilgardii*. Pour cette dernière bactérie, l'autolysat «30» est, parmi les cinq autolysats testés, celui qui a l'effet stimulant le plus marqué vis-à-vis de la dégradation de l'acide malique (Tableau 3). En ce qui concerne l'influence des autolysats de la série «F» sur l'activité malolactique des deux bactéries étudiées, on observe que l'autolysat «F3» accélère légèrement plus la vitesse de dégradation de l'acide malique que les autolysats «F1» et «F2».

2.1.2 Cultures sur milieu de croissance à pH 3,5 et ne renfermant pas d'éthanol

La croissance des bactéries est dans ce cas légèrement plus faible que dans le milieu optimum, mais c'est surtout la dégradation de l'acide malique qui est beaucoup

Tableau 3

Cultures sur milieu de croissance optimum de *Lactobacillus hilgardii* et de *Leuconostoc mesenteroides*

Cultures of *Lactobacillus hilgardii* and of *Leuconostoc mesenteroides* on 'optimum growth medium'

Nature des autolysats	<i>L. hilgardii</i>			<i>L. mesenteroides</i>		
	Croissance maximale (D.O. max. 620 nm)	Durée de la F.M.L. (h)	Acide malique dégradé (g/l)	Croissance maximale (D.O. max. 620 nm)	Durée de la F.M.L. (h)	Acide malique dégradé (g/l)
F1	2,3	38	2,5	2,25	27	2,5
F2	2,0	32	2,5	2,15	27	2,5
F3	2,15	30	2,5	2,3	25	2,5
30	2,1	24	2,5	2,25	25	2,5
50	1,95	56	2,5	2,1	27	2,5

F.M.L. = Fermentation malolactique.

pH 5,4; absence d'éthanol; 500 mg/l d'azote; teneur initiale en acide malique = 2,5 g/l; 20 g/l de glucose.

F.M.L. = Malolactic fermentation.

pH 5.4; without ethanol; 500 mg/l of nitrogen; initial amount of L-malic acid = 2.5 g/l; 20 g/l of glucose.

Tableau 4

Culture sur milieu de croissance limitant de *Lactobacillus hilgardii* et de *Leuconostoc mesenteroides*

Cultures of *Lactobacillus hilgardii* and of *Leuconostoc mesenteroides* on 'restrictive growth medium'

Nature des autolysats	<i>L. hilgardii</i>			<i>L. mesenteroides</i>		
	Croissance maximale (D.O. max. 620 nm)	Durée de la F.M.L. (h)	Acide malique dégradé (g/l)	Croissance maximale (D.O. max. 620 nm)	Durée de la F.M.L. (h)	Acide malique dégradé (g/l)
F1	2,2	120	2,5	2,0	48	2,5
F2	2,0	125	2,5	1,7	55	2,5
F3	2,2	133	2,5	1,95	46	2,5
30	2,0	172	2,5	2,0	50	2,5
50	2,0	197	2,5	2,0	57	2,5

F.M.L. = Fermentation malolactique.

pH 3,5; absence d'éthanol; 500 mg/l d'azote; teneur initiale en acide malique = 2,5 g/l; 20 g/l de glucose.

F.M.L. = Malolactic fermentation.

pH 3.5; without ethanol; 500 mg/l of nitrogen; initial amount of L-malic acid = 2.5 g/l; 20 g/l of glucose.

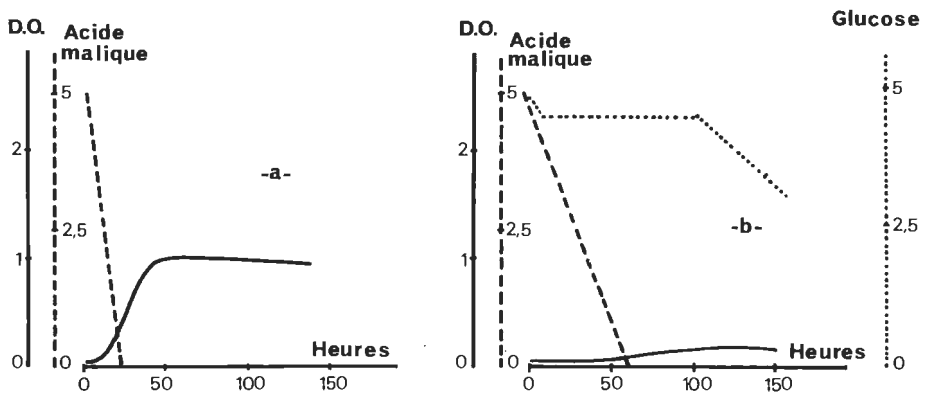


Fig. 3: Cultures de *Leuconostoc oenos* 44—40 en présence de l'autolysat «F2» sur milieu de croissance optimum (pH 4,5; absence d'éthanol) (a) et sur milieu de croissance limitant (pH 3,5; absence d'éthanol) (b). — croissance (D.O. à 620 nm); - - - - acide malique (g/l); glucose (g/l).

Cultures of *Leuconostoc oenos* 44—40 with yeast autolysate 'F2' on 'optimum growth medium' (pH 4.5; without ethanol) (a) and on 'restrictive growth medium' (pH 3.5); without ethanol) (b). — bacterial growth (D.O. 620 nm); - - - - L-malic acid (g/l); glucose (g/l).

plus lente qu'à pH 5,4 (Tableau 4). Ainsi, la durée de démalicage double sensiblement pour *L. mesenteroides* et est avec certains autolysats trois à sept fois plus longue qu'à pH 5,4 pour *L. hilgardii*. Par exemple, pour cette dernière bactérie cultivée en présence de l'autolysat «F1», le démalicage s'est fait en 38 h à pH 5,4 alors qu'il dure 120 h à pH 3,5. Dans ce cas, on observe une phase de latence d'environ 50 h avant que ne commence la dégradation de l'acide malique (Fig. 2 a). Toujours pour *L. hilgardii*, notons qu'à pH 3,5 contrairement à ce qui a été observé à pH 5,4, c'est l'autolysat «F1» et non plus l'autolysat «30» qui stimule le plus l'activité malolactique.

Tableau 5

Cultures sur milieu de composition proche de celle du vin de *Lactobacillus hilgardii* et de *Leuconostoc mesenteroides*

Cultures of *Lactobacillus hilgardii* and of *Leuconostoc mesenteroides* on 'restrictive growth medium' like the composition of wine

Nature des autolysats	<i>L. hilgardii</i>			<i>L. mesenteroides</i>		
	Croissance maximale (D.O. max. 620 nm)	Durée de la F.M.L. (h)	Acide malique dégradé (g/l)	Croissance maximale (D.O. max. 620 nm)	Durée de la F.M.L. (h)	Acide malique dégradé (g/l)
F1	0,9	78	2,5	1,9	48	2,5
F2	0,8	94	2,5	1,4	60	2,5
F3	0,8	112	2,5	1,5	54	2,5
30	1,0	136	2,5	1,2	72	2,5
50	1,0	130	2,5	1,0	76	2,5

F.M.L. = Fermentation malolactique.

pH 3,5; 10 % d'éthanol; 500 mg/l d'azote; teneur initiale en acide malique = 2,5 g/l; 5 g/l de glucose.

F.M.L. = Malolactic fermentation.

pH 3.5; 10 % ethanol; 500 mg/l of nitrogen; initial amount of L-malic acid = 2.5 g/l; 5 g/l of glucose.

2.1.3 Cultures à pH 3,5 en présence de 10 % d'éthanol

Dans ce milieu qui se rapproche des conditions physico-chimiques du vin, la croissance des deux bactéries testées: *L. hilgardii* et *L. mesenteroides* est beaucoup plus faible que dans les deux autres séries de culture (Tableau 5). Malgré cela, la dégradation de l'acide malique est complète et a une durée sensiblement comparable à celle obtenue dans le milieu à pH 3,5 ne renfermant pas d'éthanol.

L'action plus stimulante des autolysats de la série «F» par rapport à celle des autolysats «30» et «50» vis-à-vis de la vitesse de démalicage devient encore plus nette qu'en l'absence d'éthanol. Pour les deux souches étudiées, c'est alors l'autolysat «F1» qui a l'effet activateur le plus important.

2.2 Etude de deux souches de *Leuconostoc oenos*

L'une des souches: *L. oenos* 44—40 est, rappelons le, conservée par repiquage sur milieu gélosé comme *L. hilgardii* et *L. mesenteroides*, alors que l'autre souche: *L. oenos* B est conservée à l'état lyophilisé.

La première souche a fait l'objet simplement de cultures en l'absence d'éthanol à pH 4,5 et à 3,5 en vue d'établir une comparaison avec les cultures précédentes de *L.*

hilgardii et de *L. mesenteroides*; la souche de *L. oenos* B a été d'abord étudiée dans les mêmes conditions de milieu que *L. oenos* 44—40, puis en présence de concentrations différentes d'autolysat de levures et d'éthanol.

2.2.1 Cultures de *Leuconostoc oenos* 44—40

Les résultats obtenus à pH 4,5 et à 3,5 sont donnés dans le Tableau 6 ainsi que sur la Fig. 3.

A pH 4,5, et comme nous l'avons observé à pH 5,4 pour *L. hilgardii* et *L. mesenteroides*, la dégradation de l'acide malique se fait pendant la phase de latence et le tout début de la croissance exponentielle de la bactérie (Fig. 3 a). De même, il n'y a pas obligatoirement une relation entre le taux de croissance le plus élevé et la plus grande vitesse de dégradation de l'acide malique (Tableau 6): ce sont les autolysats «F2» et «30» qui stimulent le plus l'activité malolactique, bien que ce soit l'autolysat «F1» qui donne la croissance maximale la plus importante.

Tableau 6

Cultures de *Leuconostoc oenos* 44—40 sur milieu de croissance à pH 4,5 ou à pH 3,5 en l'absence d'éthanol

Cultures of *Leuconostoc oenos* 44—40 on growth medium of pH 4.5 or of pH 3.5 without ethanol

Nature des autolysats	Culture à pH 4,5			Culture à pH 3,5		
	Croissance maximale (D. O. max. (620 nm))	Durée de la F.M.L. (h)	Acide malique dégradé (g/l)	Croissance maximale (D.O. max. (620 nm))	Durée de la F.M.L. (h)	Acide malique dégradé (g/l)
F1	1,1	39	5,0	0,08	116	5,0
F2	1,0	23	5,0	0,12	64	5,0
F3	0,7	39	5,0	0,04	91	5,0
30	0,9	23	5,0	0,07	91	5,0
50	1,0	39	5,0	0,06	91	5,0

F.M.L. = Fermentation malolactique.

200 mg/l d'azote; teneur initiale en acide malique = 5 g/l; 5 g/l de glucose.

F.M.L. = Malolactic fermentation.

200 mg/l of nitrogen; initial amount of L-malic acid = 5 g/l; 5 g/l of glucose.

Enfin, et toujours par comparaison avec les cultures de *L. hilgardii* et de *L. mesenteroides* conduites à pH 5,4, on constate que *L. oenos* 44—40 dégrade dans des temps comparables deux fois plus d'acide malique: 5 g/l contre 2,5 g/l, malgré un pH de culture plus bas (4,5) et une teneur en azote et en glucose du milieu plus faible (200 mg/l contre 500 mg/l pour l'azote; 5 g/l contre 20 g/l pour le glucose). Cette remarque est vraie, quel que soit l'autolysat apporté.

Pour ce qui est des cultures de *L. oenos* 44—40 conduites à pH 3,5, on note une très forte chute de la croissance qui est réduite d'environ un facteur 10 par rapport à la croissance mesurée à pH 4,5 (Tableau 6, Fig. 3 b). Malgré cette très grande sensibilité de la souche à l'abaissement du pH, les durées de dégradation de l'acide malique sont intermédiaires à celles obtenues au même pH avec respectivement *L. hilgardii* et *L. mesenteroides*, et ceci toujours dans un milieu moins riche en azote et en glucose. Notons que plus encore qu'à pH 4,5, c'est l'autolysat «F2» qui active le plus la dégradation de l'acide malique par *L. oenos* 44—40.

Tableau 7

Cultures de *Leuconostoc oenos* B sur milieu de croissance à pH 4,5 ou à pH 3,5 en l'absence d'éthanol · Influence des différents autolysats de levures

Effect of the different yeast autolysates on cultures of *Leuconostoc oenos* B grown on media of pH 4.5 or of pH 3.5 without ethanol

Nature des autolysats	Culture à pH 4,5		Culture à pH 3,5	
	Croissance maximale (D.O. max. 620 nm)	Teneur en acide malique restant après 4 d (g/l)	Croissance maximale (D.O. max. 620 nm)	Teneur en acide malique restant après 8 d (g/l)
F1	0,8	4,17	0,06	1,49
F2	0,6	1,97	0,09	0,68
F3	0,7	4,63	0,02	3,64

F.M.L. = Fermentation malolactique.

200 mg/l d'azote; teneur initiale en acide malique = 5 g/l; 5 g/l de glucose.

F.M.L. = Malolactic fermentation.

200 mg/l of nitrogen; initial amount of L-malic acid = 5 g/l; 5 g/l of glucose.

Il convient d'observer que dans toutes les cultures conduites à pH 3,5 et en l'absence d'éthanol, les bactéries, quelle que soit la souche testée, assimilent préférentiellement l'acide malique au glucose (Fig. 2 a, b et 3 b). Ce résultat est en accord avec les observations de CHAUVET *et al.* (5). L'assimilation du glucose ne se fait qu'à partir du moment où il y a une croissance bactérienne, alors que celle de l'acide malique peut commencer pendant la phase de latence, et se poursuivre même en phase stationnaire.

2.2.2 Cultures de *Leuconostoc oenos* B (souche lyophilisée)

Des essais semblables de culture à pH 4,5 et à 3,5 en l'absence d'éthanol ont été reconduits avec cette souche de *Leuconostoc* qui est, rappelons le, conservée à l'état

Tableau 8

Cultures de *Leuconostoc oenos* B sur milieu de croissance à pH 4,5 ou à pH 3,5 en l'absence d'éthanol · Influence de la quantité d'azote apportée par l'autolysat «F2»

Influence of the amount of nitrogen supplied by yeast autolysate 'F2' on cultures of *Leuconostoc oenos* B grown on media of pH 4.5 or of pH 3.5 without ethanol

Nature des autolysats	Culture à pH 4,5		Culture à pH 3,5	
	Croissance maximale (D.O. max. 620 nm)	Durée de la F.M.L. (h)	Croissance maximale (D.O. max. 620 nm)	Durée de la F.M.L. (h)
F2 à 200 mg/l d'N	0,6	136	0,09	240
F2 à 500 mg/l d'N	0,7	99	0,12	136

F.M.L. = Fermentation malolactique.

Teneur initiale en acide malique = 5 g/l; 5 g/l de glucose.

F.M.L. = Malolactic fermentation.

Initial amount of L-malic acid = 5 g/l; 5 g/l of glucose.

lyophilisé et préalablement réactivée. Seuls les autolysats de la série «F» ont été étudiés du point de vue effet stimulant.

D'après les résultats donnés dans le Tableau 7, il apparaît que l'autolysat «F2», bien que n'activant pas ou activant très peu la croissance bactérienne, augmente fortement les quantités d'acide malique dégradé; l'effet est plus significatif à pH 3,5 qu'à 4,5. Rappelons que nous avons fait la même observation précédemment pour la souche de *L. oenos* 44—40.

Pour ces deux pH, nous avons utilisé comme activateur l'autolysat «F2» à des doses telles que dans un cas on apporte au milieu 200 mg/l d'azote et dans l'autre 500 mg/l (Tableau 8). L'augmentation des apports d'autolysats, c'est à dire l'enrichissement en azote, stimule légèrement la croissance mais active très fortement la fermentation malolactique qui est beaucoup plus courte avec 500 mg/l d'azote, notamment à pH 3,5.

Pour un pH de culture non limitant (pH 4,5), l'addition d'éthanol à des doses croissantes dans le milieu se traduit pour *L. oenos* B par une diminution de la croissance et par une augmentation de la durée de la fermentation malolactique, quel que soit l'autolysat étudié (Tableau 9).

Cependant, l'autolysat «F2», signalé plus haut pour son effet particulièrement stimulant sur la vitesse de dégradation de l'acide malique dans les milieux de croissance ne renfermant pas d'éthanol, permet une fermentation malolactique également plus rapide que les autolysats «F1» et «F3» en présence d'éthanol. Cet effet positif très marqué pour des concentrations de 8 et 10 % d'éthanol se retrouve aussi pour une teneur de 12 % d'éthanol, puisque dans ce dernier cas la durée de la fermentation malolactique en présence de l'autolysat «F2» est de 304 h seulement, alors qu'elle est respectivement de 333 h en présence de l'autolysat «F1» et de 424 h en présence de l'autolysat «F3».

Par ailleurs, dans le cas de l'autolysat «F3», la durée de la fermentation malolactique augmente fortement selon qu'il y a 10 ou 12 % d'éthanol, puisqu'elle est respectivement de 333 et de 424 h.

Tableau 9

Cultures de *Leuconostoc oenos* B sur milieu de croissance à pH 4,5 additionné de concentrations croissantes d'éthanol

Influence of increasing amounts of ethanol on cultures of *Leuconostoc oenos* B grown on media of pH 4.5

	Teneur des autolysats en éthanol (%)											
	F1				F2				F3			
	5	8	10	12	5	8	10	12	5	8	10	12
Croissance maximale (D.O. max. 620 nm)	0,58	0,56	0,55	0,41	0,45	0,31	0,165	0,145	0,70	0,61	0,50	0,30
Durée de la F.M.L. (h)	165	257	304	333	165	191	191	304	165	304	333	424

F.M.L. = Fermentation malolactique.

F.M.L. = Malolactic fermentation.

Pour des cultures de *L. oenos* B sur un milieu de croissance à pH 3,5 et en présence de 10 % d'éthanol, l'autolysat «F2» a un effet stimulant très supérieur aux deux autres autolysats «F1» et «F3» vis-à-vis de l'activité malolactique de cette bactérie. La fermentation malolactique dure en effet 311 h en présence de l'autolysat «F2» alors qu'après 349 h de culture, il reste encore 0,5 g/l d'acide L-malique non dégradé en présence de l'autolysat «F1» et 0,7 g/l en présence de l'autolysat «F3» (Tableau 10).

Tableau 10

Cultures de *Leuconostoc oenos* B sur milieu de croissance à pH 3,5 renfermant 10 % d'éthanol
Cultures of *Leuconostoc oenos* B grown on media of pH 3.5 containing 10 % ethanol

Nature des autolysats	Teneur en éthanol (%)	Croissance maximale (D.O. max. 620 nm)	Durée de la F.M.L. (h)	Acide malique dégradé (g/l)
F1	0	0,120	284	5,0
	10	0,185	349	4,5
F2	0	0,100	162	5,0
	10	0,080	311	5,0
F3	0	0,080	208	5,0
	10	0,040	349	4,3

F.M.L. = Fermentation malolactique.

500 mg/l d'azote; teneur initiale en acide malique = 5 g/l; 5 g/l de glucose.

F.M.L. = Malolactic fermentation.

500 mg/l of nitrogen; initial amount of L-malic acid = 5 g/l; 5 g/l of glucose.

Notons que si l'autolysat «F2» a un effet fortement activateur sur la dégradation de l'acide malique, il n'entraîne pas pour autant une meilleure croissance des bactéries lactiques. Celle-ci est d'ailleurs plus élevée en présence de l'autolysat «F1».

Discussion

Selon leur mode de préparation, les autolysats de levures sont plus ou moins protéolysés et comme source azotée leur action stimulante vis-à-vis de la croissance ou de l'activité malolactique des bactéries lactiques intervient à la fois par la quantité et par la qualité de l'azote qu'ils apportent. Seuls, les autolysats suffisamment dégradés ont un effet activateur très net.

Par ailleurs, il apparaît qu'un autolysat donné n'a pas le même effet activateur selon la souche de bactérie lactique testée et pour une même souche selon les conditions de milieu utilisées: pH, absence ou présence d'éthanol.

Ainsi pour des conditions de culture optimum: pH 5,4, absence d'éthanol, l'activité malolactique de *L. hilgardii* et de *L. mesenteroides* est la plus stimulée par l'autolysat le plus fortement dégradé désigné «F3». Par contre, à pH 3,5 et en présence de 10 % d'éthanol c'est l'autolysat «F1», moins riche en acides aminés, qui stimule le plus la dégradation de l'acide malique par ces deux bactéries lactiques.

En ce qui concerne les deux souches de *L. oenos* étudiées: *L. oenos* 44—40 et *L. oenos* B, c'est l'autolysat «F2», moins fortement protéolysé que les autolysats «F1» ou «F3» qui a l'effet activateur maximum sur la vitesse de transformation de l'acide malique aussi bien à pH 3,5 qu'à 4,5 dans un milieu sans alcool. L'effet activateur augmente lorsque la concentration de l'autolysat dans le milieu est elle-même plus élevée.

Une étude plus approfondie de la souche de *L. oenos* B montre qu'en présence d'éthanol, c'est toujours le même autolysat «F2», moyennement dégradé, qui stimule le plus fortement l'activité malolactique et ceci est particulièrement vrai lorsque les conditions du milieu deviennent très limitantes, c'est à dire lorsqu'il y a un effet conjugué de l'éthanol et d'une faible valeur de pH.

Ainsi dans des conditions de milieu proches du vin (pH 3,5, 10—12 % d'éthanol) l'autolysat «F2» semble lever plus rapidement l'inhibition de la dégradation de l'acide L-malique par la souche de *L. oenos* B. Ce phénomène n'est pas dû à une meilleure croissance des bactéries lactiques puisque celle-ci est supérieure en présence de l'autolysat «F1» plus fortement protéolysé que l'autolysat «F2». C'est plutôt la qualité de l'azote apporté qui jouerait un rôle: l'autolysat «F2» est le plus riche en peptides et certains de ces composés, même présents en petite quantité pourraient avoir un effet stimulant vis-à-vis de l'activité malolactique des bactéries (9).

Conclusion

L'état de dégradation des autolysats de levures est variable selon leur mode de préparation. Selon leur degré de protéolyse, les autolysats ont un effet plus ou moins stimulant vis-à-vis de la croissance des bactéries lactiques isolées du vin et vis-à-vis de leur activité malolactique; cet effet est cependant étroitement lié d'une part à la souche de bactérie lactique testée et d'autre part aux conditions de culture: pH, teneur en éthanol.

Les autolysats de levures peuvent avoir ainsi les actions suivantes:

- activateurs seulement de la croissance bactérienne,
- activateurs seulement de la dégradation de l'acide L-malique par les bactéries lactiques.

Cette étude nous a permis de confirmer le rôle essentiel des composés azotés sur la dégradation de l'acide L-malique par les bactéries lactiques isolées du vin. Celles-ci peuvent fonctionner comme une simple préparation enzymatique, c'est à dire posséder en présence de certaines fractions azotées une forte activité catabolique vis-à-vis de l'acide L-malique, sans pour autant se développer dans le milieu de culture.

Pour préciser ce phénomène il sera intéressant d'étudier de manière plus approfondie la teneur et la nature des composés azotés assimilés par les bactéries pendant la fermentation malolactique et de déterminer notamment la structure de certaines fractions oligopeptidiques qui semblent jouer un rôle activateur particulièrement important soit sur la croissance de ces bactéries, soit sur leur activité métabolique.

Résumé

Les autolysats de levures étudiés présentent des degrés de protéolyse très différents. Leur influence est très importante au niveau de la croissance et de l'activité malolactique des quatre souches de bactéries lactiques isolées du vin (*Lactobacillus hilgardii*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc oenos* 44—40 et *Leuconostoc oenos* B); cette action, plus ou moins stimulante, est fonction de la souche testée mais fonction également des conditions de culture (pH, teneur en éthanol).

Bibliographie

1. BIDAN, P.; 1956: Sur quelques bactéries isolées de vin en fermentation malolactique. Ann. Technol. Agric. 5, 597—614.
2. — —; 1967: Les facteurs de croissance des bactéries lactiques du vin. 2^{me} Symp. Intern. Oenol., Bordeaux — Cognac, 13—17. 6. 1967. Fermentations et vinification, Vol. 1, 195—213.
3. BRÉCHOT, P.; CHAUVET, J.; CROSON, M.; 1974: Influence de la concentration initiale de l'acide malique des moûts sur le déclenchement et l'évolution de la fermentation malolactique. Ann. Technol. Agric. 23, 411—420.
4. CARRE, E.; 1982: Recherches sur la croissance des bactéries lactiques en vinification. Désacidification biologique des vins. Thèse de 3^{ème} cycle, Univ. Bordeaux II.
5. CHAUVET, J.; BRÉCHOT, P.; DUBOIS, C.; DUPUY, P.; DORANGE, J. L.; 1982: Stimulation de la croissance dans le vin d'une flore malolactique par les acides malique et citrique. Sci. Aliment. 2, 495—504.
6. — —; — —; DUPUY, P.; DUBOIS, C.; 1980: Les acides malique et citrique peuvent-ils être les substrats permettant la croissance des bactéries malolactiques dans les vins? C. R. Acad. Agricult. France 66, 1174—1180.
7. CIOLFI, B.; 1982: Contribution à l'étude de la nutrition azotée des bactéries lactiques du vin. Mém. D.E.A., Lab. Oenol., Univ. Dijon.
8. DUPUY, P.; MELAMED, N.; 1959: La croissance de *Lactobacillus arabinosus* dans le jus de raisin. Influence du pH, de l'éthanol et d'un hydrolysats tryptique. 84^e Congr. Soc. Sav., Dijon, 263—274.
9. FEULLAT, M.; BIDAN, P.; ROSIER, Y.; 1977: Croissance des bactéries lactiques à partir des principaux constituants azotés du vin. Ann. Technol. Agric. 26, 435—447.
10. — —; BRILLANT, G.; ROCHARD, J.; 1980: Mise en évidence d'une production de protéases exocellulaires par les levures au cours de la fermentation alcoolique. Connaiss. Vigne Vin 14, 37—52.
11. — —; GUILLOUX-BENATIER, M.; GERBAUX, V.; 1984: Essais d'activation de la fermentation malolactique dans les vins. Sci. Aliment. (à paraître).
12. KUENSCH, U.; TEMPERLI, A.; MAYER, K.; 1974: Conversion of arginine to ornithine during malo-lactic fermentation in red Swiss wine. Amer. J. Enol. Viticult. 25, 191—193.
13. LAFON-LAFOURCADE, S.; 1970: Etude de la dégradation de l'acide L-malique par les bactéries lactiques non proliférantes isolées du vin. Ann. Technol. Agric. 19, 141—154.
14. — —; 1975: L'histamine des vins. Connaiss. Vigne Vin 2, 103—115.
15. — —; CARRE, E.; LONVAUD-FUNEL, A.; RIBÉREAU-GAYON, P.; 1983: Induction de la fermentation malolactique des vins par inoculation d'une biomasse industrielle congelée de *Leuconostoc oenos* après réactivation. Connaiss. Vigne Vin 17, 55—71.
16. — —; DOMERCQ, S.; PEYNAUD, E.; 1968: Etude de l'ensemencement des vins par les bactéries de la fermentation malolactique. Connaiss. Vigne Vin 2, 83—97.
17. LÜTHI, H.; VETSCH, U.; 1959: Contributions to knowledge of the malolactic fermentation in wines and ciders. II. The growth promoting effect of yeast extract on lactic acid bacteria causing malolactic fermentation in wines. J. Appl. Bacteriol. 22, 384—391.
18. MOORE, S.; STEIN, H. W.; 1951: Aminoacid determination, methods and techniques. J. Biol. Chem. 192, 663—670.
19. PEYNAUD, E.; LAFON-LAFOURCADE, S.; DOMERCQ, S.; 1965: Besoins nutritionnels de soixante-quatre souches de bactéries lactiques isolées de vins. Bull. O.I.V. 38, 945—958.

20. PILONE, G. J.; KUNKEE, R. E.; 1976: Stimulatory effect of malo-lactic fermentation on the growth rate of *Leuconostoc oenos*. Appl. Environ. Microbiol. **32**, 405—408.
21. RADLER, F.; 1967: Etude microbiologique des bactéries de la fermentation malolactique. Connaiss. Vigne Vin **1**, 73—91.
22. RIBÉREAU-GAYON, J.; PEYNAUD, E.; RIBÉREAU-GAYON, P.; SUDRAUD, P.; 1975: Sciences et Techniques du Vin. Tome **2**, 386. Dunod éditeur, Paris.

Eingegangen am 9. 7. 1984

M. GUILLOUX-BENATIER
Assistante
Laboratoire d'Oenologie
Faculté des Sciences
Campus Mirande
B.P. 138
21 100 Dijon
France