

Activités enzymatiques: glycosidases et peptidase chez *Leuconostoc oenos* au cours de la croissance bactérienne. Influence des macromolécules de levures

par

M. GUILLOUX-BENATIER, H. S. SON, S. BOUHIER et M. FEULLAT

Université de Bourgogne, Institut Universitaire de la Vigne et du Vin, Dijon, France

Résumé : Les macromolécules d'origine pariétale (polysaccharides et protéines) libérées après autolyse de *Saccharomyces cerevisiae* stimulent fortement le développement de *L. oenos* en milieu synthétique. Ceci se traduit par un raccourcissement de la phase de latence et par une augmentation de la biomasse formée. Différentes activités enzymatiques (α -D et β -D-glycosidases, N-acétyl- β -D-glycosaminidase, peptidase), mesurées sur cellules entières de *L. oenos*, augmentent significativement dès la phase de latence lorsque les bactéries sont cultivées en présence de ces macromolécules de levures. Les déterminations du pH optimum et de la température optimale des trois osidases, pariétales pour l' α -D-glycosidase et la β -D-glycosidase et endocellulaire ou périsplasmique pour la N-acétyl- β -D-glycosaminidase, montrent que *L. oenos* possède un équipement enzymatique fonctionnel au pH du vin et aux températures de conservation du vin capable d'hydrolyser partiellement les macromolécules de levures, naturellement présentes en fin de fermentation alcoolique dans le milieu.

Osidasic and peptidasic activities in *Leuconostoc oenos* during bacterial growth. Influence of macromolecules of yeasts

Summary : Cell-wall polysides and proteins liberated by *Saccharomyces cerevisiae* after autolysis stimulated the growth of *Leuconostoc oenos* in a synthetic environment by a shortening of the latence period and a marked increase of bacterial biomass. Activities of α -D and β -D-glycosidases, N-acetyl- β -D-glycosaminidase and peptidase, in whole cells of *L. oenos*, increased from the latence period on lactic acid bacteria cultivated with these macromolecules. Temperature optima and pH optima of cell-wall bound α - and β -glucosidases and of soluble N-acetyl- β -glucosaminidase, indicated that *L. oenos* is able to hydrolyse partially the yeast's macromolecules present in the wine at the end of alcoholic fermentation.

Key words : *Leuconostoc oenos*, osidases, peptidase, macromolecules of yeasts.

Introduction

L'addition au vin d'écorces ou de broyats de levures (LONVAUD-FUNEL, *et al.* 1985; GUILLOUX-BENATIER et FEULLAT 1991) améliore nettement la fermentescibilité malolactique. Pour certains auteurs (EDWARDS et BEELMAN 1987; PARASKEVOPOULOS 1988), ceci serait dû pour une large part à une détoxification du milieu par adsorption de certains acides gras, présents dans le vin et inhibiteurs des bactéries, sur les macromolécules de nature glucidique ou protéique des écorces de levures.

Cependant, un autre mode d'action, d'ordre nutritionnel, peut être envisagé puisqu'il a été montré que pour certains vins les teneurs en sucres réducteurs (COSTELLO *et al.* 1985) et en certains acides aminés (DAVIS *et al.* 1986) augmentent après la fermentation malolactique. L'hydrolyse de polysaccharides et de protéines du vin par les bactéries pourrait expliquer ce phénomène, même si aucune activité protéasique n'a encore été mise en évidence chez les bactéries du vin (DAVIS *et al.* 1988).

Au cours de cette étude, nous avons préparé des macromolécules levuriennes présentes naturellement dans le vin en fin de fermentation alcoolique et constituées essentiellement de sucres et de protéines. Nous avons testé l'influence de ces macromolécules sur la croissance de *L. oenos* en milieu synthétique et sur différentes activités enzymatiques de cette bactérie mises en évidence qualitativement par CAVIN (1988): α -D et β -D-glucosidases, N-acétyl- β -D-glucosaminidase et peptidase, puis nous avons déterminé les caractéristiques de fonctionnement de ces activités enzymatiques.

Matériels et méthodes

1. Bactéries et milieux de culture: *L. oenos* D11, sélectionnée par le Laboratoire d'œnologie de l'Université de Bourgogne (GUILLOUX-BENATIER et GERBAUX 1987), est commercialisée par œnofrance sous le nom de «Malolactine O». Elle est cultivée à 25 °C dans un milieu totalement synthétique (LONVAUD-FUNEL 1986). Selon les besoins de l'expérience, ce milieu a été utilisé tel quel ou a fait l'objet de modifications qui seront précisées au niveau des résultats: pH, teneurs en sucres, addition de macromolécules en solution aqueuse après filtration stérile sur membrane Millipore 0,2 μ m.

La croissance bactérienne est suivie soit par numération sur milieu gélosé FT80 (CAVIN 1988), soit par la mesure de la densité optique à 600 nm du milieu de culture à l'aide d'un spectrophotomètre Corning 253. Une unité de densité optique équivaut à $1,6 \cdot 10^9$ unités formant colonies par ml (UFC/ml) et à 0,5 mg de biomasse sèche par ml.

2. Macromolécules de levures: Les macromolécules de levures localisées dans les parois sont recueillies après autolyse de 48 h de levures sèches (*S. cerevisiae*: souche «Levuline BRG» var. *cerevisiae* et souche «Uvaferm BC» var. *bayanus*) selon la technique utilisée par FEULLAT *et al.* (1989), puis par précipitation à l'éthanol du surnageant (USSEGLIO-TOMASSET 1976) et séchage à l'éther. Elles sont constituées de 95 à 98 % d'oses totaux (dosage par DUBOIS *et al.* 1956) et de 0,5 à 4 % de protéines (dosage par LOWRY 1951). Il s'agit essentiellement de mannoprotéines ou de peptidomanannes (FREYSSINET 1988).

3. Récolte et broyage des bactéries: Les cellules sont séparées de leur milieu de culture par centrifugation (20 min à 6500 g à 5 °C), puis lavées deux fois de suite avec NaCl 155 mM. Pour le broyage, les cellules sont reprises dans NaCl 155 mM à une concentration d'environ 2 mg de cellules (poids sec) par ml et soumises aux ultra-sons (Vibra Cell Sonics Materials) pendant 3 min selon la technique de TOURDOT-MARÉCHAL (1991).

4. Mesure de l'activité peptidasique — la méthode utilisée dérive de celle de SOMVILLE et BILLEN (1983): A 2 ml de suspension bactérienne reprise après lavage dans un tampon stérile pH 7 (KH_2PO_4 0,1 M, NaOH 0,1 M), on rajoute 100 μ l d'une solution alcoolique 42 mM de L-sérine β -naphthylamide. La fluorescence de la β -naphthylamine, produite après hydrolyse de la liaison peptidique, est mesurée sur 40 min à l'aide d'un Aminco-Fluoro-Colorimeter. L'activité peptidasique (répétabilité 5 %) est exprimée en unité d'activité ($U = \mu$ mole de β -naphthylamine apparue par min) par gramme de bactéries sèches (Km expérimental = 0,42 mM, SON 1990).

5. Mesure des activités α -D et β -D-glucosidases et N-acétyl- β -D-glucosaminidase

5.1 par fluorescence — la méthode utilisée dérive de celle de SOMVILLE (1984): A 2 ml de suspension bactérienne reprise après lavage dans un tampon stérile pH 7,5

(KH_2PO_4 0,1 M, NaOH 0,1 M), on rajoute 50 μl d'une solution aqueuse 61,5 μM du 4-méthylumbelliferyl glucoside correspondant. La fluorescence de la 4-méthylumbelliférone (4MU) produite par hydrolyse enzymatique du substrat est mesurée sur 40 min à l'aide d'un Aminco-Fluoro-Colorimeter. Les activités osidasiques (répétabilité 7 %) sont exprimées en unité d'activité ($U = \text{nmole}$ de 4MU apparue par min) par gramme de bactéries sèches (K_m expérimental = 0,14 μM pour 4MU α G, 0,06 μM pour 4MU β G et 0,08 μM pour 4MU Nacétyl β G, SON 1990).

5.2. *par colorimétrie* — la méthode est celle décrite par BLONDIN *et al.* (1983): Les substrats utilisés sont les glycosides correspondants du p-nitrophénol (pNP): pNP α G, pNP β G et pNPN-acétyl- β G qui libèrent après hydrolyse enzymatique du pNP coloré en jaune en milieu alcalin. Cette méthode a été utilisée pour déterminer le pH optimum et la température optimale des trois osidasas.

Résultats et discussion

1. Stimulation de la croissance de *Leuconostoc oenos* en milieu synthétique par addition de macromolécules de levures: L'effet des macromolécules de «Levuline BRG» est testé vis-à-vis de *L. oenos* dans milieu synthétique enrichi en glucose et fructose à 2,5 g/l. L'addition des macromolécules favorise très nettement la multiplication bactérienne; après 4 d de culture, la biomasse formée est supérieure d'un facteur 2 pour le milieu à pH 4,5 (pH optimum de croissance): 0,384 pour 0,187 mg/ml et d'un facteur 1,9 pour le milieu à pH 3,5 (pH limitant): 0,053 pour 0,028 mg/ml.

La croissance de *Leuconostoc oenos* a été suivie dans le milieu de culture à pH 3,5 enrichi ou non en sucres réducteurs et additionné ou non de macromolécules de «Uvaferm BC» à la dose de 1 g/l (Fig. 1). Conformément à d'autres résultats (PILONE et KUNKEE 1972), on observe qu'une augmentation de la concentration en sucres réducteurs du milieu permet une plus forte multiplication bactérienne; la biomasse formée dans le milieu à 2,5 g/l de glucose et fructose est supérieure d'un facteur 3 à celle formée dans le milieu ne contenant que 0,1 g/l de glucose et fructose.

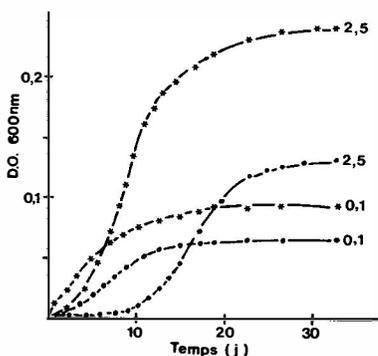


Fig. 1: Evolution de la population bactérienne dans deux milieux de culture contenant 0,1 g/l ou 2,5 g/l de sucres réducteurs, en présence ou en l'absence de macromolécules de levures «Uvaferm BC».

Evolution of bacterial population over time in two culture media with 0.1 g/l or 2.5 g/l of reducing sugars in the absence or in the presence of macromolecules of *S. cerevisiae* 'Uvaferm BC'.
 ● —● without macromolecules; * —* with macromolecules (1 g/l).

Cependant, dans ces deux milieux, la présence des macromolécules de levures influence significativement le développement de *L. oenos*. On observe d'une part un raccourcissement très net de la phase de latence lorsque les bactéries sont cultivées en présence des macromolécules et d'autre part une biomasse formée également plus importante.

2. Mise en évidence d'activités osidasiques et peptidasique au cours de la croissance: Les bactéries sont cultivées sur le milieu contenant 2,5 g/l de glucose et de fructose à pH 4,5, additionné ou non de macromolécules de «Levuline» BRG à 0,4 g/l (Figs. 2 a et 2 b).

Pour le milieu témoin, les activités α -glucosidasique, β -glucosidasique et N-acétyl- β -glucosaminidasique sont présentes chez *L. oenos* dès le début de la phase exponentielle de croissance. Elles augmentent significativement pendant la période de croissance puis elles diminuent ensuite régulièrement jusqu'à des valeurs très faibles durant la phase stationnaire. L'activité β -glucosidasique est supérieure d'environ un facteur 2 aux activités α -glucosidasique et N-acétyl- β -glucosaminidasique tout au long de la culture bactérienne.

Aucune activité peptidasique, mesurée sur la L-sérine β -naphthylamide n'est détectable pendant la phase de latence. Cette activité enzymatique n'apparaît que pendant la phase exponentielle de multiplication des bactéries lactiques et présente un maximum en fin de phase exponentielle de croissance. On observe ensuite une diminution rapide de l'activité pendant la phase stationnaire. L'activité peptidasique apparaît beaucoup plus importante chez *L. oenos* (3 μ moles de Napht/min/g) que les trois activités osidasiques mesurées (0,6—8,1 et 3,9 nmoles de 4MU/min/g).

Pour le milieu supplémenté en macromolécules, on remarque dès le deuxième jour de culture une nette induction des trois osidasases testées ainsi qu'une augmentation de l'activité peptidasique contrairement à PARASKEVOPOULOS (1988) qui n'avait observé que l'induction de l'activité N-acétyl- β -glucosaminidasique chez *L. oenos* en présence d'écorces de levures. Dans le milieu témoin, nous n'avons pu mettre, en effet, en évidence qu'une faible activité β -glucosidasique de *L. oenos* alors que dans le milieu contenant les macromolécules de levures on retrouve les trois activités osidasiques et l'activité peptidasique à des valeurs élevées.

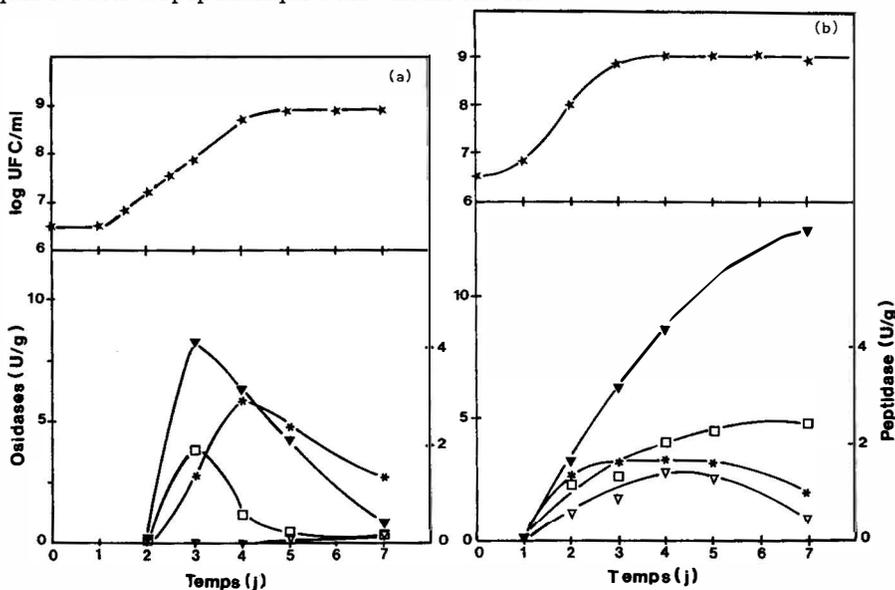


Fig. 2: Activités enzymatiques au cours de la croissance bactérienne en l'absence (a) ou en présence de macromolécules de levures à 0,2 g/l (b).

Enzymatic activities during bacterial growth in the absence (a) or in the presence of macromolecules of yeasts at 0.2 g/l (b). ∇ : α -glucosidase; \blacktriangledown : β -glucosidase; \square : N-acetyl- β -glucosaminidase; *: peptidase.

Pour les trois osidasas, les activités, mesurées au cours de la croissance bactérienne, restent plus élevées dans le milieu de culture contenant les macromolécules que dans le témoin. De plus, les activités β -glucosidasique et N-acétyl- β -glucosaminidasique se maintiennent pendant la phase stationnaire. Par contre, la biosynthèse de l'activité peptidasique est maximale et supérieure sur le milieu supplémenté en macromolécules levuriennes seulement pendant la phase exponentielle de croissance de *L. oenos*.

3. Caractérisation des activités α - et β -glucosidasas et N-acétyl- β -glucosaminidase de *Leuconostoc oenos*: Après récolte des bactéries en fin de phase exponentielle de croissance, nous avons déterminé par fluorescence les activités osidasiques sur la suspension bactérienne en l'état, sur la même suspension, après filtration de celle-ci sur membrane Millipore 0,2 μ m ou après autoclavage (15 min à 115 °C). Les échantillons autoclavés ne présentent aucune des trois activités osidasiques mesurées; la libération de 4MU observée sur la suspension brute est donc entièrement d'origine enzymatique. L'absence d'activité enzymatique vis-à-vis de 4MU α G, 4MU β G et 4MU Nacétyl β G dans les filtrats à 0,22 μ m indique que les trois osidasas sont cellulaires ou liées aux enveloppes bactériennes.

Les cellules récoltées en fin de phase exponentielle de croissance ont alors été broyées. L'activité enzymatique vis-à-vis des trois glycosiles du p-nitrophénol a été déterminée sur l'extrait brut, puis après centrifugation de celui-ci (30 min à 10 000 g à 4 °C) sur le culot et sur le surnageant obtenus (Tableau). Pour l' α -glucosidase et la β -glucosidase, on retrouve respectivement 70 et 90 % de l'activité mesurée à partir de l'extrait brut dans le culot de centrifugation; ces enzymes sont donc pariétales. Pour la N-acétyl- β -glucosaminidase, 90 % de l'activité est retrouvée dans le surnageant, ce qui indique que l'enzyme est endocellulaire ou périplasmique.

Tableau

Activités osidasiques (μ moles pNP/min/ml) mesurées après broyage des bactéries sur l'extrait brut et après centrifugation de celui-ci sur le culot et sur le surnageant

Osidasic activities (μ moles pNP/min/ml) of *Leuconostoc oenos* measured on sonicated cells on the crude extract and after his centrifugation (pellet and supernatant)

	α -glucosidase	β -glucosidase	N Acétyl- β -glucosaminidase
Extrait brut	19,6	1,40	0,57
Culot	13,7	1,25	0
Surnageant	5,0	0,05	0,50

Les déterminations du pH optimum et de la température optimale pour les trois activités osidasiques ont été ensuite réalisées sur des bactéries récoltées en fin de phase exponentielle de croissance. Les cinétiques ont été effectuées avec un tampon citrate de MCLVAINE sur des cellules entières d'abord à une température fixe de 20 °C dans une gamme de pH de 3 à 8, puis au pH optimal de l'activité testée dans une gamme de température allant de 15 °C à 55 °C (Fig. 3).

L'optimum d'activité est obtenu à pH 6,0 et à 40 °C pour l' α -glucosidase, à pH 4,0 et à 35 °C pour la β -glucosidase et à pH 4,0 et à 20 °C pour la N-acétyl- β -glucosaminidase. L'énergie d'activation thermique est estimée à 26 kJoules/degré/mole pour l' α -glucosidase et la β -glucosidase et à 40 kJoules/degré/mole pour la N-acétyl- β -glucosaminidase. A pH 3,5, pH moyen du vin, ces bactéries possèdent encore 27 % de l'activité maximale pour l' α -glucosidase, 78 % pour la β -glucosidase et 80 % pour la

N-acétyl- β -glucosaminidase. A 15 °C, température de conservation du vin, les bactéries possèdent encore 28 % de l'activité maximale pour l' α -glucosidase, 48 % pour la β -glucosidase et 71 % pour la N-acétyl- β -glucosaminidase.

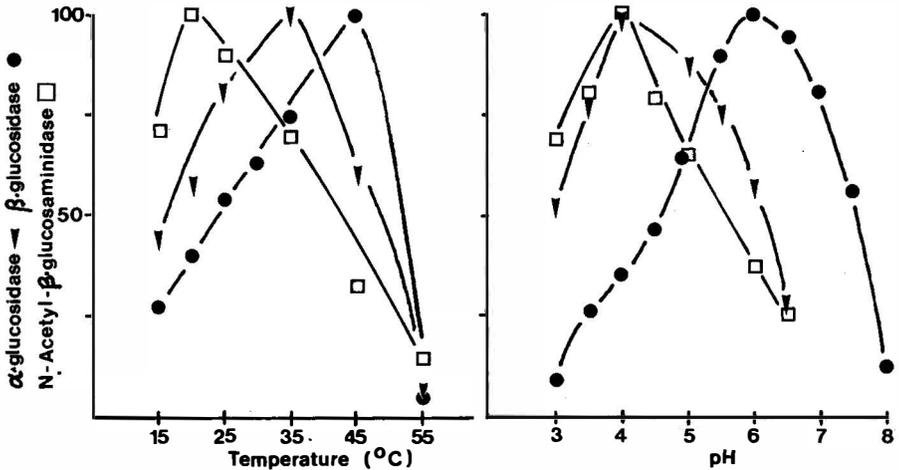


Fig. 3: Influence de la température et du pH sur les activités α -glucosidase, β -glucosidase et N-acétyl- β -glucosaminidase de *Leuconostoc oenos*. Les chiffres (% d'activité maximale) correspondent à la moyenne des résultats obtenus pour deux expériences indépendantes en présence de 5 mM des différents glycosiles du pNP.

Influence of temperature and of pH on α -glucosidase and N-acetyl- β -glucosaminidase activities of *Leuconostoc oenos*. Values (% of maxima activity) means of two independent experiments after addition of 5 mM pNP α G, pNP β G and pNPN-acetyl- β G.

Les macromolécules de levures pourraient donc être dans le vin hydrolysées partiellement par des bactéries appartenant à l'espèce *L. oenos* et leurs produits de dégradation, en enrichissant le milieu en facteurs nutritifs (sucres simples, peptides ou acides aminés), permettraient ainsi une meilleure croissance bactérienne.

Bibliographie

- BLONDIN, B.; RATOMAHENINA, R.; ARNAUD, A.; GALZY, P.; 1983: Purification and properties of the β -glucosidase of a yeast capable of fermenting cellobiose to ethanol: *Dekkera intermedia*. *Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **17**, 1–6.
- CAVIN, J. F.; 1988: Etude de la flore lactique des vins et de la fermentation malolactique. Aspects physiologiques et technologiques. Thèse Univ. de Bourgogne, Dijon, France.
- COSTELLO, P. J.; MONK, P. R.; LEE, T. H.; 1985: An evaluation of two commercial *Leuconostoc oenos* strains for induction of malolactic fermentation under winery conditions. *Food Technol. Austral.* **37** (1), 21–33.
- DAVIS, C. R.; WIBOWO, D.; FLEET, G. H.; LEE, T. H.; 1988: Properties of wine lactic acid bacteria: Their potential enological significance. *Amer. J. Enol. Viticult.* **39**, 137–142.
- — —; LEE, T. H.; FLEET, G. H.; 1986: Growth and metabolism of lactic acid bacteria during and after malolactic fermentation of wines at different pH. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 539–545.
- DUBOIS, M.; GILLESK, A.; HAMILTON, J. J.; REBERS, H.; SMITH, F.; 1956: Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Ann. Chem.* **28**, 350–356.

- EDWARDS, C. G.; BEELMAN, R. B.; 1987: Inhibition of the malolactic bacterium *Leuconostoc oenos* (PSU-1) by decanoic acid and subsequent removal of the inhibition by yeast ghosts. *Amer. J. Enol. Viticult.* **38**, 239—242.
- FEUILLAT, M.; FREYSSINET, M.; CHARPENTIER, C.; 1989: L'élevage sur lies des vins blancs de Bourgogne. II. Libération des macromolécules: polysaccharides et protéines. *Vitis* **28**, 161—176.
- FREYSSINET, M.; 1988: Etudes des mécanismes de libération des constituants intracellulaires et pariétaux au cours du processus d'autolyse chez *S. cerevisiae*. Thèse Univ. de Bourgogne, Dijon, France.
- GUILLOUX-BENATIER, M.; FEUILLAT, M.; 1991: Utilisation d'adjuvants d'origine levurienne pour améliorer l'ensemencement des vins en bactéries lactiques sélectionnées. *Rev. Franç. Oenol.* (132), 51—55.
- — ; GERBAUX, V.; 1987: Contrôle de la fermentation malolactique dans les vins de Bourgogne. Sélection et mise en oeuvre de nouvelles souches de bactéries lactiques. *Rev. Franç. Oenol.* (108), 43—51.
- LONVAUD-FUNEL, A.; 1986: Recherche sur les bactéries lactiques du vin. Fonctions métaboliques. Croissance. Génétique plasmidique. Thèse Univ. de Bordeaux II, France.
- — ; DESENS, C.; JOYEUX, A.; 1985: Stimulation de la fermentation malolactique par l'addition au vin d'enveloppes cellulaires de levure et différents adjuvants de nature polysaccharidique et azotée. *Connaiss. Vigne Vin* **19**, 229—240.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, L. A.; RANDALL, R. J.; 1951: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265—275.
- PARASKEVOPOULOS, Y.; 1988: Utilisation des enveloppes cellulaires de levure pour la stimulation de la fermentation malolactique. Interprétation de leur mode d'action. Thèse Univ. de Bordeaux II, France.
- PILONE, G. J.; KUNKEE, R. E.; 1972: Characterization and energetics of *Leuconostoc oenos* ML34. *Amer. J. Enol. Viticult.* **23**, 61—70.
- SOMVILLE, M.; BILLEN, G.; 1983: A method for determining exoproteolytic activity in natural waters. *Limnol. Oceanogr.* **28** (1), 190—193.
- SOMVILLE, M.; 1984: Measurement and study of substrate specificity of exoglucosidase activity in eutrophic water. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**, 1181—1185.
- SON, H. S.; 1990: Influence des macromolécules sur la croissance des bactéries lactiques du vin. Mesures des activités enzymatiques des bactéries lactiques et des levures de vinification. DEA Ampélogie Oenologie, Univ. de Bourgogne, Dijon, France.
- TOURDOT-MARECHAL, R.; 1991: Etude du métabolisme de l'acide malique chez *Leuconostoc oenos*. Thèse Univ. de Bourgogne, Dijon, France.
- USSEGLIO-TOMASSET, L.; 1976: Les colloïdes glucidiques solubles des moûts et des vins. *Connaiss. Vigne Vin* **10**, 193—226.

Reçu le 2 Juillet 1992