

## ÉTUDE DE LA CONSTITUTION LIPIDIQUE DES MEMBRANES DE BACTÉRIES LACTIQUES UTILISÉES EN VINIFICATION

Catherine DESENS et Aline LONVAUD-FUNEL

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

### INTRODUCTION

Des résultats récents (LONVAUD-FUNEL, 1987) ont démontré que l'éthanol, formé par les levures pendant la fermentation alcoolique principale n'est pas le seul inhibiteur des bactéries lactiques du vin. Les acides gras agissent aussi, en synergie avec l'alcool. L'effet toxique de ces substances sur l'activité malolactique des bactéries entières est interprété comme une altération progressive de la membrane bactérienne.

Plusieurs études ont par ailleurs permis de corrélérer la tolérance à l'alcool et la constitution des membranes de plusieurs espèces de microorganismes. Chez les bactéries lactiques les plus résistantes à l'alcool, lactobacilles isolés de saké, la constitution en acides gras est inhabituelle, incluant des acides gras à chaîne carbonée supérieure à 20 atomes (INGRAM, 1986). Chez *Escherichia coli*, les membranes des cellules cultivées sur milieu alcoolisé sont plus rigides et le rapport lipides/protéines est inférieur à celui des cellules témoin. La régulation de ce rapport pourrait être une réponse de l'adaptation à la croissance en présence d'éthanol (DOMBEK, 1984).

Chez *Zymomonas mobilis*, bactérie utilisée dans la production industrielle d'éthanol, la majorité des lipides neutres est constituée d'hopanoïdes qui joueraient un rôle important dans l'organisation de la membrane (BARROW, 1983). Ces molécules pentacycliques ont été identifiées chez de nombreux procaryotes et peuvent être considérées comme les analogues des stérols des eucaryotes (ROHMER, 1984). La stabilité et la perméabilité des membranes de *Zymomonas mobilis* en fonction de l'éthanol et de la température sont régulées par des variations de concentration des hopanoïdes et des acides gras (BRINGER, 1985; SCHMIDT, 1986). Il en est de même chez *Bacillus acidocaldarius* où la température et le pH jouent le même rôle (PORALLA, 1984).

Le stade de croissance des bactéries intervient aussi : chez *Streptococcus*, la quantité de lipides atteint le maximum au début de la phase stationnaire. Les proportions des phospholipides et des lipides neutres diminuent ensuite ; les glycolipides évoluent en sens inverse (CHIU, 1979).

La structure lipidique de la membrane joue donc un rôle primordial dans la tolérance et l'adaptation des bactéries à leur milieu. Elle pourrait expliquer la difficulté de

croissance des bactéries lactiques dans le vin et de l'implantation des levains lactiques industriels. C'est pourquoi nous abordons l'étude de la constitution lipidique des membranes des bactéries lactiques du vin.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### I — CULTURE DES BACTÉRIES

Les bactéries utilisées sont des préparations industrielles lyophilisées, *Leuconostoc oenos* GM (Microlife Technics, Sarasota, Floride) et *Lactobacillus plantarum* CHL (Chr. Hansen's Lab., Copenhague). Elles sont cultivées à 25° C dans un milieu contenant par litre : extrait de levure (Difco) 5 g, bactotryptone (Difco) 5 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 g, citrate de sodium diammonique 2 g, acétate de sodium 2 g, D-L malate 8 g,  $\text{MnSO}_4$  0,05 g,  $\text{MgSO}_4$  0,2 g, D-glucose 5 g. La croissance est suivie par mesure de la densité optique au spectrophotomètre à 600 nanomètres.

### II — EXTRACTION ET CHROMATOGRAPHIE DES LIPIDES

Les bactéries sont récoltées par centrifugation (3000 g, 15 min) et lavées par une solution de NaCl 0,1 M. Le culot (100 à 200 mg de cellules fraîches) est soumis à trois extractions successives d'une heure à 70° C par un mélange de méthanol:chloroforme 1/1 et 1/2 puis par du chloroforme seul. Une dernière extraction par du méthanol chlorhydrique permet de s'assurer que tous les lipides ont été extraits. Après démixion selon les conditions de BLIGH et DYER (1959) la phase chloroformique est prélevée et lavée trois fois par une solution de NaCl 1 M. L'extrait propre est évaporé, pesé et repris par un volume adéquat de chloroforme. Une sonication des cellules avant l'extraction n'améliore pas les résultats.

Les échantillons sont déposés sur une plaque de verre recouverte de silice (10/10, Merck) avec une seringue, par un déposeur d'échantillons (Camag). Les spots longs de 8 mm sont espacés de 7 mm et distants de 1,5 cm du bord inférieur. Le premier spot est déposé à 1 cm du bord droit. Les plaques sont développées en cuve de verre présaturée 1 heure et 30 minutes respectivement par les solvants A et B (HEAPE, 1985; JUGUÉLIN, 1986). Pour des lipides polaires, le solvant A est constitué d'acétate de méthyle, n-propanol, chloroforme, méthanol, KCl aqueux (0,25 p. 100) en proportion 25/25/28/10/7. La migration est arrêtée à 2,5 cm du bord supérieur et la plaque est laissée à l'air ambiant pour sécher jusqu'à la disparition de l'odeur de solvant. On fait ensuite migrer les lipides neutres avec le solvant B constitué d'hexane, de diéthyle oxyde et d'acide acétique dans les proportions 70/30/2. Les plaques sont révélées par vaporisation avec un mélange d'acétate de cuivre et d'acide phosphorique (MACALA, 1983) puis carbonisées 30 mn à 130° C. Le phosphore, les amines et les glucides sont respectivement mis en évidence par le bleu de molybdène, la ninhydrine et l' $\alpha$ -naphthol.

Un enregistreur relié au densitomètre (Camag) traduit les densités des spots par des pics dont les abscisses correspondent au Rf des taches. La hauteur de ces pics est proportionnelle à la densité des taches. Le pourcentage de chaque classe de lipide est calculé par rapport à la somme des hauteurs des pics.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

### I — COMPARAISON DES LIPIDES DES DIFFÉRENTES CLASSES DES DEUX TYPES DE BACTÉRIES ÉTUDIÉES.

Les lipides sont repérés par le rapport de la distance de migration de la tache à celle du front de migration des solvants (Rf).

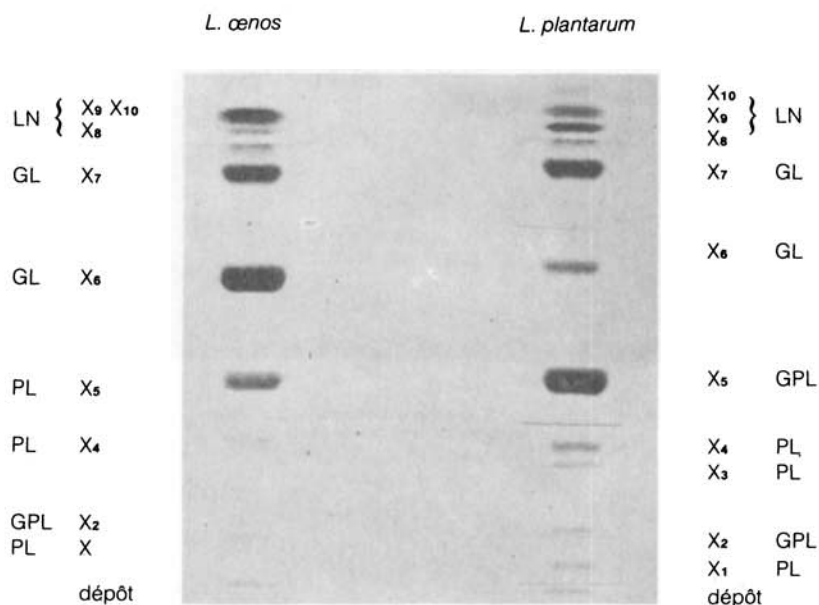


Fig. 1. — Chromatographie sur couche mince des lipides de *L. plantarum* et de *L. cænos*.

Chez le lactobacille, les constituants majeurs de chaque classe dans la plupart des phases de croissance sont X4, X5, X6 pour les phospholipides (PL) et glycolipides (GL), X8 et X9 pour les lipides neutres (LN). Chez le leuconostoc ce sont X5, X6, X7 pour PL et GL, X9 et X10 pour LN (figure 1).

### II — ÉTUDE DES LIPIDES MEMBRANAIRES DU LACTOBACILLE

#### 1°) Influence du stade de croissance sur la constitution lipidique des membranes.

Les bactéries ont été prélevées à différents moments de leur cycle cellulaire, correspondants aux stades n° 1 à 5 (figure 2).

La membrane lipidique de ce lactobacille comprend trois classes de lipides : lipides neutres, glycolipides et phospholipides. Les phosphoglycolipides sont inclus dans la classe des glycolipides.

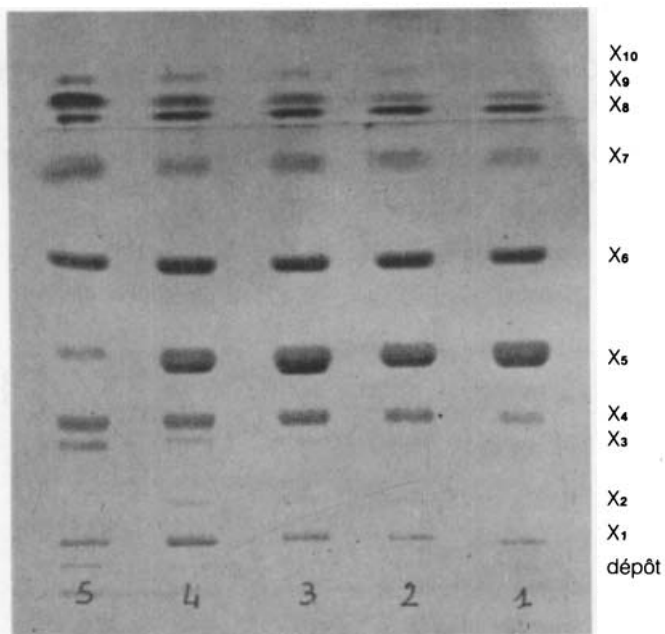


Fig. 2. — Chromatographie sur couche mince des lipides de *L. plantarum* récolté à différents stades de sa croissance.

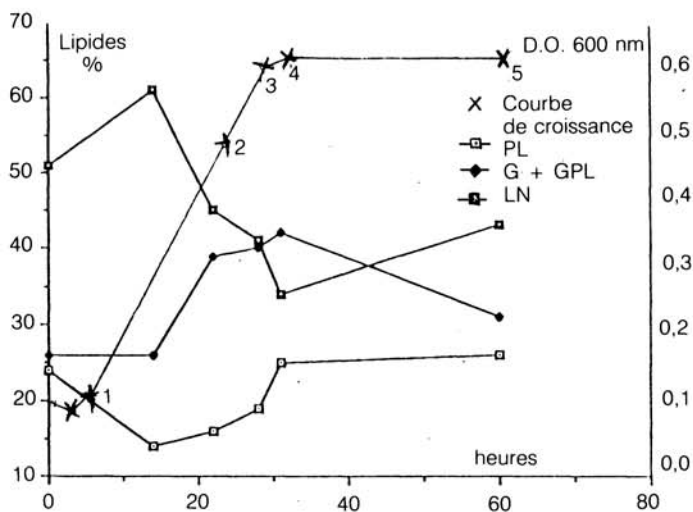


Fig. 3. — Évolution des lipides membranaires de *L. plantarum* au cours d'un cycle de croissance.

La répartition de ces trois classes change selon le stade de croissance des bactéries (figure 3). Les pourcentages de lipides neutres augmentent de 51 à 61 p. 100 en phase de latence, chutent pendant la phase exponentielle, mais varient peu en phase stationnaire. Les glycolipides évoluent en sens inverse. En fin de phase exponentielle ces deux classes, lipides neutres et glycolipides, sont en pourcentages égaux. Les phospholipides varient en moindre proportion. Leur diminution en phase de latence de 24 à 14 p. 100 est compensée en totalité pendant la phase de croissance; puis leur valeur reste stable.

## 2°) Effet de l'éthanol

Le milieu de culture est amené à 10 p. 100 d'éthanol par addition d'éthanol à 95 p. 100. La culture des bactéries en présence d'alcool a entraîné une modification de la constitution des membranes. En chromatographie sur couche mince, on note la disparition d'un phospholipide et d'un lipide neutre.

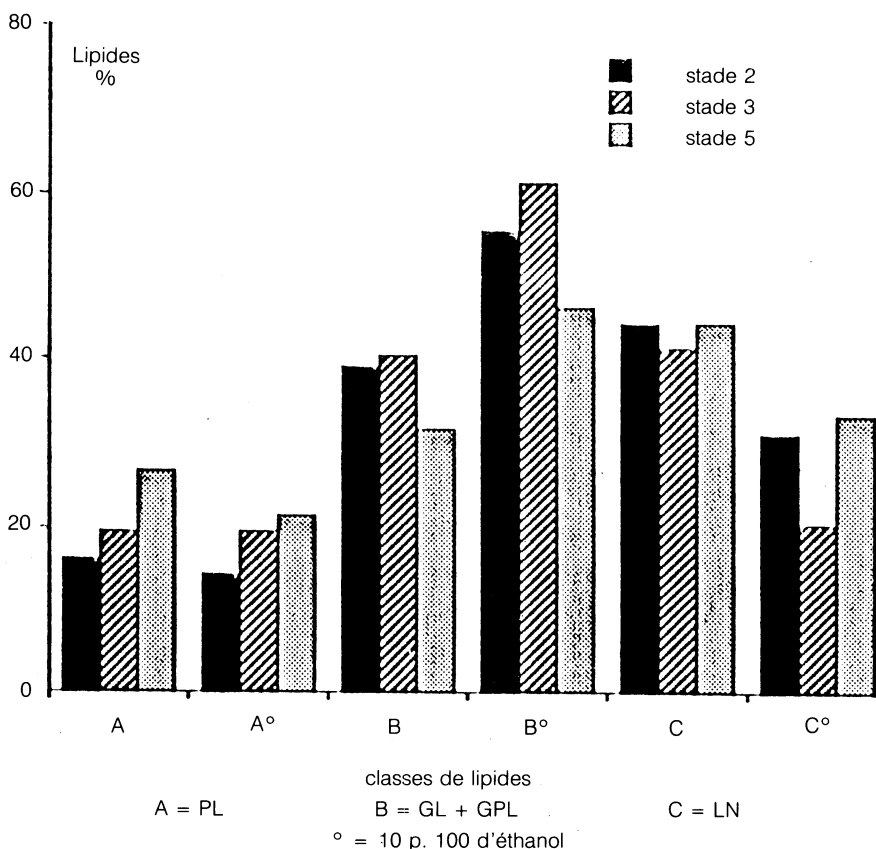


Fig. 4. — Influence de la présence d'éthanol sur les différentes classes de lipides à différents stades de la croissance de *L. plantarum*.

Globalement, la teneur en phospholipides n'est pas modifiée. Par contre celle des lipides neutres est inférieure de 25 à 50 p. 100 lorsque le milieu est alcoolisé. A l'inverse, dans ces conditions, le pourcentage des glycolipides augmente de 29 à 34 p. 100 selon les prélèvements. Les variations entraînées par la présence d'alcool sont plus accentuées pour les cellules prélevées en fin de phase exponentielle (figure 4).

### III — ÉTUDE DES LIPIDES MEMBRANAIRES DU LEUCONOSTOC

La croissance de *Leuconostoc oenos* GM dans le milieu utilisé est lente et la phase exponentielle peu marquée. Des prélèvements ont été effectués au cours de l'incubation, et les lipides membranaires analysés (figure 5).

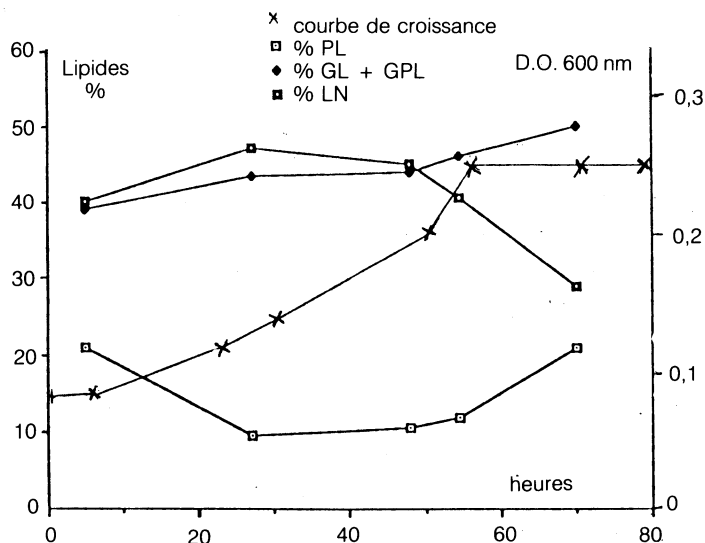


Fig. 5. — Évolution des lipides membranaires de *L. oenos* en fonction du stade de croissance.

Globalement, tout au long de la phase exponentielle, les variations enregistrées sont faibles ou nulles. Les lipides neutres et glycolipides représentent un pourcentage élevé des trois classes de lipides analysés. En phase stationnaire, les lipides neutres et phospholipides varient à l'opposé et dans les mêmes proportions.

### CONCLUSION

Les phospholipides, glycolipides et lipides neutres des membranes de bactéries lactiques ont été mis en évidence par chromatographie sur couche mince. Les deux souches utilisées pour ce travail, *Lactobacillus plantarum* et *Leuconostoc oenos* sont fondamentalement très différentes, au point de vue de leur physiologie et de leur présence dans les vins. Leurs membranes présentent globalement les mêmes classes de molécules lipidiques. Cependant, les proportions de certains phospholipides et glycoli-

pides différent. Les phosphoglycolipides représentent 20 % des lipides chez le lactobacille et seulement 5 % chez le coque.

La constitution lipidique dépend de l'état physiologique des cellules; ce résultat explique peut-être les différences d'efficacité des levains malolactiques en fonction de la durée de leur réactivation (LONVAUD-FUNEL, 1986). De même, le degré alcoolique du milieu de culture provoque des modifications de la constitution des membranes. L'incidence d'autres conditions de milieu et l'identification des lipides séparés par la méthode décrite sont actuellement à l'étude. Ces méthodes doivent permettre de rechercher une relation entre la constitution lipidique et l'activité métabolique des bactéries lactiques dans le vin.

### Remerciements

Nous remercions Monsieur Claude CASSAGNE, Professeur à l'Université de Bordeaux II, de nous avoir accueilli dans son laboratoire et de nous avoir initié aux techniques d'étude des lipides.

Manuscrit reçu le 26 octobre 1987; accepté pour publication le 10 décembre 1987.

### RÉSUMÉ

Les lipides extraits des membranes de bactéries lactiques du vin sont séparés par chromatographie sur couche mince en phospholipides, glycolipides et lipides neutres. Le pourcentage de répartition de chaque classe varie, non seulement en fonction des souches, mais aussi selon leurs conditions de culture.

### SUMMARY

Lactic and bacteria of wines are inhibited in fermenting must. Éthanol, fatty acids and other unknown yeast metabolites are responsible for the loss of viability and malolactic activity. Prior results suggest that they induce an alteration of the plasma membrane. Owing to their nature, we assume the lipid constituents to be the target of the inhibitors. So, we have undertaken the study of the membrane lipids of two strains, *L. plantarum* and *L. œnos*.

After extraction, the samples are analysed by HPTLC. Comparing the strains, the patterns reveal small differences in the distribution of phospholipids, glycolipids and neutral lipids.

Some culture factors were investigated for their influence. Within the cell cycle, the distribution of the various classes changes according to the period of incubation. If ethanol is added in the culture medium, neutral lipids decrease by 25 to 50 per cent and glycolipids increase by 30 per cent depending on the age of the culture. Phospholipids remain quite constant.

Further researches are in progress to test the influence of other factors. These results might explain the loss of viability of the bacteria varies when they are added to wine, as well as the variable response to yeast antagonism according to the strains.

### RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BARROW K.D., COLLINS J.G., ROGERS P.L. et SMITH G.M., 1983. Lipid composition of an ethanol-tolerant strain of *Zymomonas mobilis*. *Biochim. Biophys. Acta*, 753, 324-330.
- BLIGH E.G. et DYER W., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, N° 8, 911-917.

- BRINGER S., HARTNER T., PORALLA K. et SAHM H., 1985. Influence of ethanol on the hopanoid content and the fatty acid pattern in batch and continuous cultures of *Zymomonas mobilis*. *Arch. Microbiol.*, 140, 312-316.
- CHIU T. et HUNG S.A., 1979. Effect of age on the membrane lipid composition of *Streptococcus lactis*. *Biochim. Biophys. Acta.*, 558, 267-272.
- DOMBEK K.M. et INGRAM L.O., 1984. Effects of ethanol on the *Escherichia coli* plasma membrane. *J. Bacteriol.*, 157, 233-239.
- HEAPE A., JUGUÉLIN H., BOIRON F. et CASSAGNE C., 1985. Improved one-dimensional thin layer chromatographic technique for polar lipids. *J. Chromatography*, 322, 391-395.
- INGRAM L.O., 1986. Microbial tolerance to alcohols : role of the cell membrane. *Trends in Biotechnol.*, 4, N° 2, 40-45.
- JUGUÉLIN H., HEAPE A., BOIRON F. et CASSAGNE C., 1986. A quantitative developmental study of neutral lipids during myelinogenesis in the peripheral nervous system of normal and trembler mice. *Dev. Brain Res.*, 25, 249-252.
- LONVAUD-FUNEL Aline, 1987. Recherches sur les bactéries lactiques du vin : fonctions métaboliques, croissance, génétique plasmidique. *Thèse Doctorat ès-Sciences*, Université de Bordeaux II.
- ROHMER M., BOUVIER-NAVE P. et OURISSON G., 1984. Distribution of hopanoids triterpens in procaryotes. *J. Gen. Microbiol.*, 130, 1137-1150.
- PORALLA K., HÄRTNER T. et KANNENBERG E., 1984. Effect of temperature and pH on the hopanoid content of *Bacillus acidocaldarius*. *FEMS Microbiol. Letters*, 23, 253-256.