

QUELQUES OBSERVATIONS SUR LA FORMATION D'ACIDE ACETIQUE PAR LES BACTERIES LACTIQUES

S. LAFON-LAFOURCADE, V. LUCMARET et A. JOYEUX

Institut d'œnologie, Université de Bordeaux II
Institut National de la Recherche Agronomique
351, cours de la Libération, 33405 Talence Cedex (France)

En œnologie, le métabolisme bactérien a été considéré surtout du point de vue de la fermentation malolactique. Cependant, les moûts de raisins et les vins contiennent, à concentrations plus ou moins importantes, des sucres, du glycérol, de l'acide citrique et de l'acide tartrique susceptibles d'être à l'origine de la formation d'acide acétique par les bactéries lactiques.

Le sucre, à forte concentration initiale dans les moûts, favorise l'excrétion d'acide acétique levurien au cours de la fermentation alcoolique (LAFON-LAFOURCADE et RIBÉREAU-GAYON, 1977) ; on peut s'interroger sur son incidence à l'égard du métabolisme des bactéries. D'autre part, la dégradation de l'acide malique non exergonique doit obligatoirement s'accompagner de la fermentation d'une petite quantité de sucre libérant l'énergie nécessaire à la croissance bactérienne ; or, c'est le plus souvent après la fermentation malolactique qu'on relève une augmentation de l'acidité volatile (RIBÉREAU-GAYON et *al.*, 1975). BRECHOT et *al.* (1974), sur cette observation répétée, a émis l'hypothèse d'une régulation par l'acide malique du métabolisme des sucres.

Nous avons essayé de préciser, pour quelques souches, le métabolisme bactérien de l'acide acétique, en relation avec le phénomène de croissance à partir de différents substrats, présents initialement, seuls ou en mélange, dans le milieu.

MATERIELS ET METHODES

Les milieux utilisés pour les fermentations lactiques sont, soit un moût de raisin, soit un milieu synthétique (milieu de Carr) de composition suivante, par litre : acides aminés de caséine, 5 g ; extrait de levure, 4 g ; chlorure de potassium, 425 mg ; diphosphate de potassium, 550 mg ; chlorure de calcium, 125 mg ; sulfate de magnésium, 125 mg ; sulfate de manganèse, 2,5 mg ; glucose, 40 g ; ce milieu amené au pH souhaité est enrichi en fonction des besoins de l'expérimentation en différents substrats (acide malique, citrique, etc.).

Les souches de bactéries lactiques employées au cours de ce travail ont été isolées et identifiées par nos soins ou proviennent de la collection de l'Institut d'Œnologie.

Les fermentations sont conduites en anaérobiose dans des bouteilles à bouchage mécanique, d'une contenance de 500 ml.

Le dénombrement des bactéries lactiques est effectué sur un milieu nutritif solide. Sa composition est la suivante par litre : extrait de levure, 5 g ; extrait de viande, 10 g ; peptone tryptique, 15 g ; acétate de sodium, 5 g ; citrate d'ammonium, 2 g ; tween 80, 1 ml ; sulfate de manganèse, 50 mg ; sulfate de magnésium, 200 mg ; glucose, 20 mg ; le pH est amené à 5,4 ; au moment de l'utilisation le milieu est solidifié par de l'agar-agar.

Les sucres réducteurs sont dosés par la méthode G. BERTRAND.

L'éthanol, le glucose, le fructose, le glycérol, les acides L (+) et D (—) lactique, l'acide citrique, l'acide malique et l'acide acétique sont analysés par méthode enzymatique (BERGMEYER, 1971).

Le mannitol a été dosé par chromatographie en phase gazeuse par M. A. BERTRAND, que nous remercions.

RESULTATS

I. — Incidence de la concentration en sucre du moût de raisin.

Dix souches de bactéries hétérofermentaires, deux *Lactobacillus* et huit *Leuconostoc oinos*, ont été expérimentées dans un moût de raisins de pH 3,8, enrichi en quantités croissantes de sucre.

Après un mois d'incubation à 22 °C, on observe (Tableau I) que la concentration initiale en sucre modifie peu la quantité totale de sucre dégradé et n'intervient pas de manière significative sur le rapport molaire acide lactique/acide acétique pour 100 g de sucre fermenté ; cependant, l'acide malique est dégradé plus faiblement dans les moûts à teneurs en sucre plus élevées.

II. — Métabolisme bactérien des sucres en présence d'acide malique.

Deux moûts de raisins ayant une teneur en sucres de 233 g par litre contiennent respectivement 1,4 et 2,4 g d'acide malique par litre ; ensemencés avec une population bactérienne de l'ordre de 10^7 cellules par millilitre d'une souche de *Leuconostoc oinos* (34 b7), ils fermentent à 25 °C (Tableau II).

Pour des formations d'acide lactique de l'ordre de 1 g par litre, l'acide acétique est 5 à 8 fois moins élevé au terme des deux premières journées qu'au terme des deux suivantes qui correspondent à la disparition quasi totale de l'acide malique. Ces résultats peuvent laisser supposer que l'acide malique joue lui-même un rôle dans la production d'acide acétique par les bactéries fermentant les sucres.

TABLEAU I

Incidence de la concentration en sucre du moût de raisins sur le métabolisme des bactéries lactiques

	<i>Lactobacillus hilgardii</i> (Ab ₆)			<i>Leuconostoc oinos</i> (10 b ₇)			<i>Leuconostoc oinos</i> Du b ₁		
	156	244	291	156	244	291	156	244	291
Teneur initiale en sucre (g/l)									
Sucre fermenté (g/l)	61	78	72	15	14	17	67	50	63
Acide malique dégradé (g/l)	4,60	4,15	3,85	4,55	4,15	3,85	4,55	4,15	3,85
Acide L (+) lactique calculé (g/l) (venant de l'acide malique)	3,10	2,80	2,60	3,05	2,80	2,60	3,05	2,80	2,60
Acide lactique (1)	0,16	0,14	0,13	0,19	0,20	0,16	0,11	0,10	0,12
Acide acétique (1)	0,25	0,20	0,19	0,24	0,28	0,17	0,19	0,17	0,16
Acide lactique/Acide acétique	0,64	0,70	0,68	0,79	0,71	0,90	0,55	0,58	0,65

(1) Teneur exprimée en molécules pour 100 g de sucre fermenté.

Cependant, dans un essai ultérieur, on a suivi l'évolution de l'acide acétique produit par une bactérie hétérolactique, *Lactobacillus brevis*, dans un milieu synthétique à pH 3,5, contenant des teneurs égales de glucose et de fructose (20 g/l), et additionné ou non de 5 g d'acide malique par litre (fig. 1). On observe :

- 1) pendant la phase exponentielle de croissance, la formation d'acide acétique est faible, que le milieu contienne ou non de l'acide malique ;
- 2) l'acide malique est dégradé en totalité pendant la phase exponentielle de croissance ;
- 3) l'augmentation du taux d'acide acétique intervient à partir de la phase stationnaire de croissance.

La même expérimentation a été reproduite avec des bactéries homofermentaires dans un milieu contenant 20 g de glucose et 20 g d'arabinose par litre ; elle conduit à des observations analogues (fig. 2).

TABLEAU II

Fermentations lactiques par *Leuconostoc oinos* (34 b.)

Teneur initiale en sucre : 233 g/l

pH : 3,65

population initiale : 10^7 cellules par millilitre

Les chiffres représentent des g par litre

	Moût A acide malique = 1,4 g/l		Moût B acide malique = 2,4 g/l	
	de 0 au 2 ^e jour	du 2 ^e au 4 ^e jour	de 0 au 2 ^e jour	du 2 ^e au 4 ^e jour
Acide malique dégradé	0,92	0,48	1,65	0,75
Acides L (+) et D (—) lactique	1,05	0,91	0,96	1,17
Acide acétique formé	0,14	0,69	0,13	1,04

III. — Interaction de divers substrats sur le métabolisme de *Leuconostoc oinos* GP₁

A partir d'un milieu (N° 1) à base d'extrait de levure (5 g/l), de glucose (20 g/l) et de fructose (20 g/l), on prépare les milieux suivants :

N° 2 : N° 1 + acide citrique, 3 g/l ;

N° 3 : N° 1 + acide malique, 3 g/l ;

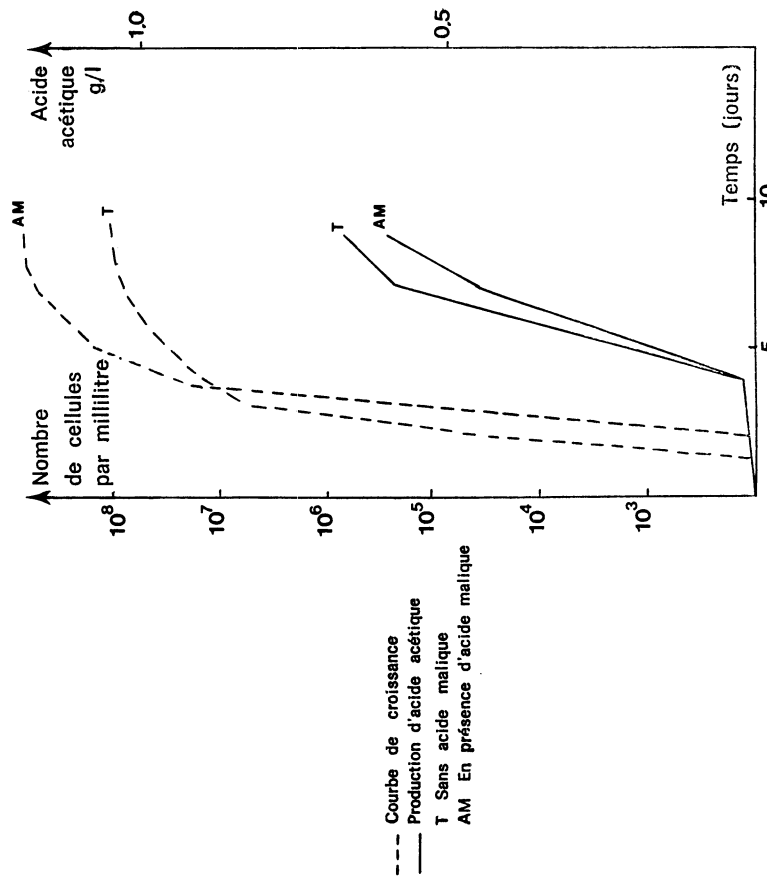


Fig. 1. — Courbes de croissance et de production d'acide acétique par *Lactobacillus brevis* sur milieu synthétique à base de glucose et de fructose (pH 3.5)

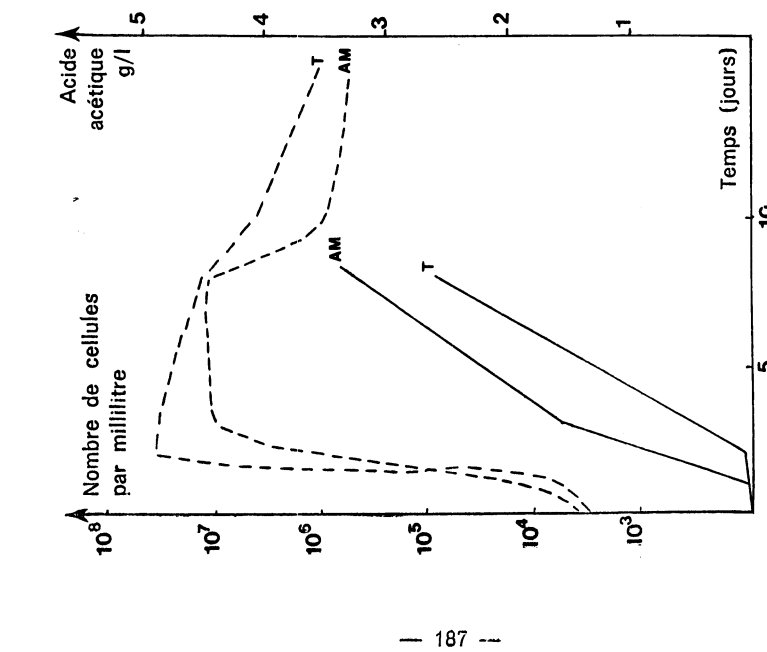


Fig. 2. — Courbes de croissance et de production d'acide acétique par *Lactobacillus plantarum* sur milieu synthétique à base de glucose et d'arabinose (pH 3.5)

TABLEAU III

Evolution de l'acide acétique libéré au cours de la croissance de *Leuconostoc oinos* GP₁ sur différents substrats en fonction de leur dégradation

		Durée (jours)						pH final
		2	5	9	15	22	60	
N° 1	Témoïn	4 0,07	10 0,13	56 0,23	57 0,30	50 0,40	— 0,70	3,35
N° 2	+ Acide citrique, 3 g/l	0,5 0,72 1,07	0,1 0,95 0	15 1,11	18 1,25	17 1,52	— 1,93	3,95
N° 3	+ Acide malique, 3 g/l	3 0,11 1,17	37 0,17 0,55	70 0,36 0	47 0,64	24 1,00	— 1,18	3,95
N° 4	+ Acide tartrique, 3 g/l	4 0,02	3 0,06	0,3 0,08	0,04 0,15	0,02 0,40	— 0,43	3,15
N° 5	+ Acide tartrique, 3 g/l + Acide malique, 3 g/l	4 0,11 1,01	18 0,24 0	60 0,38	60 0,71	33 1,00	— 1,22	4,00

N° 6	+ Acide tartrique, 3 g/l + Acide malique, 3 g/l + Acide citrique, 3 g/l	Nombre de cellules Acide acétique libéré Acide citrique résiduel Acide malique résiduel	4	35	46	47	40	—
			0,25	0,85	1,02	1,42	1,78	1,87
			1,66	0,10	0	—	—	—
			1,70	0,09	0	—	—	3,95
N° 7	+ Glycérol, 10 g/l	Nombre de cellules Acide acétique libéré Glycérol résiduel	4	5	78	70	36	—
			0,13	0,17	0,36	0,68	0,72	1,00 8,7
N° 8	+ Glycérol, 10 g/l + Acide malique, 3 g/l + Acide citrique, 3 g/l	Nombre de cellules Acide acétique libéré Acide citrique résiduel Acide malique résiduel Glycérol résiduel	3	40	70	76	50	—
			0,11	1,09	1,14	1,41	2,31	2,62
			1,73	0	—	—	—	—
			2,14	0	—	—	—	8,5
N° 9	+ Glycérol, 10 g/l + Acide malique, 3 g/l + Acide citrique, 3 g/l + Acide tartrique, 3 g/l	Nombre de cellules Acide acétique libéré Acide citrique résiduel Acide malique résiduel Glycérol résiduel	4	—	43	35	25	—
			0,10	0,80	0,98	1,38	1,58	1,86
			1,60	0,59	0	—	—	—
			2,20	0,44	0	—	—	8,7

Le nombre de cellules est exprimé en 10⁶ par millilitre.

Les teneurs en acides et en glycérol sont exprimées en g par litre.

N° 4 : N° 1 + acide tartrique, 3 g/l ;

N° 5 : N° 1 + acide malique, 3 g/l + acide tartrique, 3 g/l ;

N° 6 : N° 1 + acide citrique, 3 g/l + acide malique, 3 g/l + acide tartrique, 3 g/l ;

N° 7 : N° 1 + glycérol, 10 g/l ;

N° 8 : N° 1 + acide citrique, 3 g/l + acide malique, 3 g/l + glycérol, 10 g/l ;

N° 9 : N° 1 + acide citrique, 3 g/l + acide malique, 3 g/l + acide tartrique, 3 g/l + glycérol, 10 g/l.

Ces divers milieux sont amenés à pH 3,5 et ensemencés, après stérilisation, avec *Leuconostoc oinos* GP₁ à raison de 10⁶ cellules environ par millilitre.

On suit en fonction du temps l'évolution des populations bactériennes vivantes, la dégradation des divers substrats, la formation d'acide acétique ; après 60 jours, on dose les principaux sous-produits formés.

On observe :

1) la totalité des acides citrique et malique est dégradée au 5^e jour. L'acide tartrique n'est pas touché ; l'analyse, en fin d'expérimentation, montre que le glycérol est partiellement fermenté. (Tableau III).

2) dans les milieux N^{os} 1, 3, 5 et 7 (Tableau III), où seuls les sucres et l'acide malique sont dégradés, les formations d'acide acétique demeurent faibles, 0,3 g par litre, pendant la phase de prolifération qui se termine vers le 9^e jour ; elles atteignent des valeurs 3 à 4 fois plus importantes à l'arrêt des fermentations lactiques qui se situe entre le 22^e et le 60^e jour. Par contre, dans les milieux N^{os} 2, 6, 8 et 9, des teneurs en acide acétique élevées, 0,8 à 1,09 g par litre, apparaissent dès le 5^e jour, parallèlement à la dégradation de l'acide citrique, pendant la phase de prolifération ; elles atteignent des valeurs doubles à l'arrêt des fermentations lactiques.

3) les formations d'acide acétique sont les plus élevées dans les milieux contenant initialement de l'acide citrique, N^{os} 2, 6, 8 et 9 ; la différence des teneurs en acide acétique au 5^e jour dans les milieux N^{os} 1 et 2 (820 mg/l), alors que 3 g d'acide citrique sont dégradés, permet de dire que, pour cette bactérie, en culture dans ce milieu, il se forme environ une mole d'acide acétique pour une mole d'acide citrique dégradé. La croissance totale (exception faite du milieu, N° 4), estimée au 5^e ou au 9^e jour, varie sensiblement de 1 à 4 selon les conditions de milieu, ainsi que les quantités de sucre fermenté et d'acide acétique formé après 60 jours (Tableaux III et IV).

Les populations maximales (Tableau IV) les plus importantes se relèvent dans les milieux contenant initialement de l'acide malique (N° 3) et du glycérol, N°s 7 et 8. Les quantités de sucre métabolisé sont maximales dans les milieux contenant initialement de l'acide citrique, N° 2, du glycérol, N° 7 et leur mélange, N° 8. (Tableau IV).

TABLEAU IV

**Analyse des milieux synthétiques après croissance
de *Leuconostoc oinos* GP₁**

Les chiffres représentent des g par litre

Milieux	Sucre fermenté			Acides lactiques			mannitol	éthanol	acide acétique
	glucose	fructose	total	L (+)	D (—)	total			
				N° 1	2,37	2,06			
N° 2	4,90	6,55	11,45	0,18	2,17	2,35	1,2	0,17	1,93
N° 3	2,85	4,28	7,13	1,92	1,7	3,62	0,6	0,03	1,18
N° 4	2,20	1,41	3,61	0,08	0,26	0,34	0,17	0,13	0,43
N° 5	2,43	5,27	7,70	1,8	1,8	3,60	0,96	0,08	1,22
N° 6	4,04	4,28	8,12	1,78	1,75	3,55	1,6	0,06	1,87
N° 7	3,19	4,83	8,02	0,17	1,60	1,77	2,8	0,05	1,00
N° 8	4,96	8,68	13,65	1,84	2,51	4,35	0,9	0,15	2,62
N° 9	2,40	1,80	4,20	1,93	1,52	3,45	1,5	0,29	1,86

4) les formations d'acide acétique sont les plus faibles dans le milieu N° 4 contenant de l'acide tartrique comme seul acide organique ; on y relève de même, à la fois, les populations les plus basses et les quantités minimales de sucre fermenté ; ceci peut s'expliquer en partie par un pH final assez bas (3,15). Cependant, les milieux N°s 5 et 6 et surtout N° 9 contenant de l'acide tartrique présentent des populations maximales restreintes, malgré des pH relativement élevés. On note également une dégradation plus lente des acides malique et citrique en présence d'acide tartrique, conditions, N°6 et N° 9. (Tableaux III et IV).

DISCUSSION

Cette étude porte sur un nombre restreint de souches, dans un nombre de conditions de milieu limité et ne peut donc fournir qu'un aspect fragmentaire du métabolisme des bactéries lactiques. Il en découle cependant certaines informations d'ordre théorique qui ne manquent pas d'applications pratiques.

Si la concentration initiale en sucre n'intervient pas sur la croissance et le métabolisme bactériens, ceux-ci sont néanmoins fortement conditionnés par la composition du milieu. Le glycérol, à teneur voisine de celle rencontrée dans les vins (10 g/l), fonctionne comme activateur. Une stimulation de la dégradation bactérienne des sucres a été mise en évidence dans les moûts de raisins parasités par *Botrytis cinerea* (SAN ROMAO et LAFON-LAFOURCADE, 1979) ; le phénomène pourrait être dû en partie à la forte concentration de ces milieux en glycérol. Par contre, l'acide tartrique fonctionne comme inhibiteur de la croissance et de l'activité fermentaire. L'incidence défavorable de cet acide sur la dégradation de l'acide malique par les bactéries non proliférantes avait été signalée (LAFON-LAFOURCADE et PEYNAUD, 1970), et vient d'être confirmée par l'étude de LONVAUD effectuée dans nos laboratoires, montrant que cet acide est un inhibiteur compétitif de l'enzyme malolactique. Les acides malique et citrique sont activateurs, probablement parce que leur dégradation précoce provoque une élévation du pH favorable à la croissance et à l'activité métabolique des bactéries (RIBÉREAU-GAYON et *al.*, 1975).

D'un autre côté, les bactéries lactiques, comme les levures, présentent un métabolisme différent pendant la phase de prolifération et les phases stationnaire et de déclin. Pendant la première phase, les souches hétérofermentaires dégradent les sucres, avec une formation faible d'acide acétique. On peut supposer que pendant la phase exponentielle de croissance les besoins énergétiques étant plus grands, la voie glycolytique plus exergonique est utilisée préférentiellement à celle de l'acétylphosphate. La formation d'acide acétique devient importante pendant les phases suivantes.

Dans le cas où la bactérie en possède la capacité et où la biomasse formée est suffisante, l'acide citrique est dégradé, comme l'acide malique, pendant la phase de prolifération. La formation d'acide acétique demeure limitée dans la mesure où la teneur du milieu en acide citrique est peu élevée.

En vinification en rouge et en blanc sec, il se trouve justement que les vins contiennent des concentrations faibles : a) d'acide citrique, b) de sucres qui sont fermentés entièrement pendant la phase de prolifération. Ces deux opportunités permettent d'utiliser les bactéries lactiques à la désacidification de ces vins sans risques d'augmentation notable d'acidité volatile. En outre, bien qu'en réalité l'acide malique n'intervienne pas lui-même dans la régulation de la fermentation lactique des sucres, il n'en est pas moins vrai que sa présence dans le vin traduit l'état d'une population bactérienne incapable de libérer de l'acide acétique en quantités excessives (BRÉCHOT et *al.*, 1974).

Manuscrit reçu le 8 septembre 1980.

RÉSUMÉ

La formation d'acidité volatile au cours de la fermentation lactique des sucres est liée en particulier à l'état physiologique des populations bactériennes. Elle est faible pendant la phase de multiplication cellulaire, phase pendant laquelle sont éventuellement dégradés les acides malique et citrique. La présence d'acide malique dans le vin assure une formation limitée d'acide acétique. Ces microorganismes, en outre, apparaissent extrêmement sensibles à la composition du milieu (effet activateur du glycérol).

SUMMARY

The formation of volatile acidity during lactic acid fermentation of sugars is specifically linked to the physiological state of bacteria populations. It is low during the cellular multiplication, phase during which malic and citric acids are eventually decomposed. The presence of malic acid in wine tends to limit the formation of acetic acid. In addition, these microorganisms appear to be extremely sensitive to the medium's composition (activating effect of glycerol).

ZUSAMMENFASSUNG

Die während der Milchsäuregärung der Zucker gebildete flüchtige Säure ist besonders an den physiologischen Zustand der Bakterienpopulationen gebunden.

Sie ist während der Zellenvermehrungsphase, in der eventuell die Apfel- und Milchsäuren abgebaut werden niedrig. Das Vorhandensein von Apfelsäure im Wein sichert eine begrenzte Bildung der Essigsäure. Die Mikroorganismen scheinen ausserdem extrem empfindlich bezüglich der Zusammensetzung des Nährbodens (Aktivierungseffekt der Glycerine) zu sein.

RESUMEN

La formación de la acidez volatil durante el transcurso de la fermentación láctica de los azúcares está ligada en particular al estado fisiológico de las poblaciones bacterianas.

Esta fermentación es débil durante el periodo de la fase de multiplicación celular, en la cual existe eventualmente una degradación de los ácidos málico y cítrico. La presencia del ácido málico en el vino es síntoma de una formación limitada del ácido acético. Estos microorganismos, sin embargo, son extremadamente influenciados según la composición del medio (efecto activador del glicerol).

RIASSUNTO

La formazione di acidità volatile durante la fermentazione lattica degli zuccheri è particolarmente legata allo stato fisiologico delle popolazioni batteriche.

E debole durante la fase di moltiplicazione cellulare, fase durante la quale sono eventualmente degradati gli acidi malichi e citrici. La presenza d'acido malico nel vino assicura una fermentazione limitata di acido acetico. Inoltre, questi microorganismi appaiono molto sensibili alla composizione dell'ambiente (effetto attivante del glicerolo).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BERGMEYER U., 1971. Methods of enzymatic analysis. *Academic Press*, London.
- BRÉCHOT P., CHAUVET J. et 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**, N° 4, 411-420.
- LAFON-LAFOURCADE S. et PEYNAUD E., 1970. L'acide L (+) lactique comme témoin de la présence des bactéries lactiques en vinification. *Ind. Alim. Agric.*, **2**, 133-138.
- LAFON-LAFOURCADE S. et RIBÉREAU-GAYON P., 1977. Origine de l'acidité volatile des grands vins liquoreux. *C.R. Acad. Agric.*, **63 (a)**, 551-558.
- RIBÉREAU-GAYON J., PEYNAUD E., RIBÉREAU-GAYON P. et SUDRAUD P. 1975. *Sciences et Techniques du vin*, Tomes 1 et 2. Dunod éd., Paris.
- SAN ROMAO V. et LAFON-LAFOURCADE S., 1979. Premières observations sur l'action de *Botrytis cinerea* cultivé sur moût de raisin, à l'égard du métabolisme des bactéries lactiques dans le moût et dans le vin. *Vitis*, **18**, N° 2, 155-160.