J. Int. Sci. Vigne Vin, 1996, **30**, n°3, 151-157

ETUDE QUALITATIVE ET QUANTITATIVE DES INTERACTIONS ENTRE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* ET *LEUCONOSTOC ŒNOS*

QUALITATIVE AND QUANTITATIVE STUDY OF INTERACTION BETWEEN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* AND *LEUCONOSTOC ŒNOS*

J-F. GILIS, Marie-Line DELIA-DUPUY, P. STREHAIANO

Laboratoire du Génie Chimique. CNRS UMR 5503
ENSIGC. 18, chemin de la loge, 31078 Toulouse cedex (France)

Résumé : Lors de la vinification, les arrêts de fermentation malolactique sont souvent attribués aux constituants du milieu tels que l'éthanol et le SO_2. Cependant, il a été rapporté, que d'autres types d'interactions entre *Saccharomyces cerevisiae* et *Leuconostoc œnos* pouvaient aussi en être responsables.
Ce travail a pour but de caractériser l'influence de *S. cerevisiae* sur le développement de *L. œnos*.
En premier lieu, une étude qualitative sur milieu gélosé a permis de mettre en évidence une inhibition de la croissance de *L. œnos* par *S. cerevisiae*.
Afin de quantifier ce phénomène, une culture de *L. œnos* en milieu liquide préfermenté par *S. cerevisiae* (recomplété en substances nutritives) a été comparée à une culture témoin en milieu M.R.S.
Le milieu préfermenté affecte la croissance de *L. œnos*. Celui-ci contient des molécules inhibitrices du développement de *L. œnos*, dont l'effet est fortement influencé par les conditions de pH et de température. Cette inhibition se répercute aussi sur la fermentation malolactique.

Abstract : Weak malolactic fermentations in wine making are often attributed to the medium constituents such as ethanol and SO_2. However, some authors report that the interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and *Leuconostoc œnos* could be responsible too.
The aim of this work is to characterize the influence of *S. cerevisiae* on the growth of *L. œnos*. First, a qualitative study was performed on solid medium containing 8 g/l of L-malic acid. In this case, *L. œnos* was mixed to M.R.S agar and poured into Petri plate, then *S. cerevisiae* was seeded in rings on the agar surface. After incubation, the co-culture result in an inhibition of *L. œnos* growth by *S. cerevisiae* .
In order to quantify this phenomenon, a culture of *L. œnos* was carried out on liquid medium prefermented by *S. cerevisiae* (supplied with M.R.S nutrients) and was compared with a control on M.R.S medium. Both contained 8 g/l of L-malic acid. This technique allows to separate the microorganisms in order to avoid competitions between the strains.
The prefermented medium affects *L. œnos* growth and the malolactic fermentation, but the results depended on the pH and the temperature. Globally, low pH (3,4) and high temperature (30°C) conditions increased the inhibitory effect of the prefermented medium. This medium contains inhibitory molecules for *L. œnos*. In agreement with some authors, those molecules could be the medium chain fatty acids (C_8 to C_{12}) released in the medium by *S. cerevisiae* because of their pH-dependent toxicity. However, those results may be different with other couples of strains of *S. Cerevisiae* and *L. œnos*.

Mots-clés : *S. cerevisiae, L. œnos*, fermentation malolactique
Key words : *S. cerevisiae, L. œnos*, malolactic fermentation

INTRODUCTION

Les arrêts de fermentation malolactique, parfois rencontrés lors de la vinification, peuvent entraîner d'importantes altérations de la qualité des vins et de graves conséquences économiques. Il est donc intéressant de connaître les conditions qui en sont responsables. LONVAUD-FUNEL *et al.* (1988b) lors de co-cultures rapportent que *Saccharomyces cerevisiae* peut inhiber la croissance de *Leuconostoc œnos* pendant la fermentation alcoolique par des relations de compétition. La croissance bactérienne n'est alors possible qu'après la mort et l'autolyse des levures. L'éthanol et le SO_2 ont souvent été mis en cause dans le cas d'inhibitions (WIBOWO *et al.*, 1988 ; STRASSER de SAAD et MANCA de NADRA, 1989). Cependant, certains auteurs ont prouvé que l'intervention de ces molécules n'était pas suffisante pour expliquer ce phénomène et que d'autres inhibiteurs produits par les levures en seraient responsables (KING et BEELMAN, 1986 ;

©Vigne et Vin Publications Internationales (Martillac, France)

LONVAUD-FUNEL *et al.*, 1988a). Si l'incidence de la composition du milieu de vinification sur la croissance des micro-organismes est plus ou moins bien connue, les interactions entre *S. cerevisiae* et *L. œnos* le sont beaucoup moins.

Alors qu'il a été clairement démontré que les acides gras saturés à courte chaîne relargués par les levures lors de la fermentation alcoolique avaient un effet inhibiteur sur leur propre croissance (LAFON-LAFOURCADE *et al.*, 1984), d'autres auteurs ont testé leur impact sur la croissance de *L. œnos* et la fermentation malolactique. Les travaux de CAPUCHO et SAN ROMAO (1994) ont mis en évidence l'effet inhibiteur des acides gras C10 et C12 sur la croissance de *L. œnos* et sur la fermentation malolactique lorsque ceux-ci étaient ajoutés dans le milieu de culture. L'influence de leur concentration et du pH a été soulignée. D'autre part, il a été démontré que les interactions entre *S. cerevisiae* et *L. œnos* dépendaient fortement des souches considérées (AVEDOVECH *et al.*, 1992 ; LEMARESQUIER, 1987a, 1987b).

Nous proposons ici une étude qualitative et quantitative des interactions pouvant exister entre *S. cerevisiae* cerevisiae souche VL1 et *L. œnos* souche DSM 7008, et de l'influence du pH et de la température sur ces phénomènes.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I — MATÉRIEL BIOLOGIQUE

La levure utilisée pour cette étude est *S. cerevisiae* cerevisiae souche VL1 commercialisée par Laffort œnologie (Bordeaux, France) sous le nom ZYMAFLORE VL1.

La bactérie lactique étudiée est *L. œnos* DSM 7008, souche de la collection de la Faculté d'Œnologie de Bordeaux.

Les levures sont cultivées sur un milieu semi-synthétique (STREHAIANO, 1984) supplémenté par 8 g/l d'acide L-malique et contenant 50 g/l de glucose. Le pH est ajusté à 4,5 avec une solution de soude concentrée (10 N). Les bactéries lactiques sont cultivées sur un milieu M.R.S (Man, Rogosa, Sharp) commercial (BIOKAR) supplémenté par 8 g/l d'acide L-malique. Le pH est ajusté à la valeur souhaitée avec une solution de soude concentrée (10 N) ou d'acide orthophosphorique. Les milieux sont stérilisés par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes pour le milieu semi-synthétique et 15 minutes pour le milieu M.R.S.

Les études d'interactions microbiennes en milieu liquide sont effectuées dans des Erlenmeyers de 500 ml placés dans un bain-marie thermostaté, sur une table immergée à agitation magnétique (250 t/min). Les cultures sont ensemencées à raison de 3.10^6 cellules viables par ml à partir d'un levain âgé de 15 heures pour les levures et 8.10^6 cellules viables par ml à partir d'un levain âgé de 40 heures pour les bactéries. Les levains ont été incubés à 25°C.

Des échantillons sont prélevés à intervalles réguliers pour établir les cinétiques de fermentation.

II — INTERACTIONS LEVURES-BACTÉRIES

1) Études sur milieu gélosé

La méthode utilisée, qui s'inspire des antibiogrammes, a été décrite par LEMARESQUIER (1987a, 1987b). Il s'agit d'une co-culture de deux micro-organismes sur milieu M.R.S gélosé. *L. œnos* est cultivé en masse dans la gélose à raison de 10^6 cellules viables par ml, alors que les levures sont déposées à la surface en anneaux de 2 cm de diamètre à l'aide d'un anneau de platine. Les boîtes sont incubées pendant 8 jours à 28°C.

Si les levures excrètent une substance toxique ou bénéfique pour les bactéries, celle-ci diffusera dans la gélose. Les résultats se traduiront par une différence de concentration cellulaire au niveau des zones de contact des deux populations.

2) Études sur milieu liquide

Le protocole s'inspire de celui mis au point dans notre laboratoire pour quantifier le phénomène « killer » chez les levures (RAMON-PORTUGAL *et al.*, 1994). On étudie l'effet d'un milieu préfermenté par les levures, contenant encore 7,8 g/l d'acide L-malique, sur la croissance de *L. œnos* et sur la fermentation malolactique. Une culture test est réalisée en Erlenmeyer sur milieu M.R.S où l'eau est remplacée par le milieu préfermenté, et est comparée à une culture témoin sur milieu M.R.S classique supplémenté par 8 g/l d'acide L-malique.

Le milieu préfermenté provient d'une fermentation alcoolique conduite en fermenteur de type SETRIC avec *S. cerevisiae* VL1. Les cellules sont éliminées du milieu, avant épuisement total du glucose, par centrifugation à 2500 tr/min pendant 15 min à 4°C. Le surnageant est ensuite stérilisé par filtration avec une cartouche filtrante en acétate de cellulose (Sartorius) à 0,2 µm. Le filtrat est recueilli dans des flacons stériles, et conservé à 4°C. La concentration en glucose résiduel est de 0,3 g/l.

©Vigne et Vin Publications Internationales (Martillac, France)

III — ESTIMATION DE LA BIOMASSE

La quantité de biomasse est déterminée par mesure de densité optique à 620 nm, à travers des cuves de 1 cm de trajet optique, à l'aide d'un spectrophotomètre U.V-visible double faisceau Hitachi U-2000. Cette méthode a été corrélée avec la méthode dite des « poids secs » (masse cellulaire sèche retenue sur une membrane après filtration d'un volume connu de milieu de culture). Les bactéries sont également comptées sur une cellule graduée de type « petit Salumbéni » sous microscope au grossissement 400 en lumière blanche. Les erreurs de comptage ont été déterminées, et n'excèdent pas 8 p. cent.

La viabilité est estimée par la technique d'épifluorescence (LANGE *et al.*, 1993). Les observations sont réalisées avec un microscope couplé à une lampe U.V. (OLYMPUS BH2 RFL T3) au grossissement 1000.

Les résultats sont exprimés en g/l de biomasse viable.

IV — MÉTHODES ANALYTIQUES

Le glucose et le L-lactate sont dosés par une méthode enzymatique grâce à un appareil automatique (YELLOW SPRING INSTRUMENTS, modèle 2700 select). Une réaction d'oxydation catalysée par une enzyme fixée sur une membrane (glucose oxydase ou L-lactate oxydase) conduit à l'émission d'un électron provoquant un signal électrique proportionnel à la concentration en substrat dégradé.

Le L-malate est dosé avec un kit enzymatique proposé par Boehringer Mannheim (réf.139068).

L'éthanol est dosé par chromatographie en phase gazeuse avec un chromatographe chrompack 437A (colonne chrompack poraplot Q wide bore (0,53 m x 25 m)) muni d'un détecteur à ionisation de flamme. La température du détecteur et de l'injecteur est de 200°C, le gaz vecteur utilisé est l'azote avec un débit de 8 ml/mn. Le standard interne est l'isopropanol.

RÉSULTATS

I — ASPECT QUALITATIF : ÉTUDE D'INTERACTION SUR MILIEU GÉLOSÉ

Cette méthode nous a permis de vérifier l'existence d'un phénomène d'interaction entre *S. cerevisiae* et *L. œnos*.

La figure 1 schématise les résultats obtenus sur boîte de Petri. On peut distinguer deux zones A et B bien distinctes où les concentrations en colonies de *L. œnos* sont sensiblement différentes. Les photographies de la figure 2 prises à l'intérieur (p-A) et à l'extérieur (p-B) des anneaux de levures au microscope au grossissement 100 permettent de mieux apprécier le phénomène.

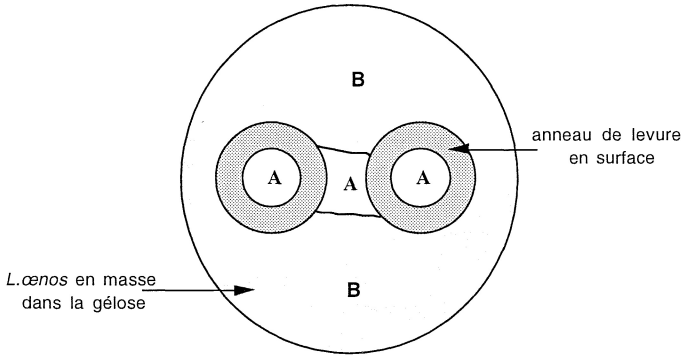


Fig. 1 — Schéma du test d'interaction sur milieu gélosé entre *S. cerevisiae* VL1 et *L. œnos* DSM 7008

Fig. 1 — Sheme of interaction test on agar medium between *S. cerevisiae* VL1 and *L. œnos* DSM 7008

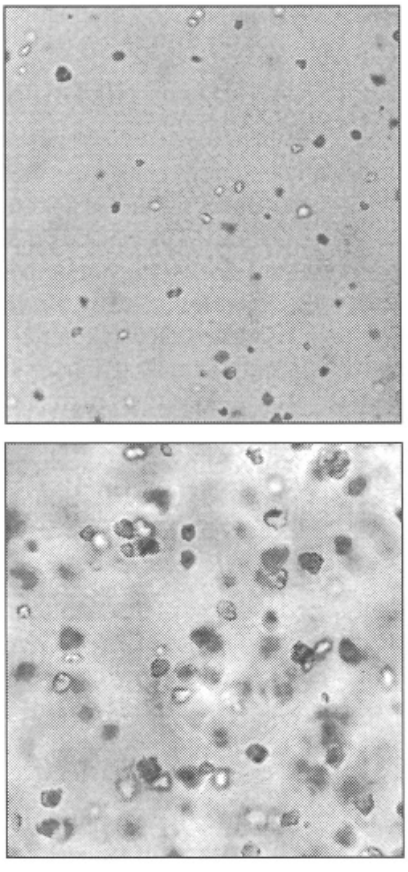


Fig. 2 — Photographies des colonies de *L. œnos* prisent à l'intérieur (p-A) et à l'extérieur (p-B) des anneaux de levures, au microscope au grossissement 100

Fig. 2 — Photograph of *L. œnos* colonies taken inside (p-A) and outside (p-B) the yeast ring under microscopic observation (x 100)

©Vigne et Vin Publications Internationales (Martillac, France)

- La première zone A apparaît claire à l'intérieur et entre les anneaux de levures, elle contient des colonies peu développées. La croissance bactérienne semble inhibée par la présence des levures dans cette zone. La photographie (p-A) illustre clairement cette inhibition. Les colonies observées sont, en effet, très petites et dispersées. Cette dispersion traduit la mort ou l'altération de certaines cellules initiales qui n'ont pu donner naissance à des colonies.

- La zone B, sombre à l'extérieur des anneaux de levures, contient de très nombreuses colonies. La photographie (p-B) confirme en effet que les colonies sont bien développées et présentes en densité plus importante.

Les mêmes résultats ont été observés sur plus de 40 boîtes dans les mêmes conditions. De même, il ne s'agit pas d'une répartition hétérogène des cellules incubées dans la gélose. En effet, une boîte de référence a permis de vérifier que les colonies sont uniformément réparties à l'intérieur du milieu gélosé lorsque les levures sont absentes. Ces résultats montrent qu'il existe une interaction non neutre entre *L. œnos* DSM 7008 et *S. cerevisiae* VL1 ; mais la méthode employée ne permet pas de statuer sur la nature de l'interaction, ni de la quantifier.

II — ASPECT QUANTITATIF : ÉTUDE EN MILIEU LIQUIDE

Les études d'interactions entre micro-organismes sont classiquement menées sur milieu gélosé ou en co-cultures en milieu liquide. Mais lorsque l'inhibition de l'un d'eux est constatée, il est souvent impossible par de telles méthodes de savoir si celle-ci est due à une compétition pour le substrat ou à l'excrétion de molécules inhibitrices. L'utilisation d'un milieu préfermenté complété en substances nutritives permet de séparer les micro-organismes et semble être la méthode la plus appropriée pour s'affranchir des relations de compétition. Nous avons donc étudié l'effet d'un milieu préfermenté par les levures sur la croissance de *L. œnos* et sur la fermentation malolactique.

Deux cultures de *L. œnos* sont conduites en parallèle. La première sur un milieu M.R.S où l'eau est remplacée par le milieu préfermenté contenant encore 7,8 g/l d'acide L-malique, et la deuxième en milieu M.R.S classique supplémenté par 8 g/l d'acide L-malique. Cette dernière servira de témoin.

Afin de tester l'influence de l'environnement sur l'expression de l'inhibition, trois valeurs de pH (3,4 ; 4,2 et 5) et trois températures (20, 25 et 30°C) sont étudiées. Celles-ci encadrent les valeurs rencontrées en vinification.

Les expériences sont arrêtées lorsque le L-malate est totalement consommé dans le milieu témoin.

III — VALIDATION DE LA MÉTHODE

Afin de valider la méthode utilisée et de vérifier que l'inhibition de la croissance bactérienne est bien observée, une expérience préliminaire au centre de la zone de pH et de température étudiée (pH 4,2 et 25°C) est effectuée et répétée deux fois.

Un essai supplémentaire (milieu B) où le milieu préfermenté a été préalablement chauffé thermiquement (autoclavage à 120°C pendant 15 minutes) est effectué pour vérifier si les molécules inhibitrices sont sensibles à la chaleur. Les figures 3 et 4 présentent les résultats obtenus.

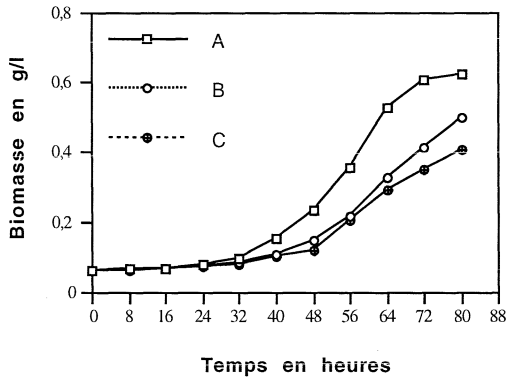


Fig. 3 — Cinétique de production de biomasse viable pour *L. œnos* DSM 7008 à pH = 4,2 et 25°C

A : M.R.S témoin - B : M.R.S + milieu préfermenté chauffé
C : M.R.S + milieu préfermenté

Fig. 3 — Kinetics of production of viable biomass for *L. œnos* DSM 7008 at pH = 4,2 and 25°C

A : M.R.S. control - B : M.R.S. + heated prefermented medium
C : M.R.S. + prefermented medium

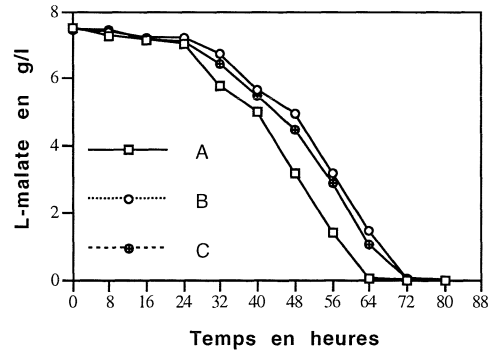


Fig. 4 — Cinétique de consommation du L-malate par *L. œnos* DSM 7008 à pH = 4,2 et 25°C

A : M.R.S témoin, B : M.R.S + milieu préfermenté chauffé
C : M.R.S + milieu préfermenté

Fig. 4 — Kinetic of L-malate consumption by *L. œnos* DSM 7008 at pH = 4,2 and 25°C

A : M.R.S. control - B : M.R.S. + heated prefermented medium
C : M.R.S. + prefermented medium

©Vigne et Vin Publications Internationales (Martillac, France)

$$\% \text{ I biomasse} = \frac{\text{concentration cellulaire témoin - concentration cellulaire test}}{\text{concentration cellulaire témoin}} \times 100$$

$$\% \text{ I F.M.L} = \frac{\text{concentration en L-lactate témoin - concentration en L-lactate test}}{\text{concentration en L-lactate témoin}} \times 100$$

Après un temps de latence de 16 heures, la croissance cellulaire démarre dans les trois milieux. Cependant la croissance bactérienne dans les milieux préfermentés est fortement inhibée (figure 3). La biomasse viable maximale atteinte en fin de fermentation n'est que de 0,41 g/l dans le milieu préfermenté chauffé et 0,35 g/l dans le milieu préfermenté alors qu'elle atteint 0,6 g/l dans le milieu témoin. Ceci confirme la présence de molécules inhibitrices dans le milieu préfermenté chauffé ou non. Celles-ci sont en concentration suffisante pour inhiber la croissance de *L. œnos*.

La figure 4 montre que cet effet inhibiteur se répercute sur la fermentation malolactique. En effet, les bactéries cultivées dans le milieu témoin finissent de consommer le L-malate environ 8 heures avant celles cultivées sur les milieux préfermentés. Des résultats similaires ont été observés dans les deux expériences.

L'utilisation d'un milieu préfermenté recomplété en éléments nutritifs permet d'exclure toutes relations de compétitions vis-à-vis du substrat entre les deux microorganismes. Cette méthode permet donc de mettre en évidence l'excrétion de molécules inhibitrices par *S. cerevisiae* VL1 actives sur *L. œnos* DSM 7008.

Cette méthode permet aussi d'exclure l'intervention de l'éthanol et du SO_2 dans ce phénomène. En effet le milieu préfermenté ne contient que 2,3 p. cent d'éthanol (v/v) et certains auteurs ont montré que cette teneur pouvait être activatrice de la croissance de *L. œnos* (KING et BEELMAN, 1986). De plus, le milieu synthétique de fermentation alcoolique est exempt de SO_2, d'ailleurs la souche de levure VL1 est connue comme étant une souche produisant très peu de SO_2.

III — INFLUENCE DU PH ET DE LA TEMPÉRATURE

Afin d'étudier l'influence du pH et de la température, 4 autres expériences du même type sont effectuées dans les conditions suivantes :

- expérience 1 : pH 3,4 et 20°C,
- expérience 2 : pH 3,4 et 30°C,
- expérience 3 : pH 5 et 20°C,
- expérience 4 : pH 5 et 30°C.

L'expérience préliminaire (expérience 0) à pH 4,2 et 25°C servira de point central.

Pour quantifier l'effet inhibiteur sur la croissance de *L. œnos* et sur la fermentation malolactique (F.M.L), un temps de référence est nécessaire. Nous avons choisi le temps où la concentration M en L-malate a atteint la valeur M0/2 dans le témoin. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la croissance cellulaire (% I biomasse) et de l'apparition de L-lactate (% I F.M.L) (cf ci-dessus).

IV — EFFET SUR L'INHIBITION DE LA CROISSANCE DE *L. ŒNOS*

La figure 5 montre clairement que l'effet inhibiteur du milieu préfermenté sur la croissance de *L. œnos* s'exprime d'autant plus que le pH est acide. Par contre, on peut remarquer que plus la température est basse plus l'inhibition est atténuée.

C'est à pH 3,4 (pH courant en vinification) que l'inhibition est la plus forte et peut atteindre 98 p. cent. Dans ces conditions de pH, les bactéries cultivées dans le milieu préfermenté à 30°C ont une croissance très faible et survivent pendant 48 heures. Après 56 heures, la viabilité est nulle dans ce milieu alors que les cellules cultivées dans le milieu témoin atteignent une phase stationnaire et que la viabilité est encore de 93 p. cent. Par contre, lorsque la température diminue à 20°C pour les mêmes conditions de pH, la croissance devient possible dans le milieu préfermenté, mais un temps de latence de 72 heures est observé.

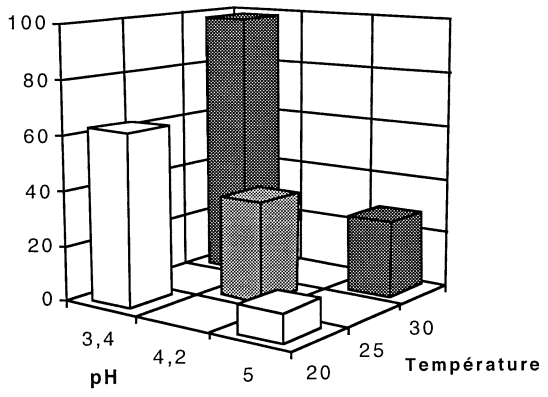


Fig. 5 — Influence du pH et de la température sur l'inhibition de la croissance de *L. œnos* DSM 7008

Fig. 5 — Influence of pH and temperature on the growth inhibition of *L. œnos* DSM 7008

©Vigne et Vin Publications Internationales (Martillac, France)

V — EFFET SUR L'INHIBITION DE LA FERMENTATION MALOLACTIQUE

De même que pour la croissance cellulaire, l'inhibition de la fermentation malolactique est fortement influencée par le pH et la température. La figure 6 montre que plus le pH est acide et plus l'inhibition s'exprime, plus la température est basse et plus l'effet inhibiteur est atténué.

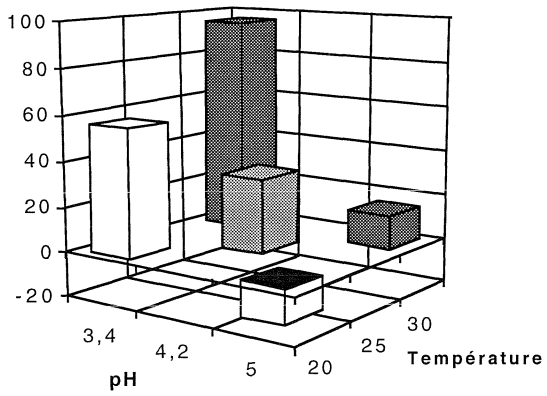


Fig. 6 — Influence du pH et de la température sur l'inhibition de la fermentation malolactique pour *L. œnos* DSM 7008

Fig. 6 — Influence of pH and temperature on the inhibition of the malolactique fermentation for *L. œnos* DSM 7008

Cependant, il apparaît une valeur négative à pH 5 et 20°C, traduisant une activation de la fermentation malolactique dans le milieu test. En effet, cette réaction s'est terminée avec une avance d'environ 8 heures dans ce milieu malgré une légère inhibition de la croissance cellulaire.

Il semblerait qu'il existe des molécules activatrices de la fermentation malolactique produites par les levures, telles que des vitamines, dont l'influence n'apparaît que lorsque l'action des molécules inhibitrices est fortement atténuée.

A pH 3,4 et 30°C, l'inhibition n'atteint pas 100 p. cent puisqu'une faible quantité d'acide L-lactique a été produite tant que les cellules restaient vivantes (0,2 g/l).

DISCUSSION

Cette méthode d'étude d'interaction sur milieu liquide permet donc de mettre en évidence une interaction entre *S. cerevisiae* et *L. œnos* autre que la compétition, d'explorer une zone de pH et de températures et de quantifier l'influence de ces paramètres sur le phénomène étudié.

Concernant la nature des molécules inhibitrices, quelques auteurs ont recherché des molécules actives sur *L. œnos* autres que l'éthanol et le SO_2. En particulier, plusieurs études s'accordent à mettre en cause les acides gras saturés à courtes chaînes relargués par les levures (LONVAUD-FUNEL *et al.*, 1988b ; GUILLOUX-BENATIER *et al.*, 1995). De même, CAPUCHO et SAN ROMAO (1994), lors d'une étude sur l'inhibition de l'activité malolactique par les acides gras, rapportent des comportements comparables à nos observations. Ces auteurs ont montré, en culture continue sur milieu synthétique, que les acides décanoïques et dodécanoïques influent sur la croissance de *L. œnos* et sur la fermentation malolactique. Des concentrations respectives supérieures à 12,5 et 2,5 mg/l (proches de celles rencontrées dans les vins) ont des effets inhibiteurs, mais des concentrations inférieures semblent produire un effet activateur.

LONVAUD-FUNEL *et al.* (1988a), lors d'une étude sur milieu vin (pH 3,2-3,4), montrent que la concentration en acides gras mais aussi leur nature influencent leur toxicité. Ainsi l'acide hexanoïque a peu d'effet par rapport aux acides octanoïque, décanoïque et dodécanoïque. De plus, il semble que l'acide palmitoléïque ait un effet bactéricide sur *L. œnos*, alors que son homologue saturé, l'acide palmitique, ne montre aucun effet significatif.

L'activité inhibitrice de ces acides dépend aussi du pH du milieu. En effet, le pH conditionne leur équilibre acido-basique. Ayant un pKa de 4,9, à pH 3, les acides gras sont à 99 p. cent non dissociés, et leur effet inhibiteur est le plus marqué. Dans cet état, ils sont liposolubles et peuvent pénétrer dans la cellule par simple diffusion (CAPUCHO et SAN ROMAO, 1994). Le pH intra-cellulaire entraîne alors leur dissociation, qui provoque une acidification du pH cytoplasmique et une déstabilisation du gradient de protons transmembranaire. Cette acidification du pH intracellulaire entraînerait une baisse d'activité de l'enzyme malolactique dont le pH optimum est compris entre 5 et 6. En effet, nous avons constaté que l'inhibition est très forte à pH 3,4 et 4,2 dans le milieu préfermenté, et relativement faible à pH 5. Ce phénomène s'exprime surtout sur la croissance cellulaire mais aussi sur l'apparition du L-lactate.

L'expérience avec le milieu préfermenté chauffé montre que les molécules inhibitrices ne sont pas sensibles à la chaleur puisque l'inhibition de la croissance cellulaire est toujours constatée. Nous avons vu également que l'éthanol et le SO_2 ne peuvent pas être ici mis en cause, il pourrait donc s'agir d'acides gras à courte chaîne (C6 à C12). Cependant, la méthode proposée ne permet pas de conclure sur la nature exacte des molécules mises en jeu. Toutefois, l'élimination

©Vigne et Vin Publications Internationales (Martillac, France)

avec du charcoal des acides gras et de leurs esters du milieu préfermenté, comme le suggère LONVAUD-FUNEL *et al.* (1988a), pourrait confirmer leur implication.

L'étude sur milieu liquide à partir d'un milieu préfermenté met donc en évidence l'existence de molécules inhibitrices de la croissance de *L. œnos* sécrétées par *S. cerevisiae*. Leur effet est fortement influencé par le pH et la température.

Cette méthode rend possible la quantification de l'inhibition et permettrait, en association avec la méthode de Lemaresquier, de sélectionner les couples *S. cerevisiae-L. œnos* les mieux adaptés à la vinification. En effet, ces résultats ne sont valables que pour le couple étudié et seraient certainement différents pour d'autres souches comme l'ont montré AVEDOVECH *et al.* (1992).

Remerciements : Les auteurs remercient le conseil Régional de Midi-Pyrénées pour le soutien financier qu'il a accordé à cette étude.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AVEDOVECH R.M., Mc DANIEL M., WATSON B.T. and SANDINE W.E., 1992. An evaluation of combination of wine yeast and *Leuconostoc œnos* strains in malolactic fermentation of Chardonnay wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, **43**, n° 3, 253-260.

CAPUCHO I. and SAN ROMÂO M.V., 1994. Effect of ethanol and fatty acids on malolactic activity of *Leuconostoc œnos*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **42**, 391-395.

GUILLOUX-BENATIER M., LE FUR Y. et FEUILLAT M., 1995. Interactions des fermentescibilités alcoolique et malolactique en milieu modèle. Rôle des macromolécules et des acides gras. *Comm. 5e Sym. International d'Œnologie*, « Actualités Œnologiques 95 ». Bordeaux, 15-17 juin 1995.

KING S.W. and BEELMAN R.B., 1986. Metabolic interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and *Leuconostoc œnos* in a model juice/wine system. *Am. J. Enol. Vitic.*, **37**, n° 1, 53-60.

LAFON-LAFOURCADE S., GENEIX C. and RIBÉREAU-GAYON P., 1984. Inhibition of alcoholic fermentation of grape must by fatty acids produced by yeast and their elimination by yeast ghosts. *Appl. Env. Microbiol.*, **47**, 1246-1249.

LANGE H., BAVOUZET J. M., TAILLANDIER P. and DELORME C., 1993. Systematic error and comparison of four methods for assessing the viability of *Saccharomyces cerevisiae* suspensions. *Biotechnol. Tech.*, **7**, 113-228.

LEMARESQUIER H., 1987a. Inter-relationship between strains of *Saccharomyces cerevisiae* from Champagne area and lactic acid bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.*, **4**, 91-94.

LEMARESQUIER H., 1987b. Interaction levures-bactéries. *Exposé « Congrès National des Œnologues »*, Paris, 22 mai 1987. R.F. Œ., 109, 57-60.

LONVAUD-FUNEL A., JOYEUX A. and DESENS C., 1988a. Inhibition of malolactic fermentation of wines by products of yeast metabolism. *J. Sci. Food. Agric.*, **44**, 183-191.

LONVAUD-FUNEL A., MASCLEF J.Ph., JOYEUX A. et PARASKEVOPOULOS Y., 1988b. Etude des interactions entre levures et bactéries lactiques dans le moût de raisin. *Connaiss. Vigne Vin*, **22**, n° 1, 11-24.

RAMON-PORTUGAL F., DELIA-DUPUY M.L., SCHNEIDER G. and STREHAIANO P., 1994. Yeast killer activity : a quantitative study. *Biotechnol. Tech.*, **8**, n° 11, 797-804.

STRASSER de SAAD A. M. and MANCA de NADRA M. C., 1989. Factors affecting the cellular growth and malolactic activity in *Leuconostoc œnos* strains isolated from Cafayate (Argentina) wines. *Microbiol. Alim. Nut.*, **7**, 67-72.

STREHAIANO P., 1984. Phénomènes d'inhibitions et fermentation alcoolique. *Thèse d'état*, INP Toulouse.

WIBOWO D., FLEET G.H., LEE T.H. and ESCHENBRUCH R.E., 1988. Factors affecting the induction of malolactic fermentation in red wines with *Leuconostoc œnos*. *J. Appl. Bacteriol.*, **64**, 421-428.

Manuscrit reçu le 27 février 1996 ;
accepté pour publication le 15 mai 1996

©Vigne et Vin Publications Internationales (Martillac, France)