Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin, 1990, **24,** N° 4, 157-166.
Connaissance de la Vigne et du Vin.

ÉTUDE DE LA LYSE DE *LEUCONOSTOC ŒNOS*

Sandrine GARBAY et Aline LONVAUD-FUNEL

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

Résumé : *La lyse de* Leuconostoc œnos *a été étudiée en suspension dans l'eau et dans une solution synthétique (pH 3,5; alcool 11 % v/v, acide tartrique 4 g/l). Elle a été mesurée par deux méthodes basées sur la libération de constituants cellulaires (mesure à 210 mm) et sur la diminution de l'opacité de la solution (mesure à 600 nm). Les cellules en phase de croissance exponentielle se lysent plus facilement que les cellules prélevées pendant les autres phases du cycle cellulaire.*

L'éthanol dans le milieu de suspension augmente la lyse de cellules cultivées dans le milieu standard. Par contre, le phénomène est plus limité dans la solution acide et alcoolisée que dans l'eau, sauf pour les cellules cultivées en présence d'acides gras insaturés où l'on observe le résultat inverse.

La désorganisation des membranes et l'activité autolytique des cellules dépendent à la fois des conditions de culture des bactéries et du milieu dans lequel elles sont mises en suspension.

INTRODUCTION

Les échecs rencontrés lors de l'inoculation des vins par les bactéries lactiques industrielles, *Leuconostoc œnos,* sont liés à une perte rapide de la viabilité des cellules. L'efficacité des levains malolactiques est augmentée par une étape de réactivation, assurant aux cellules un meilleur état physiologique (CARRE, 1982; LAFON-LAFOURCADE et *al.,* 1983) et par le traitement préalable des vins par les enveloppes cellulaires de levure (LONVAUD-FUNEL et *al.,* 1985).

L'altération des membranes bactériennes par des constituants du vin, notamment l'éthanol et certains acides gras, est l'une des hypothèses retenues pour expliquer la chute de viabilité des bactéries inoculées au vin (LONVAUD-FUNEL et *al.,* 1988).

Les lipides et les acides gras qui les constituent, varient selon les espèces bactériennes et les conditions de leur culture. Les espèces capables d'une meilleure survie dans le vin peuvent modifier leur constitution lipidique mieux que les autres (DESENS, 1989; LONVAUD-FUNEL et DESENS, 1990).

En cas de perturbation de son métabolisme, dans un milieu hypotonique ou en présence de substances toxiques, une cellule microbienne se lyse (STOLP et STARR, 1965). C'est la situation à laquelle sont soumises les cellules inoculées dans le vin, c'est pourquoi, dans ce travail nous étudions la lyse de *Leuconostoc œnos.*

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I — SOUCHES ET MILIEU DE CULTURE

Des souches de *Leuconostoc œnos* destinées à des utilisations industrielles (GM, Microlife Technics, et B1, Lactolabo) ont été employées dans cette étude. Elles sont cultivées à 25° C, dans le milieu semi-synthétique de CARR (1956). Dans certaines expérimentations ce milieu est additionné d'éthanol ou d'acides gras. Dans ce dernier cas le milieu est préalablement dialysé afin d'éliminer les macromolécules qui adsorbent les acides gras.

II — MESURES DE LA LYSE DES CELLULES

L'autolyse est mesurée sur les cellules récoltées par centrifugation de 30 ml de culture, et lavées dans une solution de KCl (7 g/l). Les culots sont mis en suspension dans 4 ml d'eau ou d'autres solutions dont la constitution est précisée en fonction des essais.

La mesure consiste à suivre, à deux longueurs d'onde différentes, l'évolution de la densité optique.

a) Mesure de la densité optique à 600 nm

La lyse des cellules a pour effet une diminution de la densité optique à 600 nm. Elle est mesurée par des déterminations après incubation de la suspension à 37° C pendant les intervalles de temps donnés. Cette méthode simple et rapide ne convient pas si les suspensions sont trop concentrées.

b) Mesure à 210 nm

Elle est basée sur le fait que la cellule altérée libère dans le milieu de suspension du matériel cellulaire absorbant dans l'U.V. Dans ce domaine de longueur d'onde, nous avons choisi de travailler à 210 nm où la sensibilité de la réponse est meilleure.

La détermination consiste à incuber la suspension bactérienne pendant 30 mn à 37° C et à mesurer la densité optique à 210 nm du surnageant obtenu après centrifugation.

ÉTUDE PRÉALABLE DE LA MÉTHODE DE MESURE $DO_{210\ nm}$

La concentration de matériel libéré dépend de la densité de la population traitée. Pour en tenir compte, chaque essai est étalonné : un tube identique au tube "essai" est traité à l'ébullition. La mesure de l'absorption à 210 nm pour cet échantillon correspond au maximum de matériel cellulaire qui peut être libéré par cette suspension. Le résultat A % est exprimé par le pourcentage du contenu celullaire libéré par lyse spontanée par rapport au contenu total libéré par l'ébullition :

$$A\ \% = 100 \times \frac{D\ 210\ nm\ (37°,\ 30\ mn)}{D\ 210\ nm\ (ébullition)}$$

I — ÉTUDE STATISTIQUE DES RÉSULTATS

Pour mettre au point le système d'étalonnage, une étude préalable a été réalisée. Une suspension de *Leuconostoc œnos* DO_{600} = 0,95 a été traitée à l'ébullition dans un four à micro-ondes. La densité optique DO_{210} a été mesurée après différentes durées d'ébullition. Le maximum DO_{210} est atteint à partir de 1 mn. La répétabilité du test, calculée sur des séries de 10 essais est de 3 et 4 % respectivement aux seuils de 95 et 99 %.

Une étude statistique des résultats par mesure de A % a été réalisée. Cinq suspensions bactériennes différentes ont été traitées avec pour chacune 9 à 12 répétitions (tableau I). L'intervalle de confiance de la mesure est de 2 et 3 % aux seuils de 95 et 99 % sauf dans un essai. On admet donc que l'on peut accorder une bonne fiabilité à ce test.

TABLEAU I

Mesure de l'autolyse des cellules de différentes suspensions de *Leuconostoc œnos.* Précision de la mesure.

NOMBRE D'ESSAIS	PRÉCISION CALCULÉE	
	à 95 %	à 99 %
11	39 ± 2	39 ± 3
9	33 ± 2	33 ± 3
12	33 ± 5	33 ± 7
12	86 ± 2	86 ± 3
12	44 ± 2	44 ± 3

Les chiffres représentent $A\ \% = \frac{\text{D 210 nm (37°C, 30 mn)}}{\text{D 210 nm (ébullition)}} \times 100$

II — INCIDENCE DE LA CONCENTRATION DE LA SUSPENSION BACTÉRIENNE

Le test a porté sur 3 suspensions A, B et B' plus ou moins diluées : A et B sont des souches différentes de *Leuconostoc œnos,* B et B' sont des suspensions de cellules de la même souche mais d'âge différent.

Le tableau II donne les valeurs de A % pour 3 dilutions de ces suspensions. Dans les conditions opératoires décrites et au moins jusqu'à une densité bactérienne telle que DO_{600} = 3,0, le rapport A % dépend peu de la concentration cellulaire.

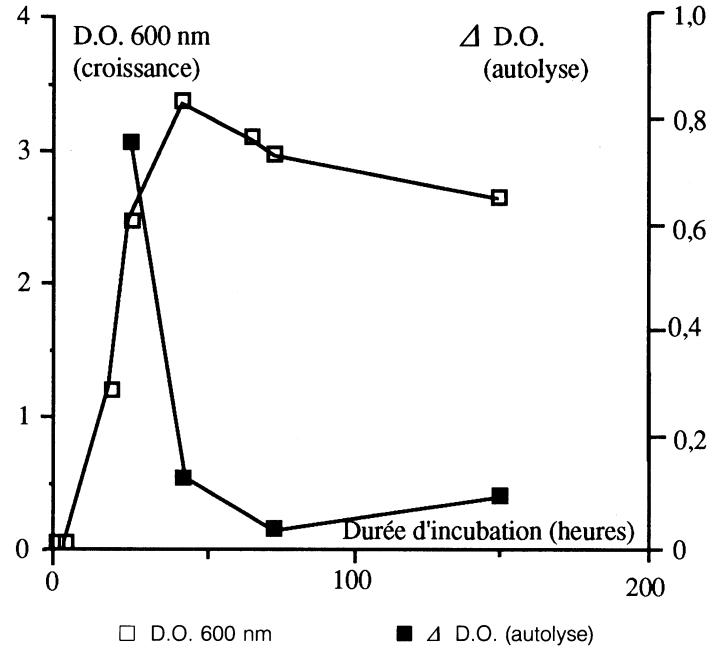


Fig. 1. — Incidence de l'âge de la culture sur l'autolyse mesurée à 600 nm après 3 heures d'incubation dans l'eau.

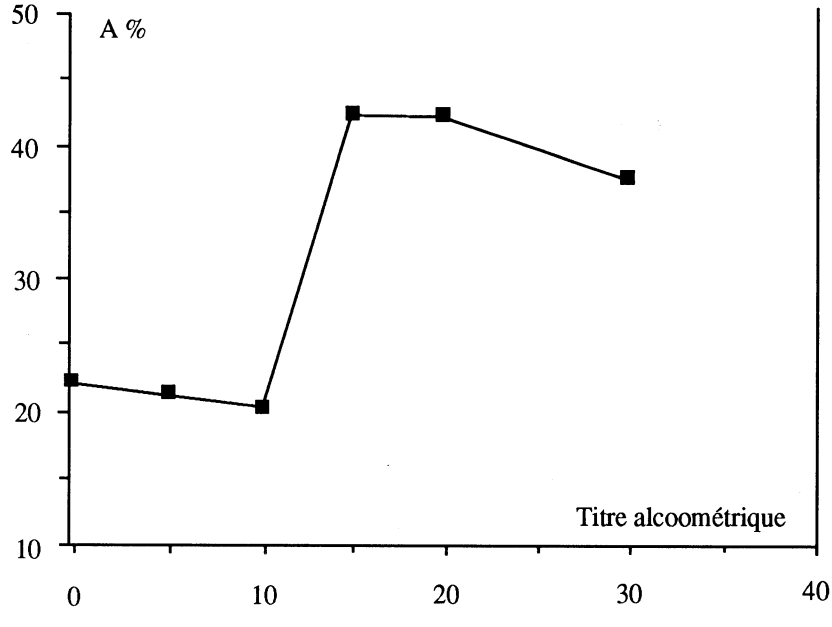


Fig. 2. — Incidence du titre alcoométrique de la suspension sur la lyse de *Leuconostoc œnos*.

TABLEAU II

Valeur de A % pour des suspensions bactériennes de concentrations différentes.

	DENSITÉ OPTIQUE DO_{600}	A %
Souche A	0,3	66
	0,5	64
	0,7	66
Souche B	1,0	29
	2,0	27
	3,0	24
Souche B'	1,0	40
	2,0	30
	3,0	40

INCIDENCE DE QUELQUES FACTEURS SUR LA LYSE DE *LEUCONOSTOC ŒNOS*

I — INFLUENCE DE L'AGE DES CELLULES

L'autolyse de cellules cultivées pendant 1, 2, 3 et 7 jours a été mesurée à 600 nm sur un intervalle de temps de 3 heures. Les cellules jeunes prélevées en phase de croissance rapide sont les plus rapidement lysées (figure 1). Les cellules en phase de déclin (7 jours) sont aussi plus sensibles que les cellules de la phase stationnaire (3 jours).

De même, d'après la mesure à 210 nm (tableau III) les cellules perdent plus facilement leur contenu cellulaire après la phase de croissance active, c'est-à-dire après 3 jours de culture.

TABLEAU III

Évolution du rapport A % en fonction de l'âge des cellules.

SOUCHE	AGE DE LA CULTURE (jours)			
	3	4	6	10
A	30	55	58	81
B	33	35	44	48
C	39	46	51	49
D	32	40	44	50
E	55	60	—	65

II — NATURE DU MILIEU DE SUSPENSION DES CELLULES

Toutes les mesures précédentes ont été réalisées sur des suspensions bactériennes dans de l'eau. D'autres milieux ont été utilisés, contenant de l'éthanol ou non. Le tableau IV rapporte les résultats de l'autolyse mesurée à 600 nm d'une culture de 4 jours de *Leuconostoc œnos,* dans l'eau et dans une solution synthétique (acide tartrique : 4 g/l, alcool : 11 %, pH 3,5) rappelant les conditions rencontrées dans le vin.

L'autolyse est plus importante dans l'eau que dans la solution synthétique; la diminutions de DO_{600} est 3 fois plus importante, 15 % au lieu de 5 %.

TABLEAU IV

Autolyse de *Leuconostoc œnos* en suspension dans l'eau ou une solution synthétique. (Mesure à 600 nm).

MILIEU	DURÉE D'INCUBATION			Δ DO 3 h
	0	45 min.	3 h	
Eau	1,017	0,908	0,868	0,149
Solution synthétique	0,997	0,968	0,952	0,045

D'un autre côté dans une autre série d'essais, les valeurs de A % pour des suspensions dans de l'eau et dans des solutions de KCl à 7 g/l, d'éthanol à 5 % et 10 % sont voisines. Par contre, entre 10 et 15 % d'éthanol les résultats sont totalement différents (figure 2).

III — INCIDENCE DE L'ADDITION D'ACIDES GRAS DANS LE MILIEU DE CULTURE

Le milieu de CARR — dialysé pour éviter la présence de macromolécules — a été additionné des acides palmitoléique $C_{16:1}$ (0,5 mg/l) et oléique $C_{18:1}$ (3 mg/l). La croissance de *Leuconostoc œnos* dans ces milieux est activée, et la population totale y est supérieure. L'autolyse importante après 24 heures de culture (figure 3) passe par un minimum au 3^{e} jour puis augmente à nouveau après 7 jours, confirmant les résultats antérieurs. On remarque, en outre, que l'autolyse est plus rapide pour les cellules en phase de déclin cultivées en présence des acides gras (figure 3). Ces mêmes bactéries ont été testées en suspension dans l'eau et dans la solution synthétique (figure 4). Les cellules du milieu témoin, en phase plus active de croissance au 2^{e} jour, s'autolysent plus lentement dans la solution synthétique comme dans l'essai du tableau IV. Par contre, quel que soit leur âge, les cellules cultivées en présence de $C_{16:1}$ et $C_{18:1}$ sont toujours plus rapidement lysées dans la solution synthétique.

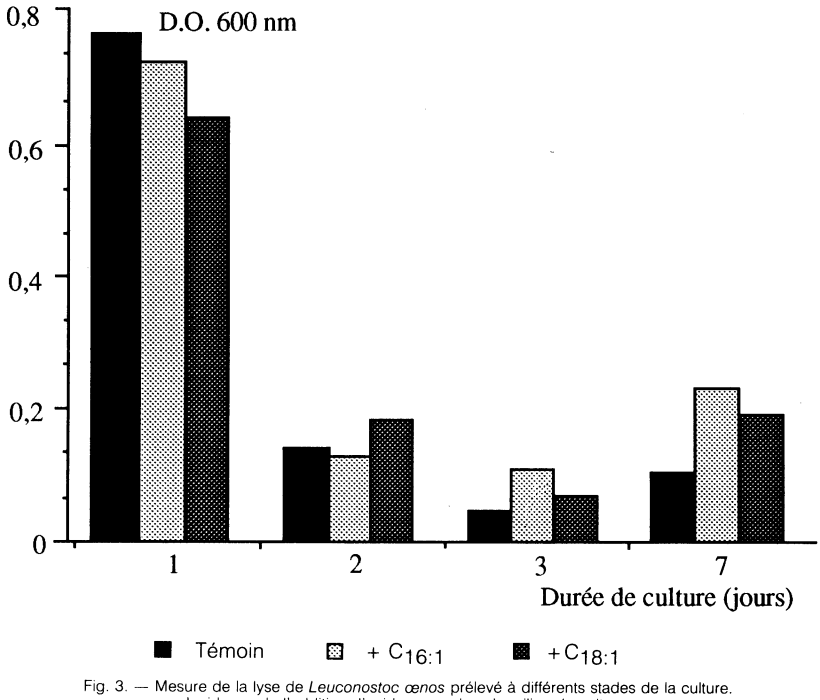
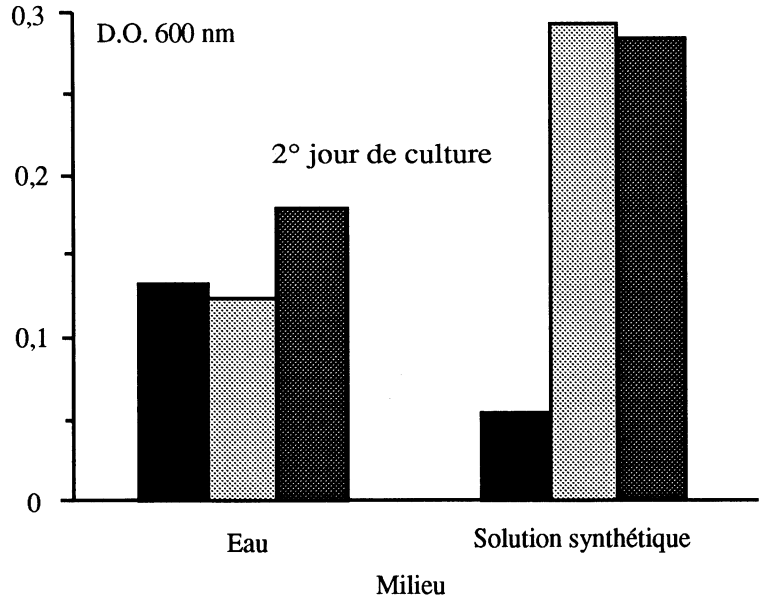


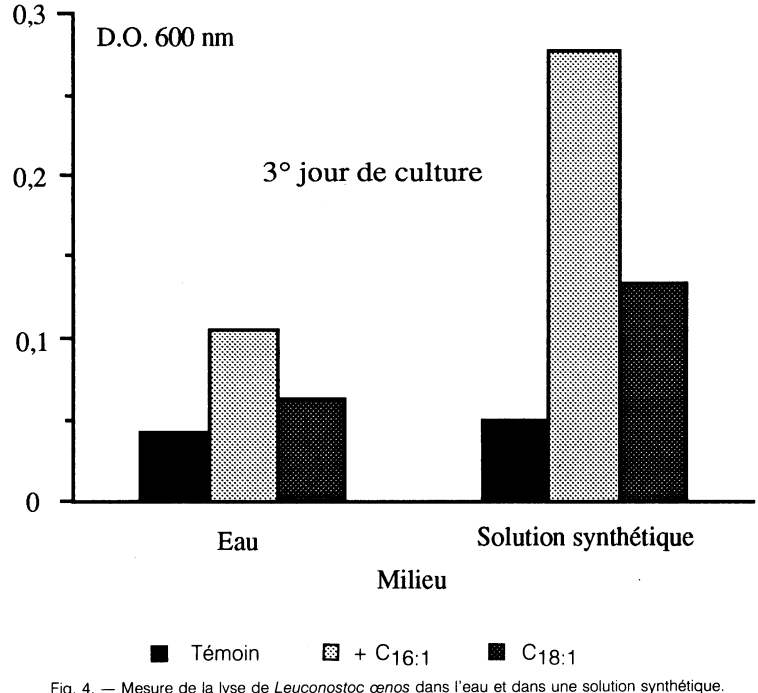
Fig. 3. — Mesure de la lyse de *Leuconostoc œnos* prélevé à différents stades de la culture. Incidence de l'addition d'acides gras dans le milieu de culture.

DISCUSSION

La lyse des cellules de *Leuconostoc œnos* a été suivie par deux méthodes basées sur les données suivantes. D'une part la diminution de densité optique à 600 nm rend compte de la lyse des enveloppes cellulaires et de la perte du contenu cellulaire. D'autre part le relargage du matériel intracellulaire, conséquence de la détérioration de la membrane est mesuré dans l'ultraviolet où les acides nucléiques et les protéines absorbent respectivement avec des maxima à 260 et 280 nm. La différence d'absorption du milieu après lyse montre en réalité un écart supérieur à 210 nm correspondant aux liaisons peptidiques. A cette longueur d'onde les mesures se sont avérées plus sensibles. L'étude statistique de répétitions de cette méthode a montré une bonne fiabilité. La détermination du pourcentage A % (210 nm) a pour principal intérêt de permettre la comparaison de résultats pour des densités de populations initiales différentes. Ce n'est pas le cas de la mesure à 600 nm dont le résultat n'est pas linéaire pour des populations élevées.

La lyse de *Leuconostoc œnos* dépend du stade physiologique des cellules. Elle est beaucoup plus rapide pour des cellules en phase de croissance active. Le phénomène de rupture des enveloppes cellulaires se produit lorsque le métabolisme des cellules est très perturbé. Mais l'autolyse proprement dite, doit être définie, selon STOLP et STARR (1965), comme le résultat d'enzymes intracellulaires, les autolysines.





■ Témoin ▩ + $C_{16:1}$ ■ $C_{18:1}$

Fig. 4. — Mesure de la lyse de *Leuconostoc œnos* dans l'eau et dans une solution synthétique. Incidence de l'addition des acides gras dans le milieu de culture. Mesures réalisée au 2e et au 3e jour de culture.

D'après les mêmes auteurs, il existe, pendant la période de croissance, un équilibre entre les activités de synthèse et d'hydrolyse du peptidoglycane. Lorsque les cellules se multiplient activement, les autolysines, responsables de l'étape d'hydrolyse, sont donc très actives. Elles deviennent prépondérantes dans certaines conditions et il en résulte alors une lyse plus intense que dans la phase stationnaire par exemple. D'ailleurs chez *Streptococcus faecalis* le système autolytique n'est plus actif dans la phase stationnaire (STOLP et STARR, 1965). LORTAL et *al.,* (1989) décrivent ce même phénomène chez *Lactobacillus helveticus* et NISKASAARI (1989) chez *Lactobacillus lactis ssp cremoris.* Ce dernier identifie l'autolysine à une endo-N-acétylmuramidase.

Dans un milieu acide et alcoolisé à 11 %, l'autolyse est moins active. L'un des paramètres, alcool ou acidité, ou les deux inhibent le processus alors que l'éthanol seul à partir de 10 % le stimule fortement. Le phénomène global observé peut être attribué à deux sortes d'activités. L'une déjà décrite, hydrolyse le peptidoglycane et supprime la rigidité de la paroi qui ne s'oppose plus à la pression osmotique intracellulaire. Cette activité enzymatique peut être inhibée à pH acide. L'autre, révélée par l'action de l'éthanol est une altération dans l'assemblage des différents constituants de la membrane elle-même entraînant une perturbation de son métabolisme et la fuite de constituants intracellulaires. En effet, d'après KOCH et DOYLE (1986), le maintien du métabolisme énergétique de la membrane pourrait inhiber l'activité autolytique. L'éthanol donc en détruisant l'équilibre membranaire provoquerait l'autolyse.

D'autre part, CARSON et DANEO-MOORE (1980) ont étudié l'activité bactériolytique des acides gras insaturés $C_{16:1}$ et $C_{18:1}$ qui diminuent la croissance totale de *Streptococcus faecalis* en augmentant la lyse des cellules en cours de leur multiplication. Pourtant ces acides sont inhibiteurs de l'activité des autolysines, c'est donc par un autre effet qu'ils détruisent la cellule. Les auteurs concluent qu'en s'intégrant en excès dans la membrane, ils la déstabilisent directement. L'effet serait alors du même ordre que celui de l'éthanol. D'ailleurs chez *Leuconostoc œnos,* on observe effectivement ce même comportement des cellules cultivées en présence de $C_{16:1}$ et $C_{18:1}$. Elles sont plus facilement lysées surtout dans la solution synthétique. Dans ce cas, à l'instabilité des membranes due à l'intégration des acides gras insaturés s'ajoute l'acidité du milieu et la présence d'éthanol. Dans ces conditions, le maintien du gradient de proton essentiel au fonctionnement membranaire est plus difficile. La rupture de l'équilibre énergétique qui s'ensuit active les autolysines.

Mais la constitution en acides gras n'est pas seule en cause puisque le diphosphatidylglycérol, ou cardiolipine, est aussi un inhibiteur de l'autolyse de *Lactobacillus lactis* (NISKASAARI, 1989).

CONCLUSION

Ce travail permet d'interpréter des observations antérieures, et notamment le fait que la résistance au choc lors de l'inoculation des vins est meilleure pour des cellules en phase stationnaire. C'est le moment où la lyse cellulaire est la plus difficile.

En outre, il est établi que des cellules dont les membranes ont été modifiées par les conditions de culture se lysent plus ou moins facilement selon le milieu de suspension. Ces résultats pourront être mis à profit dans la préparation de bactéries mieux adaptées à l'inoculation des vins.

Manuscrit reçu le 25 février 1991 ; accepté pour publication le 1er mars 1991.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

CARR J.G., 1956. The occurence and role of Lactic Acid Bacteria in cider making. *Thesis,* University of Bristol.

CARRE E., 1982. Recherches sur la croissance des bactéries lactiques en vinification. Désacidification biologique des vins. *Thèse de 3e cycle Oenologie-Ampélologie.* Université de Bordeaux II.

CARSON D.D., DANEO-MOORE L., 1980. Effects of fatty acids on lysis of *Streptococcus faecalis. J. Bacteriol.,* **141,** 1122-1126.

DESENS Catherine, 1989. Les phénomènes d'inhibition des bactéries lactiques du vin. Relation avec la constitution lipidique des membranes. *Thèse Doctorat.* Université de Bordeaux II, Mention Oenologie-Ampélologie.

KOCH A.L., DOYLE R.J., 1986. The growth strategy of the gram-positive rod. *FEMS Microbiol. Rev.,* **32,** 247-254.

LAFON-LAFOURCADE Suzanne, CARRE E., LONVAUD-FUNEL Aline et RIBÉREAU-GAYON P., 1983. Induction de la fermentation malolactique des vins par inoculation d'une biomasse industrielle congelée de *Leuconostoc œnos* après réactivation. *Conn. Vigne Vin,* **17,** 55-71.

LONVAUD-FUNEL Aline et DESENS Catherine, 1990. Constitution en acides gras des membranes des bactéries lactiques du vin. Incidence des conditions de culture. *Sci. Aliments,* **10,** 817-829.

LONVAUD-FUNEL Aline, DESENS Catherine et JOYEUX Annick, 1985. Stimulation de la fermentation malolactique par l'addition au vin d'enveloppes cellulaires de levure et différents adjuvants de nature polysaccharidique et azotée. *Conn. Vigne Vin,* **19,** 229-240.

LONVAUD-FUNEL Aline, JOYEUX Annick et DESENS Catherine, 1988. The inhibition of malolactic fermentation of wines by products of yeast metabolism. *J. Food Sci. Technol.,* **44,** 183-191.

LORTAL S., BOYAVAL P. et VAN HEIJENOORT, 1989. Influence de plusieurs facteurs sur l'autolyse de *Lactobacillus helveticus* CNRZ 414. Lait, **69,** 223-231.

NISKASAARI K., 1989. Characteristics of the autolysis of variants of *Lactococcus lactis subsp cremoris. J. Dairy Res.,* **56,** 639-649.

STOLP H. et STARR M.P., 1965. Bacteriolysis. *Ann. Rev. Microbiol.,* **19,** 79-105.