Connaissance Vigne Vin 1976, **10**, N° 4, 409-426.

FORMATION DU BUTANOL-2 PAR LES BACTERIES LACTIQUES ISOLEES DU VIN

A. BERTRAND et K. SUZUTA *

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

INTRODUCTION

Les alcools supérieurs du vin ne proviennent pas du jus de raisins dans lequel ils sont présents à l'état de traces ; ils apparaissent principalement au cours de la fermentation alcoolique. Ils sont constitués essentiellement par les alcools amyliques (méthyl-3 butanol-1 et méthyl-2 butanol-1) et l'alcool isobutylique (méthyl-2 propanol-1). Le propanol-1, le phényl-2 éthanol et le tyrosol se trouvent aussi en quantités assez importantes. Une vingtaine d'autres substances ont été décelées mais sont présentes à des concentrations très faibles souvent inférieures à 1 mg par litre.

Le butanol-2, identifié par WEBB et **al.** (1952) dans une huile de fusel de vin ne se rencontre pas, tout au moins à dose un peu élevée, dans les vins eux-mêmes. Cependant USSEGLIO-TOMASSET (1964) l'a mis en évidence dans un distillat de vin au taux de 0,11 p. 100 des alcools supérieurs totaux et dans des piquettes à teneurs de 0,73 à 19,4 p. 100 des alcools supérieurs totaux.

L'un de nous, BERTRAND (1975) a montré que le butanol-2 est particulièrement abondant dans les brandies de mauvaise qualité, de 2 à 15 g par hl d'alcool pur (5 g en moyenne) ; par contre, il est très rarement rencontré dans le Cognac et l'Armagnac et pratiquement toujours à des concentrations inférieures à 2 g par hl d'alcool pur, il a confirmé, en outre, l'absence quasi générale de cet alcool dans le vin.

Le but de ce travail est de rechercher l'origine du butanol-2 et les facteurs de sa formation, afin, éventuellement d'y remédier puisqu'il

* Adresse actuelle : Central Research Institute SUNTORY Ltd
475 Hirase, Shimamoto-Cho, Mishima-Gun, OSAKA 618 (Japon).

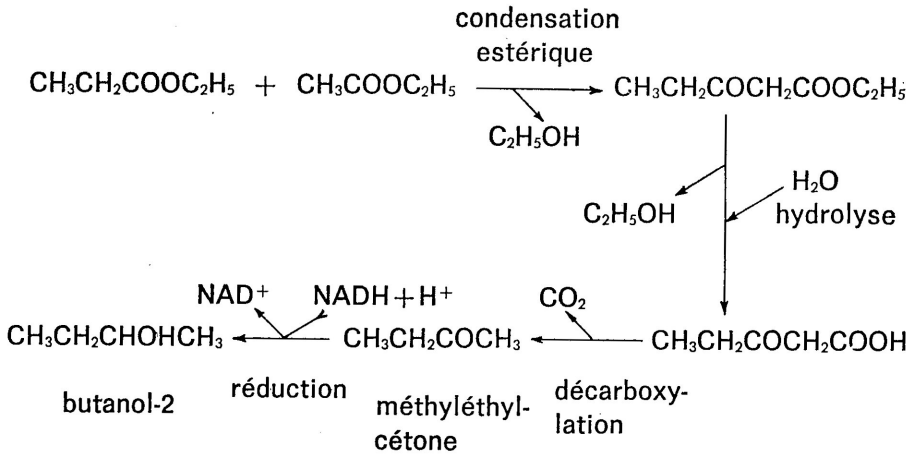
semble que sa présence soit en relation avec la mauvaise qualité du produit.

Avant d'exposer nos résultats nous préciserons les voies biochimiques qui concourrent à la formation du butanol-2 dans les liquides fermentés et l'influence de ce corps sur la qualité des produits qui le contiennent.

ORIGINE DU BUTANOL-2 DANS LES EAUX-DE-VIE

On considère que le butanol-2 peut avoir deux précurseurs immédiats éventuels dans les liquides fermentés : a) la méthyl-éthylcétone ; b) le butanediol-2,3.

a) La méthyl-éthylcétone provient de la condensation d'une molécule d'acétate d'éthyle et d'une molécule de propionate d'éthyle. Par décarboxylation et réduction, au cours de la fermentation alcoolique ou de la fermentation malolactique il est transformé en butanol-2 par les microorganismes possédant la déshydrogénase spécifique :



Notons que la possibilité de cette voie est faible car le propionate d'éthyle ne se trouve dans les vins qu'à concentration peu élevée.

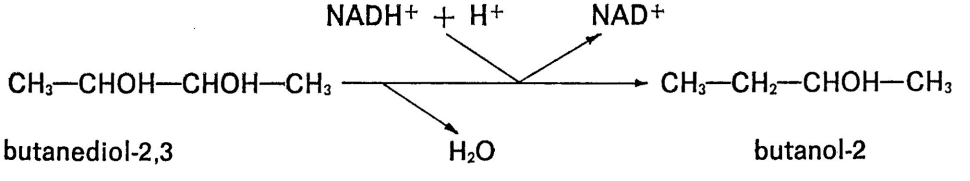
b) Le butanediol-2,3 apparaît au cours de la fermentation alcoolique ; on le trouve couramment dans les vins à la dose de 0 à 0,7 g par litre, parfois on peut relever des teneurs de 0,33 à 1,35 g par litre. On sait (RIBÉREAU-GAYON et **al.**, 1975) que le butanediol-2,3 est formé dans le moût en fermentation à partir de l'acide pyruvique provenant de la fermentation glycéro-pyruvique.

Une étude détaillée en a été faite à Bordeaux entre 1936 et 1955 par GENEVOIS (1936), PEYNAUD (1947), RIBÉREAU-GAYON et **al.** (1955) et LAFON (1955). TAJEMA et YOSHIZUME (1973) dans un milieu riche en sel ont montré que l'activité de la glycéro-3 phosphatedéshydrogénase augmente alors que diminue le taux d'ATP et la production de glycérophosphate déshydrogénase se trouve stimulée. En conséquence, le NADH nécessaire à la réaction qui conduirait la dihydroxyacétone phosphate au glycérophosphate doit être compensée par la transformation du glycéraldéhyde phosphate en acide diphospho-1,3 glycérique. La formation d'éthanol se trouve freinée par le manque de NADH et l'activité réduite de l'alcool-déshydrogénase. L'excès d'acide pyruvique, qui en découle, est transformé en acétoïne par la voie non oxydative.

Dès que la formation du glycérol diminue en fin de fermentation notamment, commence la transformation de l'acétoïne en butanediol-2,3, couplée avec la réaction de l'éthanol à l'acétaldéhyde qui libère suffisamment de NADH. La formation du butanediol-2,3 provoque, en conséquence, l'inhibition de la formation de l'éthanol.

Notons que CHARPENTIER (1956) a montré que les bactéries lactiques peuvent former du butanediol-2,3 à partir de l'acide citrique.

Certaines bactéries lactiques forment vraisemblablement le butanol-2 à partir du butanediol-2,3, par réduction avec libération d'une molécule d'eau.



INFLUENCE DU BUTANOL-2 SUR LA QUALITE DES EAUX-DE-VIE

La présence du butanol-2 dans une eau-de-vie de vin, à dose relativement élevée (supérieure à 5 g par hl d'alcool pur) témoigne d'une qualité médiocre.

En effet, les eaux-de-vie de vin circulant sous acquit jaune d'or (Armagnac et Cognac) n'ont pratiquement jamais plus de 2 g de butanol-2 par hl d'alcool pur car les produits de qualité secondaire sont écartés

après la dégustation. Par contre, en ce qui concerne les brandies, il y a quelques années, leur teneur en butanol-2 était fréquemment élevée (supérieure à 10 g par hl d'alcool pur) ; mais la sélection des eaux-de-vie de meilleure qualité par les distillateurs a permis de diminuer ces teneurs.

Il serait faux de dire que le butanol-2 est un composé chimique responsable d'odeurs et de goûts désagréables ; d'ailleurs, son seuil de perception organoleptique, dans une solution d'alcool pur à 50 p. 100, s'est révélé supérieur à 50 g par hl d'alcool pur, (valeur très supérieure aux teneurs moyennes dans les brandies). On peut donc considérer, dans une eau-de-vie de vin, la présence de butanol-2 comme le témoin de l'altération du produit soumis à la distillation ; mais ce constituant n'est pas lui-même responsable de la mauvaise qualité du produit fini.

HYPOTHESE DE TRAVAIL DANS LA RECHERCHE DE L'ORIGINE DU BUTANOL-2 DES EAUX-DE-VIE

Les eaux-de-vie d'appellation contrôlée, tels Cognac et Armagnac, diffèrent des brandies par deux points essentiels, d'une part les méthodes de distillation, d'autre part la qualité des vins.

Les eaux-de-vie résultent de deux distillations successives en ce qui concerne le Cognac, d'une distillation semi-continue pour l'Armagnac : les brandies sont produits par distillation continue à l'aide d'une colonne. D'un autre côté, les vins destinés à l'élaboration du Cognac ou de l'Armagnac s'obtiennent par la vinification en blanc de cépages blancs bien déterminés. L'origine des vins destinés aux brandies n'est pas réglementée ; en conséquence, sont utilisés n'importe quels vins, blancs ou rouges, généralement de qualité inférieure.

Les vins destinés à la distillation sont conservés quelques temps sur lies et sont généralement distillés en présence de celles-ci, de sorte qu'il n'est pas exclu que des substances volatiles provenant de ces lies puissent être libérées au cours du chauffage.

Notre recherche sur l'origine du butanol-2 a été basée sur deux hypothèses de travail différentes : a) Ce corps peut être le produit du métabolisme de bactéries appartenant au genre **Clostridium** dont certaines ont été isolées des lies de vin ; b) Il peut provenir de la dégradation du butanediol-2,3 par les bactéries lactiques. Cette capacité des bactéries lactiques appartenant à l'espèce **Lactobacillus brevis** a été mise en évidence par HIEKE et VOLLBRECHT (1974). Ces microorganismes peuvent former de 13 à 810 mg par litre de butanol-2.

L'expérimentation effectuée avec **Clostridium** isolé sur lie de vin s'est avérée infructueuse. Cette bactérie se développe à un pH optimum de 7 ; les conditions de pH des lies des vins ou des lies lui sont particulièrement défavorables. En outre, dans un milieu nutritif complet à base de jus de raisins dilué, enrichi en extrait de levures, **Clostridium** n'a pas formé de butanol-2 même à pH 7. Nous avons donc abandonné cette hypothèse.

Nous avons alors repris le travail de HIEKE et VOLLBRECHT (1974) en l'étendant à un grand nombre de souches de bactéries lactiques isolées de vins de Bordeaux par Mme SAPIS-DOMERCQ. Nous avons ainsi testé 80 souches de la collection de l'Institut d'Œnologie appartenant aux formes coques et bacilles et aux groupes homo et hétérofermentaires. Nous avons étudié la capacité de ces souches à former du butanol-2, à partir du butanediol-2,3 et du glucose, en milieu synthétique, en fonction de différents facteurs, les souches ainsi sélectionnées ont ensuite été expérimentées dans le vin sous différentes conditions.

PROTOCOLE D'ESSAI

Les bactéries testées en milieu synthétique sont indiquées dans le tableau I et comportent 37 bacilles hétérofermentaires, 12 bacilles homofermentaires, 24 coques hétérofermentaires et 7 coques homofermentaires.

Elles ont été étudiées par série de vingt souches dans des conditions expérimentales identiques. Seules les souches C_{12}, VZ_4 et Al_{31} capables de former du butanol-2 en milieu synthétique ont été ensuite expérimentées dans le vin.

Milieux : Le milieu de préculture est un jus de raisins dilué deux fois, additionné d'extrait de levure (5 g par litre) et ajusté à pH 4.6. Il permet une croissance optimum.

Le milieu synthétique pour l'étude de la formation du butanol-2 est le milieu de Carr modifié. dont la composition de base est donnée dans le tableau II. Plusieurs formules ont été essayées correspondant à des taux différents de butanediol-2,3 et de glucose.

Le vin rouge utilisé présente les caractéristiques suivantes : titre alcoométrique 12 °GL ; pH 3,5 ; sucre réducteur 1,7 g par litre ; butanediol-2,3 0,59 g par litre.

TABLEAU I

Bactéries lactiques étudiées

COQUES HOMOFERMENTAIRES

Pediococcus cerevisiæ ou vini

P— : Bv 211 ; Cv 116 ; Ja 2 ; S 51 ; SG 1.
X+ : ATCC 8042 ; G 517.

COQUES HETEROFERMENTAIRES

Leuconostoc gracile

P— : BC 33 ; Bg 12 ; Cf 34 ; D 1 ; E 81 ; J 4 ; La 1.

Leuconostoc oinos

P+ : Ft 2 ; J 6 ; Lv 2.
A+ : Ag 23 ; B 2 ; Ba 11 ; Be 22 ; Bj 23 ; BV 1 ; F 165 ; It 4 ; J 1 ; P 6 ; R 7 ; S 6.
X+ : Co 11 ; Sc 122.

BACILLES HOMOFERMENTAIRES

P— : A 11306 ; Cv 221 ; E 1 ; I 2 ; JF 1 ; Q 16 ; R 6 ; U 565.

Lactobacillus casei

X+ : Ch 22 ;
P— : G 151.

Lactobacillus plantarum ou arabinosus

A+ : A 8014 ; B 4.

BACILLES HETEROFERMENTAIRES

Lactobacillus brevis

P+ : A 11577 ; A 131 * ; Ba 14 ; BC 61 ; Be 21 ; C 12 * ; Co 111 ; E 42 ; G 23 ; Gl 1 ; Ir 1 ; L 5 ; Lv 3 ; Lx 174.5 ; Mi 12 ; PC 22 ; PM 3 ; O 193 ; Ra 21 ; Sm 4 ; U 561 ; VF 1 ; VZ 4 *.

Lactobacillus desidiosus

A+ : Co 23 ; Cv 241 ; L 9.

Lactobacillus fructivorans

P— : A 8288 ; Be 14 ; E 26 ; Ra 11.

Lactobacillus hilgardii

X+ : A 8290 ; B 1 ; Bc 2 ; LL 2 ; Lt 2 ; Ra 25 ; Y 1.

* : Souches expérimentées dans le vin.

TABLEAU II

Composition du milieu synthétique pour l'étude de la formation de butanol-2 (milieu de Carr modifié)

	Teneur (g par litre)
Casamino acids Difco	5
Yeast extract Difco	44
Phosphate de potassium monopotassique	2
Sulfate de magnésium	0,125
Chlorure de calcium	0,125
Sulfate de manganèse	0,0025
Perchlorure de fer	0,0025
le pH est ajusté à 4,5 avec l'acide chlorhydrique dilué au 1/2	

Conditions expérimentales : Le milieu synthétique, est réparti en flacons de 250 ml, bouchés « limonade » à raison de 200 ml par flacon et stérilisé à 120 °C pendant 15 mn.

Après refroidissement, on ensemence chaque flacon avec un volume de 2 à 10 ml d'un levain de 4 à 5 jours, préparé dans le milieu de préculture, et on porte à 30 °C.

Après une durée d'incubation de 7 à 26 jours, les milieux sont soumis à l'analyse. La totalité des souches (80) a été testée dans le milieu synthétique, non glucosé, contenant 5 g de butanediol-2,3 par litre.

Les trois souches sélectionnées pour leur capacité, à former le butanol-2, à partir du butanediol-2,3, ont été cultivées dans le même milieu, mais dans des conditions de concentration en glucose et butanediol-2,3 variables; respectivement : glucose 2 et 7 g par litre ; butanediol-2,3, 1 et 5 g par litre ; ou à la fois : glucose 5 g par litre, butanediol-2,3, 1 g par litre.

Dans le milieu dépourvu de glucose on prévoit un ensemencement 4 à 5 fois plus élevé pour parer à une absence de croissance bactérienne.

Pour l'expérimentation dans le vin, les bactéries sont précultivées dans le milieu optimum de croissance. Après 4 à 5 jours de développement

à 30 °C, la masse bactérienne est recueillie par centrifugation à 9 000 t par mn à 0 °C, lavée, remise en suspension dans de l'eau stérile. C'est à partir de cette suspension qu'est effectué l'ensemencement du vin à raison de 1,6 g de biomasse fraîche par litre. Le vin, non stérilisé, est réparti en trois lots ; chacun reçoit respectivement des doses différentes de butanediol-2,3 : 0, 1 et 5 g par litre. Chaque lot est ensuite divisé en trois parts, lesquelles sont portées à pH 3,2, 3,8 et 4,5.

Chaque lot est alors distribué en bouteilles de 250 ml bouchées « limonade », stérilisées préalablement par chauffage à 120 °C pendant 15 mn à l'autoclave. Le vin témoin est préservé des contaminations bactériennes par chauffage à 40 °C au bain-marie.

Les flacons sont mis à incuber à 25 °C. Après 12 jours les milieux sont soumis à l'analyse.

ANALYSE DU BUTANEDIOL-2,3 ET DU BUTANOL-2 PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

Les dosages du butanol-2 et du butanediol-2,3 ont été effectués par injection directe du milieu dans un chromatographe en phase gazeuse « Varian 1 200 » équipé d'un détecteur à ionisation de flamme.

Les étalons internes utilisés pour améliorer la précision des dosages sont le méthyl-4 pentanol-2, à 250 mg par litre en solution aqueuse pour le dosage du butanol-2 et l'hydroxy-3 butyrate d'éthyle, à 5 g par litre dans une solution hydroalcoolique à 20 p. 100, pour le dosage du butanediol-2,3. Les solutions d'étalons internes sont rajoutées, à raison de 10 p. 100 (v/v) aux milieux à analyser et aux solutions synthétiques de référence (solutions aqueuses contenant 25 mg de butanol-2 ou 5 g de butanediol-2,3 par litre).

Le butanol-2 a été dosé en utilisant une colonne classique, de 1/8^{e} de pouce de diamètre, de Carbowax 1540 enrobé, à raison de 10 p. 100 (p/p), sur Chromosorb W (60-80 mesh) préalablement activé par chauffage à 850 °C pendant 4 heures (fig. 1).

L'identification du butanol-2 produit a été confirmée par l'utilisation d'une colonne de célanèse de 7,5 m de longueur et dont le taux d'enrobage sur Chromosorb W est de 7 p. 100.

Le butanediol-2,3 a été dosé en utilisant une colonne de succinate de diéthylène glycol (D.E.G.S.) et d'acide **o**-phosphorique enrobés respectivement à 5 et à 1 p. 100 sur Gas-Chrom Q (80-100 mesh) permettant de doser séparément les deux isomères lévo et méso (fig. 2).

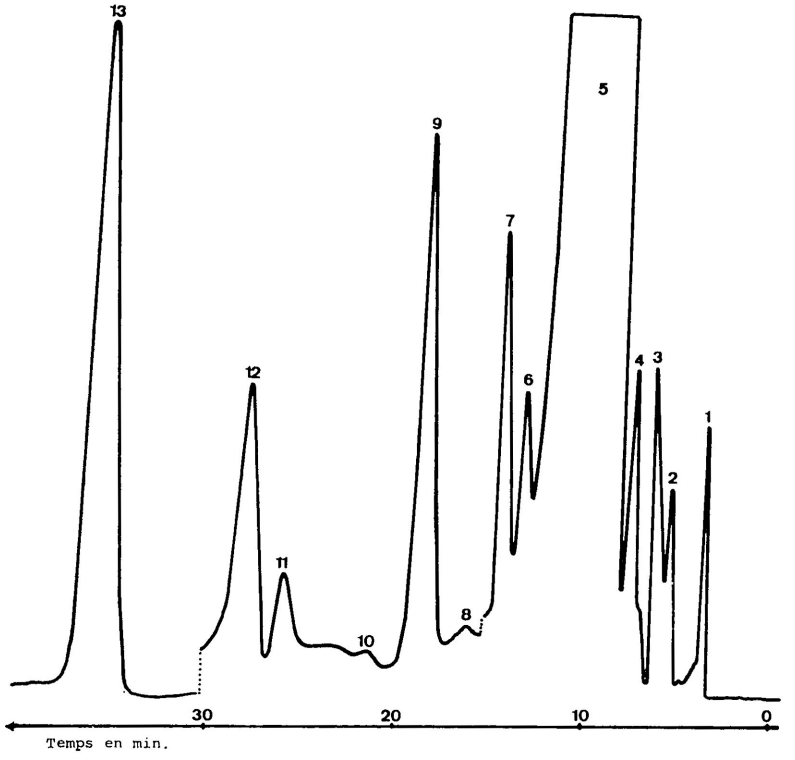


Fig. 1. — Chromatogramme obtenu par injection directe du milieu fermenté par la bactérie Al_{31}

Conditions de la chromatographie :
Colonne : C 1540, température du four : 90 °C, volume injecté : 5 µl, sensibilité : S1 x 3 mv.

Identification des pics :

1 éthanal ; 2 propanal ; 3 acétate d'éthyle + butanal ; 4 méthyl-3 butanal + méthanol ; 5 éthanol ; 6 butanol-2 ; 7 propanol-1 ; 8 inconnu ; 9 méthyl-2 propanol-1 ; 10 inconnu ; 11 butanol-1 ; 12 étalon interne ; 13 méthyl-2 butanol-1 + méthyl-3 butanol-1.

Les conditions opératoires sont résumées dans le tableau III.

RESULTATS

Une première série d'essais sur milieu de Carr modifié dépourvu de glucose et contenant des teneurs en butanediol-2,3 cinq à dix fois plus élevées que celles rencontrées dans les vins, nous a permis de sélectionner parmi 80 souches testées, 3 souches capables de former des

TABLEAU III

Caractéristiques des principales colonnes analytiques utilisées

Corps dosés		Butanol-2	Butanediol-2,3
Colonnes en acier inoxydable	phase stationnaire	Carbowax 1540 (10 p 100)	D.E.G.S. $+H_3PO_4$ (5 p 100) (1 p 100)
	support	Chromosorb W 60-80 mesh	Gas-chrom Q 80-100 mesh
	longueur	7,50 m	4 m
	diamètre extérieur	3,2 mm	3,2 mm
Températures (°C)	four	90	125
	injecteur	200	225
	détecteur	220	165
Débits (ml par mn)	azote (phase mobile)	25	24
	hydrogène	30	30
	air	350	400

quantités importantes de butanol-2 et 15 souches susceptibles d'en former des traces, dont le temps de rétention correspond sensiblement à celui du butanol-2 mais qui ne permet pas un dosage.

Pour ces quinze dernières souches, l'expérimentation a été reprise sur le même milieu mais en présence de glucose qui favorise le développement bactérien. Afin d'être en mesure de confirmer la présence du butanol-2, les essais ont été menés comparativement dans le milieu de Carr modifié, dépourvu de sucre mais enrichi en butanediol-2,3, et dans le même milieu glucosé et supplémenté en butanediol-2,3 ou seulement glucosé. Dans aucun de ces trois milieux, malgré une prolifération bactérienne, le butanol-2 n'a été suffisant pour pouvoir être dosé[e]; on peut donc considérer que ces souches sont incapables de former cette substance quel que soit le substrat, glucose ou butanediol-2,3.

Les trois souches ayant seules cette capacité appartiennent à l'espèce **Lactobacillus brevis ;** C_{12} a été isolée d'un cidre ; V Z_4 d'un vin d'Afrique du Sud, Al_{31} d'un vin d'Alsace. Aucune des bactéries lactiques provenant de Gironde ne possède cette propriété. Ceci explique sans doute la raison pour laquelle on ne trouve pas de butanol-2 dans les vins de Bordeaux.

Nous avons étudié pour ces trois souches l'influence de la concentration en butanediol-2,3 et de la présence de glucose sur la formation de butanol-2.

Il apparaît nettement que la formation de butanol-2 est fonction de la teneur du milieu en butanediol-2,3. Elle varie, selon la souche, de 1,7 à 25,3 mg par litre pour 1 g de butanediol-2,3 par litre ajouté ; de 2,7 à 528,4 mg par litre pour 5 g de butanediol-2,3 par litre (tableau IV).

TABLEAU IV

Quantités de butanol-2 formé (mg par litre) à partir du butanediol-2,3 et de glucose et pourcentages de butanol-2 formé par rapport à la quantité théorique (milieu synthétique).

	Butanediol-2,3 ajouté (g par litre)		Glucose ajouté (g par litre)		mélange ajouté Butanediol-2,3 (1 g par litre) + glucose (5 g par litre)
	1	5	2	7	
Butanol-2 formé (mg par litre)					
Bactérie C_{12}	7,6	12,1	0,4	—	0,8
Bactérie VZ_4	1,7	2,7	—	—	0,5
Bactérie AI_{31}	25,3	528,4	0,9	0,6	87,1
Pourcentage de butanediol-2,3 tranformé en butanol-2					
Bactérie C_{12}	0,9	0,3	—	—	6,7
Bactérie VZ_4	0,2	0,07	—	—	4,0
Bactérie AI_{31}	3,0	12,8	—	—	716,3

La formation de butanol-2 varie aussi en fonction de la nature de la souche bactérienne. Le rapport du butanol-2 formé au butanediol-2,3 préexistant diminue lorsque la concentration en butanediol-2,3 s'élève pour les souche C_{12} et VZ_4. Ces bactéries ne transforment que 0,7 à 0,9 p. 100 du butanediol-2,3 et le métabolisme de cette substance est inhibé si elle se trouve dans le milieu en quantité trop forte.

Par contre, la bactérie Al_{31} transforme 3 à 12,8 p. 100 du butanediol-2,3 ; la capacité de la souche augmente en fonction de la concentration en butanediol-2,3. Elle est quatre fois plus forte lorsque le substrat, dans le milieu, passe de 1 à 5 g par litre.

La présence simultanée de glucose et de butanediol-2,3 dans le milieu de culture, stimule la formation de butanol-2 par les bactéries V Z_4 et Al_{31}. Al_{31} tout particulièrement peut transformer dans ce cas jusqu'à 87 p. 100 du butanediol-2,3 (1 g par litre). L'activité de la souche C_{12} n'est pas modifiée.

En l'absence de butanediol-2,3 dans le milieu de Carr glucosé, le butanol-2 n'apparaît jamais quelle que soit la souche bactérienne mise en œuvre.

TABLEAU V

Quantité de butanol-2 formé (mg par litre) à partir de butanediol-2,3 dans un vin rouge et pourcentages de butanol-2 formé par rapport aux quantités théoriques.

	Additions de butanediol-2,3 (g par litre)								
	0			1			5		
pH	3,2	3,8	4,5	3,2	3,8	4,5	3,2	3,8	4,5
C_{12}	—	—	—	—	—	—	—	—	—
VZ_4	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Al_{31} (mg par litre)	—	—	—	—	—	2,6	—	—	7,2
p. 100	—	—	—	—	—	0,20	—	—	0,16

Dans le vin, une biomasse très importante est ajoutée au départ (1,6 g par litre) pour éviter le stade préliminaire de la croissance bactérienne. Les trois pH expérimentaux ont été choisis comme représentant le pH d'un vin avant fermentation malolactique (3,2), après fermentation malolactique (3,8) et le pH des lies (4,5).

Les souches C_{12} et VZ_4 ne forment pas trace de butanol-2 dans aucune des conditions étudiées de pH et de concentration en butanediol-2,3. Le métabolisme de cette substance est inhibé dans le vin (tableau V).

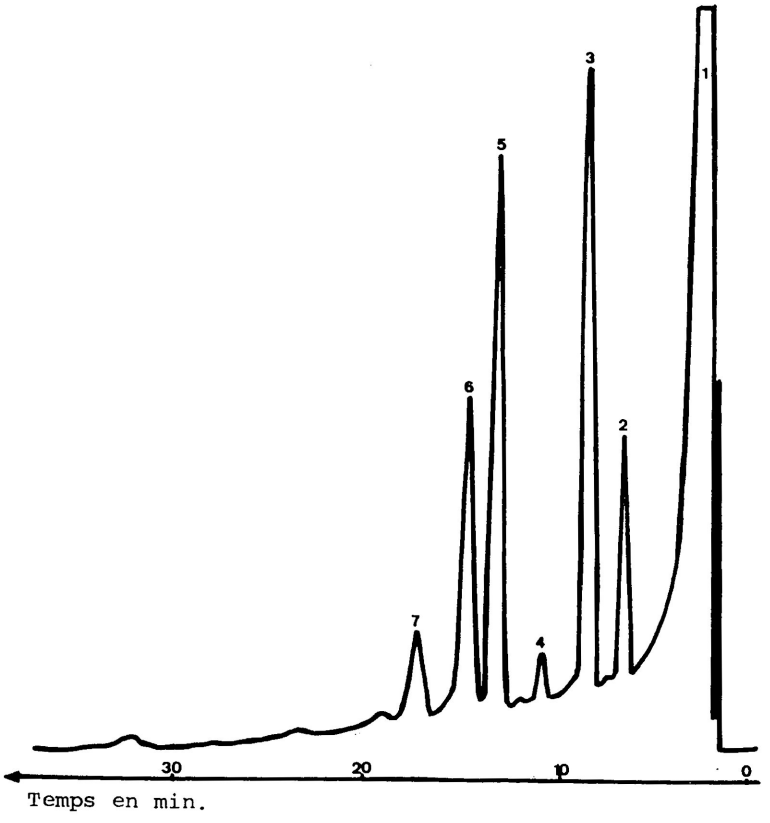


Fig. 2. — Chromatogramme obtenu par injection directe du vin

Conditions de la chromatographie :

Colonne : D.E.G.S. — H_3PO_4, température du four : 125 °C, volume injecté : 2 µl, sensibilité : S8 x 3 mv.

Identification des pics : 1 éthanol ; 2 lactate d'éthyle ; 3 acide acétique ; 4 acide propionique ; 5 étalon interne ; 6 butanediol-2,3 forme lévo ; 7 butanediol-2,3 forme méso.

La souche Al_{31} ne manifeste une activité qu'au pH le plus élevé (4,5) et pour les concentrations les plus fortes en butanediol-2,3 ; en outre, les formations de butanol-2 demeurent très limitées : 2,6 mg pour 1,6 g de butanediol-2,3 par litre ; 7,2 mg par litre pour 5,6 g par litre, soit respectivement 0,2 et 0,16 p. 100.

Le butanediol-2,3 se présente sous trois formes isomériques, la forme méso et les formes D(—) et L(+). Dans le vin la forme lévogyre

D (—) prédomine (70 p. 100 environ) ; dans les préparations commerciales utilisées dans notre expérimentation par contre la forme méso est la plus abondante (94 p. 100).

HIEKE et VOLLBRECHT (1974) ont signalé que selon la nature de la souche bactérienne l'une ou l'autre des deux formes est plus ou moins utilisée pour former des quantités variables de butanol-2.

Nous avons vérifié que la forme lévogyre rencontrée dans les vins est également dégradée à pH 4,5 (tableau VI).

TABLEAU VI

Dégradation des différentes formes isomériques de butanediol-2.3 par une masse bactérienne non proliférante dans le vin

	Témoin vin rouge + butanediol-2,3	Bactéries		
		C 12	VZ 4	Al 31
Total des formes isomériques (g par litre)	6.06	5,84	5,99	5,69
Teneur consommée (g par litre)	—	0,22	0,07	0,37
Forme lévogyre (g par litre)	1,12	1,08	1,10	1,05
Teneur consommée (g par litre)	—	0,04	0,02	0,07
Forme méso (g par litre)	4,95	4,76	4,89	4,65
Teneur consommée (g par litre)	—	0,19	0,06	0,30
Butanol-2 formé (g par litre)	—	—	—	0,0072

Le D(—) butanediol-2,3 naturel du vin diminue aussi, bien que faiblement, à ce pH, comme les autres isomères ; mais une fraction seulement du butanediol-2,3 est transformée en butanol-2, puisque 7,2 mg de butanol-2 sont formés pour une dégradation de 370 mg de butanediol-2,3 par litre, soit 2,4 p. 100 de la consommation totale (304 mg de butanol-2 devraient en réalité apparaître de la transformation de 370 mg de butanediol-2,3).

CONCLUSIONS

La capacité de former du butanol-2 est une propriété très peu répandue chez les bactéries lactiques isolées des vins. Elle se rencontre chez quelques rares souches (3 sur 80) appartenant à l'espèce **Lactobacillus brevis.** Stimulée en milieu synthétique par la concentration du milieu en butanediol-2,3, elle n'apparaît dans le vin qu'à pH relativement élevé (4,5) et pour une seule souche bactérienne.

Le butanol-2 n'est pas synthétisé par les bactéries lactiques au cours de la fermentation lactique du glucose ; il provient sans doute exclusivement de la dégradation du butanediol-2,3 et ne représente qu'une faible fraction des produits de cette dégradation. Les formes naturelles (lévogyre et méso) sont toutes deux dégradées.

Il est probable que le butanol-2 décelé dans les brandies a pour origine une activité des bactéries lactiques développées dans les lies des vins avant d'être soumises à la distillation ; leur pH élevé favorise le métabolisme du butanediol-2,3.

Manuscrit reçu le 7 septembre 1976.

RÉSUMÉ

Le butanol-2, présent dans les eaux-de-vie de vin de qualité médiocre, est dosé par chromatographie en phase gazeuse. Cet alcool pourrait provenir de la dégradation du butanediol-2,3 par les bactéries lactiques dans les lies de vin.

80 souches bactériennes ont été étudiées en milieu synthétique sucré et dans du vin, à différents pH et en présence de doses variables de butanediol-2,3 ; trois souches seulement forment du butanol-2 à des doses pouvant atteindre 528 mg par litre en milieu synthétique et une seule souche dans le vin à pH 4,5.

SUMMARY

The concentration of butanol-2 present in brandies of mediocre quality was determined by gas chromatography. This alcohol may result from the decomposition of butanediol-2,3 by lactic bacteria in wine lees.

Eighty bacterial strains were studied in a sugared synthetic medium and in wines, at varying levels of pH and concentrations of butanediol-2,3.

Only three strains formed butanediol-2,3 up to a maximum level of 528 mg per liter in the synthetic medium and one, to the same level, in wine with a pH raised to 4,5.

ZUSAMMENFASSUNG

Das Butanol-2, welches in Branntweinen aus Wein von mittelmässiger Qualität vorhanden ist, wird durch Gaschromatographie dosiert. Dieser Alkohol könnte auf die Degradation von Butandiol-2,3 durch Milchbakterien in den Weinhefesätzen zurückzuführen sein.

80 Bakterienstämme sind in synthetischem Zuckermilieu und in Wein — bei verschiedenen pH-Werten und in Gegenwart von variablen Dose Butandiol-2,3 — untersucht worden ; drei Stämme nur bilden Butanol-2 zu Dosen, welche in synthetischem Milieu 528 mg per Liter erreichen können, und nur ein einziger Stamm tut dies im Wein bei einem pH-Wert von 4,5.

RESUMEN

El butanol-2 presente en los aguardientes de vino de calidad mediocre se determina por cromatografia en fase gaseosa. Este alcohol podria provenir de la degradación del butanediol-2,3 de las lias del vino por bacterias lácticas.

80 cepas bacterianas han sido estudiadas en un medio sintético con azucar y en el vino, a diferentes pH y en presencia de dosis variables de butanediol-2,3 ; solamente tres cepas forman butanol-2 en cantidades que pueden alcanzar hasta 528 mg por litro, en medio sintético, y una sola cepa sobre vino a pH 4,5.

RIASSUNTO

Il butanol-2, presente nelle acqueviti di vino di mediocre qualità, è dosato secondo gas-cromatografia. Questo alcool potrebbe derivare dalla degradazione del butanediol-2,3 per mezzo dei batteri lattici nella feccia di vino.

80 ceppi batterici sono stati studiati in ambiente sintetico zuccherato e nel vino, a differenti pH e in presenza di dosi variabili di butanediol-2,3 ; tre ceppi solamente formano del butanol-2 a dosi che possono raggiungere 528 mg. per litro in ambiente sintetico e un solo ceppo nel vino a pH 4,5.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BARAUD J., 1961. Etude quantitative, par chromatographie en phase vapeur, les alcools et esters de la fermentation alcoolique. **Mémoires présentés à la Société Chimique, 293,** 1874-1877.

BERTRAND A., 1975. Recherches sur l'analyse des vins par chromatographie en phase gazeuse. **Thèse de Doctorat d'Etat,** Université de Bordeaux II.

BIDAN P., 1975. Relation entre la teneur des vins en alcools supérieurs et la teneur des moûts en substances azotées en particulier en acides aminés. **Bull. O.I.V., 536,** 842-867.

GENEVOIS L. et BARAUD J., 1959. Les produits secondaires de la fermentation alcoolique ; la composition des fusels. **Ind. Alim. Agric., 76,** 837-844.

GUYMON J.F. et CROWELL E.A., 1967. Direct gas chromatographic determination of levo-and meso-2,3-butanediols in wines and Factors affecting their formation. **Amer. J. Enol. Vitic., 18,** 200-209.

HIEKE E. et VOLLBRECHT D., 1974. Zur bildung von butanol-2 durch Lactobacillen und Hefen. **Arch. Microbiol., 99,** 345-351.

JOSEPH E. et MARCHE M., 1973. Rôle du bois dans le vieillissement du Cognac. Extrait de la revue « **Le Paysan** », **659,** 660-661.

LAFON-LAFOURCADE S., 1973. Sur les facteurs de la fermentation malolactique des vins. IV[e] Symposium, Long Ashton, **Lactic acid bacteria of breverage and food,** Bristol 19-21 septembre, 43-53.

RADLER F., 1967. Etude microbiologique des bactéries de la fermentation malolactique. **Connaissance Vigne Vin, 2,** 73-91.

RANKINE B.C., 1967. Formation of higher alcools by wine yeasts and relationship to taste thresholds. **J. Sci. Fd Agric., 18,** 583-589.

RIBÉREAU-GAYON J., PEYNAUD E., RIBÉREAU-GAYON P. et SUDRAUD P., 1975. **Sciences et Techniques du Vin,** Tome 2, Dunod éd., Paris.

SUOMALAINEN H., 1969. Trends in physiology and biochemistry of yeasts. **Antonie von Leeuwenhoek. suppl. Yeast Symposium, 35.** 83-111.

TAJIMA K. et YOSHIZUME H., 1973. Mechanism of glycerol and 2,3-butanediol formation by yeast in highly salted media during alcoolic fermentation. **J. Ferm. Technol., 51 (8),** 560-565.

USSEGLIO-TOMASSET L., 1964. Les alcools supérieurs dans la fermentation alcoolique. **Riv. Vitic. Enol., 17,** 497-530.

USSEGLIO-TOMASSET L., 1975. Constituants volatils des vins en relation avec le métabolisme des levures. **4[e] Symposium d'Œnologie International,** Valence, Espagne. Lemperle E et Frank J. éd., 371-393.

WEBB A.D., KEPNER R.E. et IKEDA R.M., 1952. Composition of a typical grape brandy fusel oil. **Anal. Chem., 24,** 1944-1949.

WEBB A.D. et MULLER C.J., 1972. Volatile aroma components of wines and other fermented beverages. **Adv. Appl. Microbiol., 15,** 75-146.