Connaissance de la Vigne et du Vin,
Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin, 1989, **23,** N° 1, 39-45.

SYNTHÈSE DES SUBSTANCES ACÉTOÏNIQUES PAR *LEUCONOSTOC ŒNOS.* RÉDUCTION DU DIACÉTYLE

G. de REVEL, A. BERTRAND et Aline LONVAUD-FUNEL.

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

Résumé : *Après avoir mis au point un dosage du diacétyle, par chromatographie en phase gazeuse, précis et fiable, la synthèse par* Leuconostoc œnos *des substances acétoïniques est analysée.*

L'influence des conditions physico-chimiques du milieu (pH et température) sur cette synthèse est mise en évidence chez Leuconostoc œnos *ainsi que la réduction du diacétyle et de l'acétoïne en butanediol-2,3.*

La dégradation de l'acide citrique par les bactéries lactiques conduit, non seulement à la synthèse d'acide acétique mais aussi à celle des substances acétoïniques : butanediol, acétoïne et diacétyle (COLLINS, 1972). Ce dernier est un des produits secondaires les plus importants du métabolisme bactérien en vinification, compte tenu de son arôme particulier. Son seuil de perception organoleptique dans les vins, de l'ordre de 2 mg/l, est relativement faible et dépend de la constitution du milieu (PEYNAUD, 1980).

Les précédentes études (ZMIROU-BONNAMOUR, 1984 ; WEINZORN, 1985) ont montré que parmi les bactéries lactiques du vin, seuls les bacilles homofermentaires et les coques hétérofermentaires sont capables de dégrader l'acide citrique et de former du diacétyle et de l'acétoïne. Parmi les coques testés appartenant à la collection de l'Institut d'Œnologie, les souches de *Leuconostoc œnos* produisent les plus grandes quantités de diacétyle ; mais devant les difficultés rencontrées pour leur culture les recherches sur le métabolisme de l'acide citrique ont été poursuivies chez *Leuconostoc mesenteroïdes* (ZMIROU-BONNAMOUR, 1984).

Dans le présent travail, cette étude est reprise avec des souches de *Leuconostoc œnos* isolées plus récemment et capables d'être cultivées au laboratoire. La technique de dosage du diacétyle est améliorée. Après avoir suivi la synthèse des substances acétoïniques, on étudie l'évolution de la concentration du diacétyle en fonction des conditions de milieu.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I — DOSAGE DU DIACÉTYLE

Le diacétyle est dosé par chromatographie en phase gazeuse à l'aide d'un appareil de marque Carlo Erba (5300 méga séries), équipé d'un détecteur à capture d'électrons.

La colonne analytique est de type classique (remplie) en acier inoxydable de 6 m de long et de 2,1 mm de diamètre.

La phase stationnaire : célanèse (C9-esters) est enrobée à dix pour cent sur chromosorb W, 60-80 mesh.

Le gaz vecteur est l'azote «U» son débit est de 20 ml/mn.

Les températures du four, de l'injecteur et du détecteur sont respectivement de 70° C, 200 °C et 220° C.

A 5 ml de milieu à analyser, on ajoute 50 μl de pentanedione-2,3 en solution à 2 g/l et dans le cas de vins sulfités 2 gouttes de H_2O_2.

Après homogénéisation, 1 ml est repris puis dilué dans 5 ml d'éther et 2 ml de méthanol. L'injection est de 1 μl. Nous donnons figure 1 un exemple de chromatogramme ainsi obtenu.

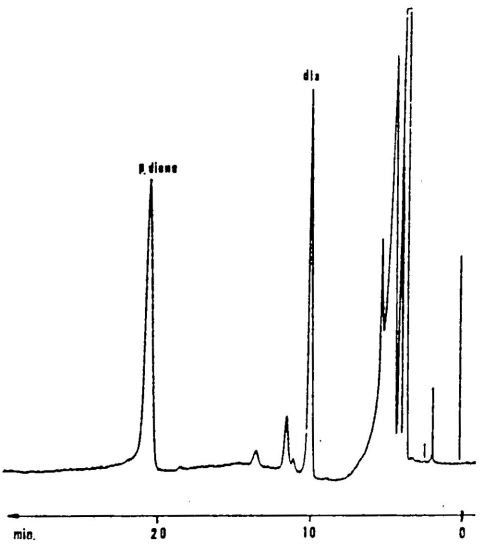


Fig. 1. — Chromatogramme du diacétyle. Détecteur à capture d'électrons. Colonne célanèse (6 m × 2,1 mm). Temp. du four 70° C.

La répétabilité de dosage est très bonne (tableau I); cette nouvelle méthode est bien plus précise que celle utilisée précédemment (BERTRAND et al., 1984) qui procé-

dait par extraction préalable du milieu et utilisation d'une colonne capillaire, le diacétyle n'était pas toujours bien séparé de l'éthanol et le coefficient de variation était de l'ordre de 10 pour cent.

TABLEAU I

Répétabilité du dosage du diacétyle dans les vins.

Échantillon N°	Teneur (mg/l)	Échantillon N°	Teneur (mg/l)
1	2,38	8	2,66
2	2,58	9	2,59
3	2,38	10	2,54
4	2,49	11	2,58
5	2,44	12	2,52
6	2,21	13	2,59
7	2,52		

Moyenne : 2,49 mg/l; Écart-Type : 0,120; Coefficient de variation : 4,81 %.

II — DOSAGE DE L'ACETOÏNE ET DU BUTANEDIOL-2,3

Le dosage est réalisé selon la méthode décrite par BERTRAND (1988). A 1 ml de milieu à analyser, on ajoute 5 ml d'éther, 2 ml de méthanol, 50 μl d'octanol-3 en solution à 400 mg/l (étalon interne), 50 μl de butanediol-1,4 à 1 g/l (étalon interne).

Le dosage est effectué par chromatographie en phase gazeuse; l'appareil est de marque Carlo Erba (6000 véga séries), il est équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et d'un injecteur de type «splitless» fonctionnant avec vannes fermées durant 20 secondes après l'injection.

La colonne capillaire est de type Carbowax 20 m (30 m × 0.32 mm).

Le gaz vecteur est l'hydrogène «U», son débit est de 2 ml/mn.

La température du four est programmée de 50° C à 200° C à raison de 3° C/mn; les températures de l'injecteur et du détecteur sont de 200 °C

III — ACIDE CITRIQUE

L'acide citrique est dosé par méthode enzymatique utilisant les coffrets d'analyses des produits alimentaires (BOEHRINGER MANHEIM).

IV — MILIEU DE CULTURE ET SOUCHES

Les cultures sont réalisées dans un milieu de Carr modifié (LONVAUD-FUNEL, 1986). Les souches *Leuconostoc œnos* (coques hétérofermentaires) HB 156 et 84, 17 appartiennent à la collection de l'Institut d'Oenologie. Le milieu de Carr, contenant de

l'acide DL-malique est modifié par addition d'acide citrique à concentrations variables; il ne contient pas de glucose. Sa composition par litre est la suivante : extrait de levure Difco : 4 g; casaminoacides Difco : 5 g; KH_2PO_4 : 0,6 g; Kcl : 0,45 g; Mg SO_4 $7H_2O$: 0,13 g; Mn $S0_4$, H_2O : 3 mg; Ca $Cl_2 2H_2O$: 0,13 g; acide DL-malique : 10 g; acide citrique : concentration variable selon les expérimentations.

RÉSULTATS

I — CONDITIONS DE PRODUCTION DES COMPOSÉS ACÉTOÏNIQUES

1°) Évolution des substances acétoïniques en fonction du temps

En l'absence de citrate, *Leuconostoc œnos* forme essentiellement du D-lactate, de l'acétate et de l'éthanol à partir du glucose. Dans ces conditions, le pyruvate provenant du glucose est réduit en lactate pour assurer la réoxydation du coenzyme. Dans ce milieu, après croissance l'analyse des substances acétoïniques donne : diacétyle = 0,6 mg par litre; acétoïne = 0; butanediol-2,3 = 0,9 mg par litre.

Par contre toute molécule supplémentaire de pyruvate conduit aux molécules acétoïniques. C'est notamment le cas de celles qui proviennent de la dégradation de l'acide citrique (ZMIROU-BONNAMOUR, 1984).

A pH relativement bas (pH = 4,1) et à 25° C, l'acide citrique, à la concentration initiale de 0,25 g par litre , est dégradé rapidement (tableau 2). *Leuconostoc œnos* synthétise le diacétyle dès les premières heures; sa teneur passe par un maximum après 31 heures d'incubation.

TABLEAU II

Formation des produits acétoïniques en fonction de la dégradation de l'acide citrique par *Leuconostoc œnos*.

Température : 25° ; pH : 4,1 — Les résultats sont exprimés en mg/l.

	TEMPS (heures)							
	0	7	24	31	48	55	72	78
Diacétyle	0	2	2,7	5,9	0,8	0,8	0,7	0,8
Acétoïne	0	—	1,6	3,5	3,1	3,1	2,6	2,9
Butanediol-2,3	0	1,1	6,0	11,3	19,3	26	17	11,0
Acide citrique	250	230	240	80	0	0	0	0

La synthèse de l'acétoïne suit un schéma analogue avec un décalage dans le temps. La concentration de ces deux composés augmente tant qu'il reste de l'acide citrique dans le milieu.

Le butanediol-2,3 est formé dès le début de la dégradation de l'acide citrique, mais sa concentration continue encore à augmenter pendant 7 heures après que tout l'acide ait été métabolisé.

2°) Rôle du pH

Le même milieu, additionné de 1 g d'acide citrique par litre, a été ajusté à différents pH allant de 3 à 4,8. Les analyses sont effectuées après incubation à 25° C pendant 5 jours.

Le diacétyle est synthétisé en quantité d'autant plus importante que le pH est bas; c'est l'inverse pour le butanediol. La concentration en acétoïne présente un optimum à pH = 3,5.

TABLEAU III

Influence du pH sur la formation des composés acétoïniques à partir de l'acide citrique par *Leuconostoc œnos*.

Température : 25° C — Les résultats sont exprimés en mg/l.

	pH				
	4,8	4,1	3,5	3,2	3,0
Diacétyle	4,2	36,3	45,6	47,1	50,0
Acétoïne	8,3	83	101	88	78
Butanediol-2,3	55	9,0	11,8	19,4	19,7

A un pH très favorable à la croissance bactérienne (pH = 4,8), le diacétyle et l'acétoïne sont synthétisés en concentration faible alors que le butanediol est abondant (tableau 3).

Entre pH = 4,8 et pH = 4,1, il existe une limite pour laquelle on observe un changement dans les proportions de chacune des substances acétoïniques synthétisées.

En outre à pH = 4,8 où il est formé en concentration la plus importante, le butanediol-2,3 est en quantité équivalente sous forme de ses deux isomères (D(-) et méso. Au contraire, aux pH inférieurs à 4,1, seul l'isomère méso est présent.

II — ÉVOLUTION DES COMPOSÉS ACÉTOÏNIQUES EN FONCTION DU TEMPS

Les dosages du diacétyle et de l'acétoïne ont été effectués au 7e jour et au 16e jour d'incubation de cultures effectuées à 18 et 25 °C (tableau 4). Aux deux températures, dès le 7e jour, l'acide citrique était entièrement métabolisé.

Par la suite, à 25° C, on note une diminution importante des deux composés qui disparaissent presque totalement; mais ce n'est pas le cas à 18° C. Une partie au moins de ce phénomène peut être attribuée à l'action de diacétyle et acétoïne réductases puisque, en même temps, on observe une augmentation de butanediol jusqu'à 25 mg par litre; il s'agit en totalité de l'isomère méso.

TABLEAU IV

Influence de la température sur la formation des composés acétoïniques à partir de l'acide citrique par *Leuconostoc œnos*.

Les résultats sont exprimés en mg/l.

Température	18° C		25° C	
Jours	7	16	7	16
Diacétyle	32,2	27,7	27,3	3,8
Acétoïne	54,8	56,7	63,2	4,2

DISCUSSION

Les souches de *Leuconostoc œnos* isolées de vins synthétisent des substances acétoïniques lorsqu'elles sont cultivées en présence d'acide citrique. A pH acide, leur synthèse est accrue. En milieu synthétique contenant 1 g par litre d'acide citrique il est formé 50 mg de diacétyle par litre à pH = 3 et quelques mg seulement à pH = 4,8. De même, à pH = 3,5 où sa concentration est optimale, l'acétoïne atteint, par litre, 100 mg au lieu de 7 mg à pH = 4,8. On confirme donc les résultats obtenus chez *Leuconostoc mesenteroïdes* (ZMIROU-BONNAMOUR, 1984) : dans les conditions de croissance difficile, la synthèse des substances acétoïniques est supérieure.

Par ailleurs, le butanediol (isomère D(-) et méso) représente 85 pour cent des substances acétoïniques à pH = 4,8 et seulement 8 pour cent aux pH inférieurs, de 4,1 à 3. Il n'est plus alors que sous forme méso. La réduction du diacétyle et de l'acétoïne en butanediol par un processus biochimique nécessite une diacétyle réductase et une acétoïne réductase, dont la présence a déjà été démontrée chez d'autres bactéries lactiques (COGAN et al., 1981 ; ZMIROU-BONNAMOUR, 1984). L'acétoïne réductase a une stéréospécificité différente selon les microorganismes ; ce point reste à étudier chez *Leuconostoc œnos*.

CONCLUSION

Les mécanismes de synthèse des substances acétoïniques à partir du citrate chez les bactéries lactiques sont connus ; mais il reste à définir, pour *Leuconostoc œnos*, celui de la réduction du diacétyle en acétoïne et butanediol.

Ces premiers résultats laissent prévoir une incidence des conditions du déroulement de la fermentation malolactique sur la teneur en diacétyle du vin. L'activité réductase qui pourrait être assurée par une population de levures plus ou moins viable en fin de vinification doit aussi être prise en considération.

Enfin, une étude sur la stabilité du diacétyle dans les vins pendant leur conservation s'impose, notamment en relation avec le taux de combinaison du SO_2 et son oxydation.

L'ensemble de ces résultats devrait permettre de mieux contrôler les déviations d'ordre organoleptique dues à la formation excessive de diacétyle.

Manuscrit reçu le 28 octobre 1988; accepté pour publication le 10 janvier 1989.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BERTRAND A., ZMIROU-BONNAMOUR C. et LONVAUD-FUNEL Aline, 1984. Aroma compounds formed in malolactic fermentation. In flavour research of alcoholic beverages. *Proc. Alko symposium. Helsinki, Nykänen et Lehtonen ed.* **3,** 39-49.

BERTRAND A., 1988. Role of the continous distillation process on the quality of Armagnac. In distilled beverage flavor recent developments. *Ellis Horwood Limited. Chichester. J. Pigott Ed.*

COGAN T.M., O'DOWD M. et MELLERICK D., 1981. Effects of pH and Sugar on acetoin production from citrate by *Leuconostoc lactis. Appl. Environ. Microbiol.* **41,** 1-8.

COLLINS E.B., 1972. Biosynthesis of flavor compounds by microorganisms. *J. Dairy Sci.* **55,** 1022-1028.

LONVAUD-FUNEL Aline, 1986. Recherches sur les bactéries lactiques du vin. Fonctions métaboliques, croissances, génétique plasmidique. *Thèse doctorat ès-Sciences. Université de Bordeaux II.*

PEYNAUD E., 1980. — Les arômes secondaires ou arômes de fermentation. Le goût du vin. *Dunod éd., Paris.*

WEINZORN F., 1985. La dégradation de l'acide citrique du vin par les bactéries lactiques. Étude de la citrate lyase. *Thèse de 3e cycle. Université de Bordeaux II.*

ZMIROU-BONNAMOUR C., 1984. Contribution à l'étude des produits secondaires de la fermentation malolactique des vins. *Thèse de 3e cycle. Université de Bordeaux II.*