DÉTERMINATION DU NOMBRE DES LEVURES VIVANTES PAR LE CHLORURE DE TRIPHENYL-TETRAZOLIUM

M. EDELÉNYI
Université d'Horticulture, Chaire d'Œnologie
Budapest (Hongrie)

La production du vin mousseux a augmenté au cours des vingt dernières années, d'abord par le progrès de l'élaboration du vin mousseux en cuve close. La sûreté de la production, qui s'accomplit dans de grandes cuves (50-2.000 hl) exige un contrôle microbiologique rapide et précis. La solution des problèmes de technologie et de recherche, (élaborer une méthode de préparation et de dosage de la culture de levures sélectionnées pour l'ensemencement, déterminer la courbe optimale de fermentation, découvrir la corrélation entre le déroulement de la fermentation et la qualité du vin mousseux) exige une méthode appropriée pour déterminer le nombre des levures vivantes.

La méthode, la plus universellement utilisée pour la détermination du nombre des levures vivantes est la méthode de la chambre BÜRKER ou de la chambre THOMAS avec coloration au bleu de méthylène (1). Cette méthode, qui demande beaucoup de travail et a une assez grande marge d'erreur, n'est pas convenable pour résoudre les problèmes exposés. Il en est de même avec la méthode de STAUDENMAYER (2) qui utilise l'orangé d'acridine et un microscope à fluorescence. La numération des cellules en milieu solide, dans une boîte de PETRI, en milieu gélatine ou gélose (3), en plus des désavantages mentionnés, dure longtemps et ne donne de résultats que 48 à 72 heures après le prélèvement d'échantillon. Avec la méthode de JAKUBOWSKA, numération des cellules par filtre à membrane (4), on ne peut déterminer qu'un moins grand nombre de cellules pendant un temps également assez long. Avec la méthode par turbidimétrie (1) on ne peut déterminer le nombre total des cellules qu'avec une grande marge d'erreur. Entre toutes ces méthodes, la plus précise est le procédé par dilution (5), mais elle exige beaucoup de travail et dure longtemps; elle n'est donc pas convenable pour le travail en série.

Pour chercher un méthode conforme (rapide, précise, ne demandant pas trop de travail, utilisable en série pour déterminer les levures vivantes de 10^6 à 10^8 cellules par ml) il faut considérer les méthodes qui reposent sur la réaction colorée avec un indicateur d'oxydo-réduction. En microbiologie pour la déterminaiton des levures vivantes, la méthode la plus ancienne et la plus utilisée est celle au bleu de méthylène. La technique de THUNBERG (6) déduit le nombre des levures vivantes de la quantité de bleu de méthylène réduite par les enzymes des cellules vivantes, c'est-à-dire de la diminution de l'intensité de la couleur. Cette méthode est utilisée, en premier lieu, pour la détermination du nombre des bactéries, car dans le cas des levures, l'effet d'absorption des cellules mortes perturbe la détermination. La méthode de BORZANI et VAIRO (7,8) utilise par contre l'adsorption du bleu de méthylène par les cellules mortes pour déterminer le nombre total et le nombre des levures vivantes lesquelles réduisent le bleu de méthylène en leucobleu de méthylène. Il semble que ce procédé soit apte à être utilisé pour la détermination des cellules vivantes. Pour cette raison, nous l'essayons dans les conditions spéciales de la fabrication du vin mousseux en cuve close (9), BORZANI et VAIRO ayant travaillé avec les levures de bière.

Nos expériences ont montré que la déshydrogénase des levures sélectionnées type Bouzy fonctionne avec un pH plus bas (pH 3, 4) que celui des levures de bière. Ainsi il n'existe pas une grande différence entre l'adsorption du bleu de méthylène par les levures mortes et la réduction du bleu de méthylène par les levures vivantes. Or, avec cette méthode, on ne peut déterminer exactement ni le nombre des levures mortes, ni celui des levures vivantes du type Bouzy. Pour cela nous avons continué notre travail pour mettre au point une méthode par le chlorure de triphényl-tétrazolium (TTC), laquelle nous a déjà donné des résultats prometteurs au cours de nos essais préliminaires.

BASES THEORIQUES D'APPLICATION MICROBIOLOGIQUE DU CHLORURE DE TRIPHENYL - 2, 3, 5 TETRAZOLIUM (TTC)

Le TTC a été extrait pour la première fois en 1894 par PECHMAN et RUNGE. En 1941 KUCHN et JERCHEL ont établi que le TTC (qui est incolore) sous l'action d'un matériau biologique quelconque (levure, différentes parties de plantes, etc) se transformait en triphénylphormazane (TF) avec une couleur rouge. En 1942, LAKON a élaboré une méthode rapide pour déterminer l'aptitude à la germination des semences. A partir de ce moment, l'application du TTC se répand rapidement. Il est utilisé

non seulement dans les recherches biologiques pour déterminer les activités de la déshydrogénase (10), pour mieux visualiser les colonies de bactéries, pour les recherches d'antiseptiques, pour la détermination de vitamine B ; il est appliqué aussi dans les examens histologiques médicaux, dans les analyses de l'industrie alimentaire, dans l'analyse du lait, ainsi que dans la détermination de l'activité biologique des eaux résiduelles. Jusqu'ici il n'était appliqué ni en microbiologie œnologique, ni pour la détermination du nombre des levures.

Le TTC présente les avantages suivants sur les autres indicateurs d'oxydo-réduction (par exemple le bleu de méthylène) :

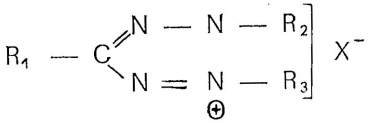
1° La forme oxydée du TTC est incolore ; la forme réduite, le TF, est colorée ; Il peut être ainsi utilisé avec plus de précision pour une détermination d'aptitude à la réduction que les indicateurs qui ont une forme oxydée colorée.

2° Contrairement aux autres indicateurs d'oxydo-réduction, la forme réduite, le TF, est insoluble dans l'eau ; il est ainsi moins sensible à l'oxydation.

3° La réduction du TTC est irréversible, facilement exécutable. L'oxydation du TF s'accomplit seulement sous l'influence de forts agents d'oxydation.

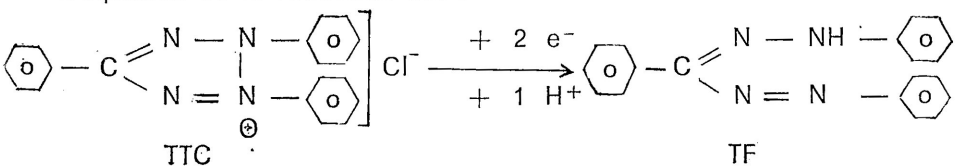
4° La toxicité du TTC est très faible ; nous pouvons ainsi l'utiliser en toute sécurité dans les actions « in vivo ».

Les composés de tétrazolium sont caractérisés par la structure générale suivante :



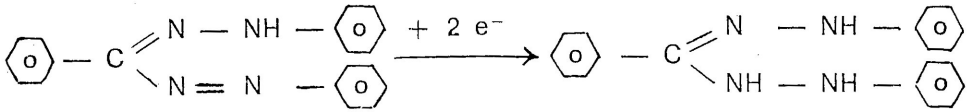
Le plus souvent on utilise pour les déterminations le chlorure de 2, 3, 5-triphényl tétrazolium, ou $R_1 = R_2 = R_3 =$ groupe phényl ; $X^- = Cl^-$.

L'équation de la réduction est :



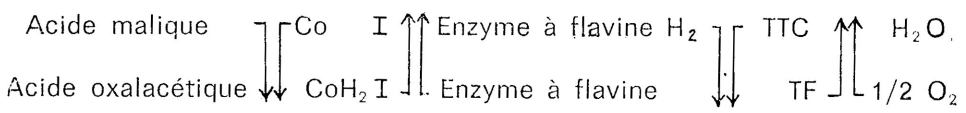
TTC TF

Il existe aussi d'autres réactions, qui dépendent du pH. Dans un milieu très acide (pH 2-3) la réduction se poursuit avec la capture d'encore deux électrons ; il se forme l'hydrazine benzylique ;



TF — hydrazine benzylique

On peut symboliser la réduction du TTC par les enzymes par le schéma suivant :



D'après les recherches effectuées jusqu'ici, dans une réaction enzymatique, la réduction du TTC n'est possible qu'avec la collaboration des enzymes à noyau flavine (6). Le pH optimum de la réaction enzymatique se situe entre 7 et 8. L'influence de la lumière sur le TTC, sur le TF et sur le déroulement de la réaction a été étudiée de façon très précise. Dans une phase solide, ou en solution, le TTC est sensible à la lumière ; le TF est aussi photosensible et la lumière accélère le processus de la réduction (6).

MISE AU POINT DE LA METHODE

Nous avons mis au point la détermination des levures dans le vin mousseux qui fermente en cuve close et dans les levains destinés, à l'ensemencement, lesquels contiennent 10^6 à 10^8 levures vivantes par ml (**Saccharomyces ellipsoideus** type Bouzy). Le degré alcoolique de ces vins est de 10,5 à 11,5°, la teneur en sucre de 0 à 25 g/l (maximum du levain 50 g/l), l'acidité totale est de 7 g/l, la teneur en acide sulfureux total est d'environ 100 mg/l, le pH est de 3,4. Nous utilisons une solution de TTC à 1 %, qui est préparée et renouvelée toutes les deux semaines et conservée à l'obscurité. On mesure l'extinction au spectrophotomètre (type SPEKTROMOM 201) à une longueur d'onde de 510 mμ.

Comme le TTC, jusqu'ici, n'était pas employé pour la détermination des levures ni pour celle des bactéries, il n'existe que des méthodes semi-quantitatives ; on doit résoudre de nombreux problèmes :

1° Extraction du TF des cellules

2° Détermination du pH et de la concentration en glucose du milieu d'incubation

3° Effet du temps d'incubation et de la lumière dans la détermination

4° Effet des levures mortes.

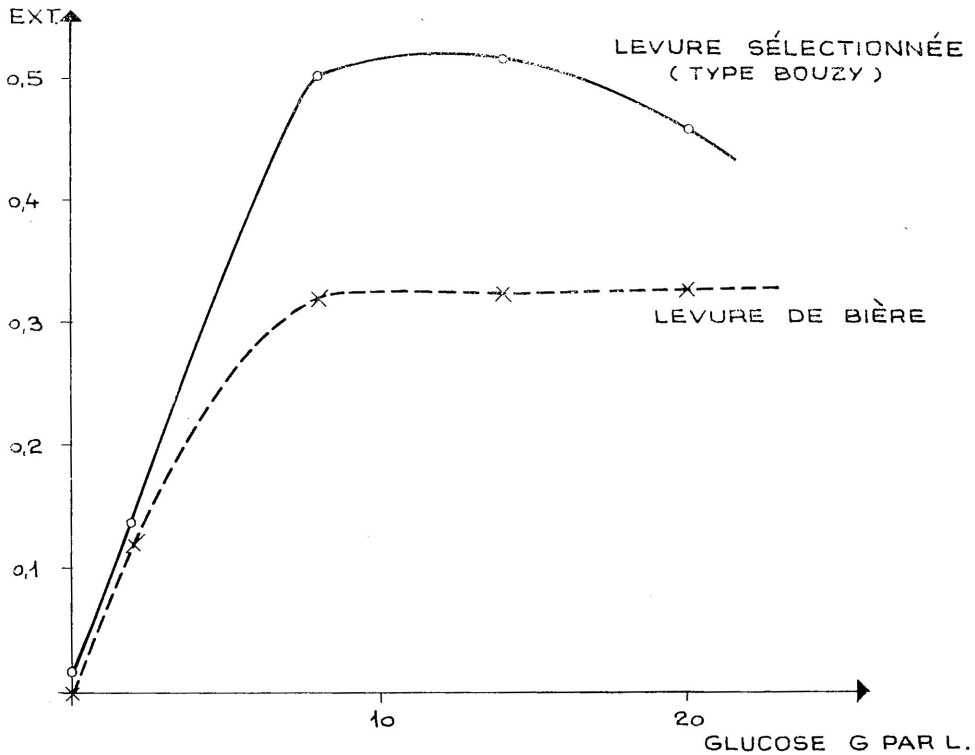


Fig. 1. Effet de la concentration en glucose sur la quantité de TF formé.

Pour l'extraction du TF nous ne pouvons pas appliquer les méthodes simples, qui sont utilisées dans le cas des bactéries (élution avec l'alcool ou acétone). Dans le cas des levures, nous avons obtenu le meilleur résultat en arrêtant la réaction, avec l'acide acétique à 96 % et en faisant une extraction par l'éther de pétrole.

La figure 1 montre l'effet de la concentration du glucose sur la quantité de TF formé. Au cours de nos expériences, nous avons utilisé une concentration de 20 g de glucose par litre, pour maintenir le TF à son niveau maximum pendant le temps d'incubation.

Les optima de pH pour les levures sélectionnées Bouzy et les levures de bière sont différents (figure 2). Pour augmenter la quantité du TF et la sensibilité de la détermination, nous avons employé un tampon phosphate (pH 7, 8). Pendant ces expériences nous avons fait incuber 24 heures, à 27 °C et à l'obscurité

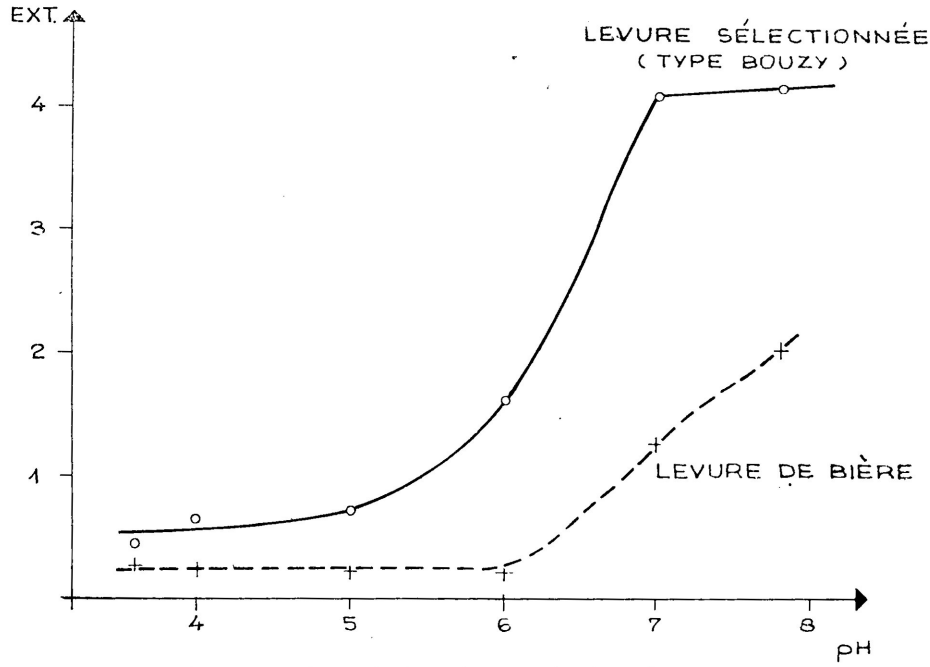


Fig. 2 Influence du pH sur la formation de TF suivant les types de levures.

Pour étudier l'effet catalytique de la lumière, nous avons fait des expériences en utilisant différents temps d'incubation à l'obscurité et à la lumière (figure 3). A la lumière, nous pouvons rendre plus sensible la détermination, car il est difficile de maintenir l'intensité lumineuse à une valeur constante et les petites différences dans l'intensité entraînent de grandes variations dans la quantité du TF ; il est plus pratique de réaliser l'incubation à l'obscurité. Si le nombre des levures vivantes est d'un ordre de grandeur différent, nous pouvons utiliser différents temps d'incubation, de façon à ce que le temps d'incubation reste au-dessous du niveau maximum.

L'intensité de couleur de la solution du TF avec l'éther de pétrole ne change pas sous l'effet de la lumière pendant 30 minutes ; en 3 heures la modification est très faible (tableau I). Si nous faisons une extraction et une mesure d'extinction rapides il est inutile de protéger la solution du TF contre la lumière.

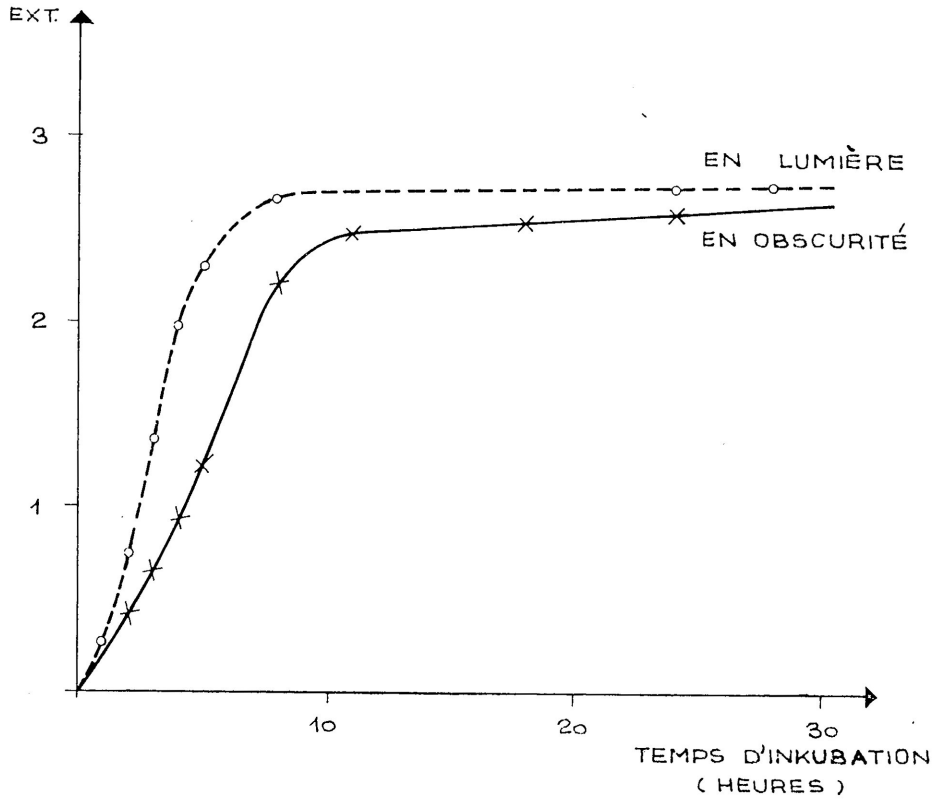


Fig. 3. — Infuence catalytique de la lumière sur la formation de TF en fonction du temps d'incubation.

TABLEAU I

Valeur de l'extinction de la solution du TF dans l'éther de pétrole, à la lumière et à l'obscurité

	Extinction	Ext. après 30 minutes		Ext. après 3 heures	
		à la lumière	à l'obscurité	à la lumière	à l'obscurité
Echantillon 1	1,525	1,526	1,527	1,573	1,527
Echantillon 2	0,933	0,934	0,934	0,960	0,936
Echantillon 3	0,542	0,541	0,542	0,555	0,543
Echantillon 4	0,238	0,238	0,240	0,255	0,240
Echantillon 5	0,076	0,077	0,076	0,079	0,075

TABLEAU II

Effet des levures vivantes et de la solution tampon (sans levures, glucose 20 g. par litre, pH 7,8) sur la réduction du T.T.C.

	Ext.
Echantillon Témoin incubé à l'obscurité pendant 24 heures	0
Echantillon Témoin incubé à la lumière pendant 96 heures	0
Echantillon Témoin incubé à l'obscurité pendant 24 heures	0
Echantillon Témoin incubé à la lumière pendant 96 heures	0
Nombres des levures mortes : 7.10^6 cellules par ml	0
Nombres des levures vivantes : $3,5.10^6$ par ml	0,369
$3,5.^610$ levures vivantes par ml + $3,5.10^6$ levures mortes par ml	0,375
Nombres des levures vivantes : 7.10^6 par ml	1,250

Nous avons précisé, au cours d'une série de recherches, l'effet des cellules mortes et du milieu sans cellules sur la rédution. Nos résultats (tableau II) ont montré que les levures mortes n'ont pas d'effet perturbant sur la détermination ; on peut aussi déterminer le nombre des cellules vivantes en présence de cellules mortes, car la solution utilisée (pH 7, 8 ; glucose 20 g/l) ne contenant pas de levures vivantes il ne se forme pas de TF et il est inutile d'employer un échantillon de contrôle.

DESCRIPTION DE LA METHODE

Sur la base de ce qui précède, la détermination des levures vivantes (10^6 à 10^8 cellules par ml), est la suivante : 50 ml de vin mousseux en fermentation sont centrifugés pendant 10 minutes à 4.500-5.000 tours/minute. On reprend le sédiment dans 50 ml de solution de tampon phosphate qui contient 20 g/l de glucose ; on égalise. On mesure 20 ml de ce mélange dans une fiole de 50 ml (avec bouchon de verre), on ajoute 1 ml de solution de TTC à 1 %, on mélange et on laisse incuber dans un thermostat à 27 °C à l'obscurité. Dans le cas d'un nombre de levures vivantes compris entre 10^6 et 10^7 cellules par ml, il faut laisser incuber 24 heures ; entre 10^7 et 10^8 cellules par ml, 4 heures. Après cela, on

arrête la réaction avec 20 ml d'acide acétique à 96 %, on mélange, on verse dans une ampoule d'extraction et on extrait le TF avec 10 ml d'éther de pétrole. On mesure l'extinction de la phase éther de pétrole à une longueur d'onde de 510 mμ à l'aide d'un spectrophotomètre. On détermine enfin le nombre le nombre de levures vivantes à l'aide d'une courbe étalon (figure 4 et 5).

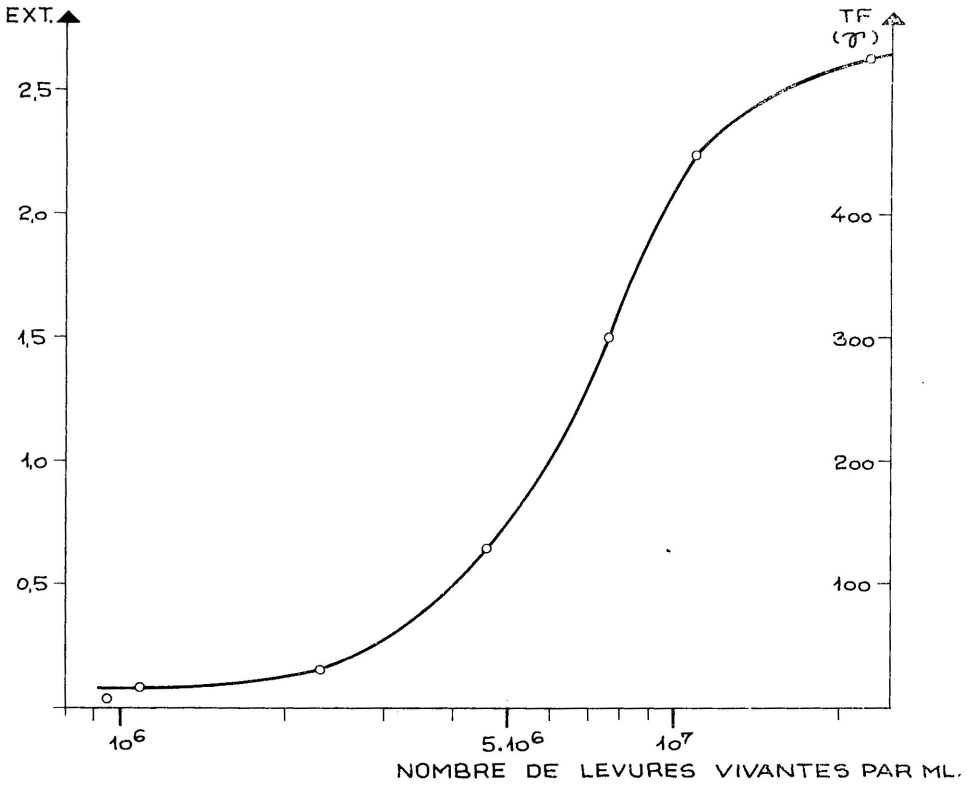


Fig. 4. — Courbe pour la détermination du nombre de levures vivantes.

Pour l'estimation absolue des résultats nous faisons la courbe étalon du TF (figure 6). Si, à la quantité de TF formé par divers nombres de levures pendant des temps différents, on rapporte la quantité de TF formé (en γ) en 1 heure et pour 1 ml de suspension, nous obtenons avec environ 10^6 cellules par ml 0,03 γ de TF par ml et par heure, avec environ 10^7 cellules par ml 1,32 γ de TF par ml et par heure, avec environ 10^8 cellules par ml 5,30 γ de TF par ml et par heure. La quantité de TF dépend ainsi seulement du nombre des cellules vivantes ; en connaissant approximativement le nombre des levures, on peut estimer le temps d'incubation et la quantité de la suspension utilisée.

Pour déterminer la précision de la méthode et l'erreur relative, nous avons fait des examens parallèles avec 8 échantillons. Avec un temps d'incubation de 24 heures l'erreur relative est de ± 1,24 % ; avec un temps d'incubation de 4 heures ± 2,72 %. La précision de la méthode est donc très bonne si on se rapporte aux autres méthodes microbiologiques pour la détermination du nombre des levures vivantes.

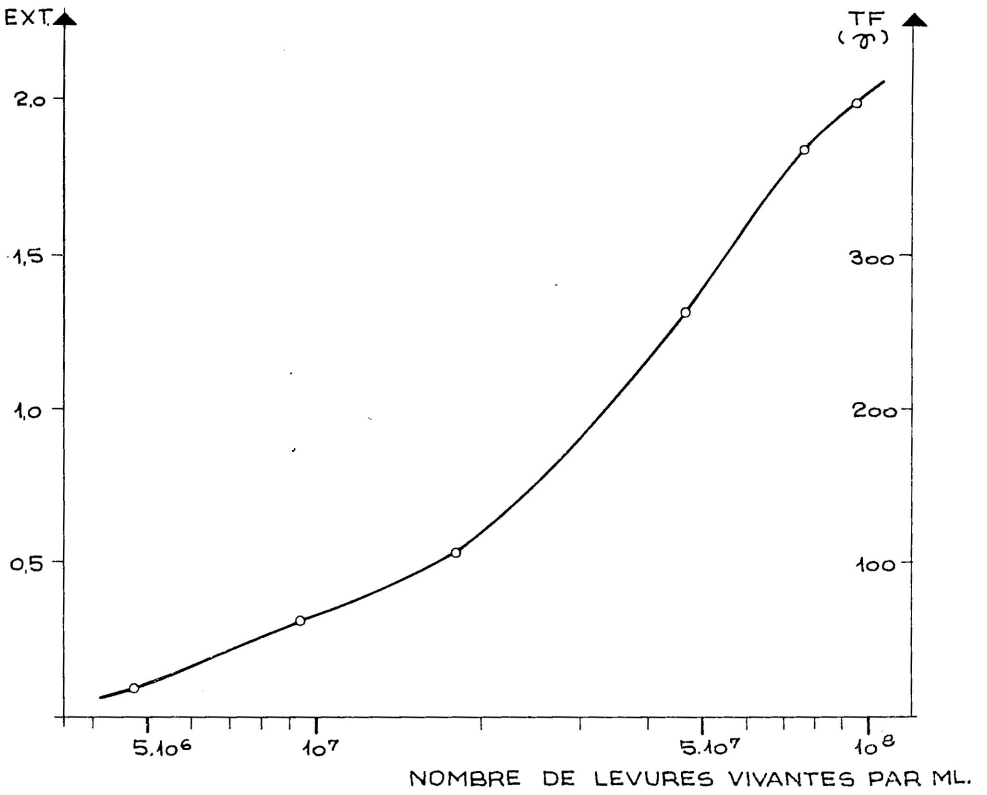


Fig. 5. — Courbe étalon pour la détermination du nombre de levures vivantes.

Nous avons appliqué la méthode au contrôle de l'élaboration du vin mousseux en cuve close, en usine, avec un résultat parfait (11). Elle peut être utilisée non seulement dans l'élaboration du vin mousseux, mais aussi pour la brasserie, la fabrication de l'alcool, ou des levures.

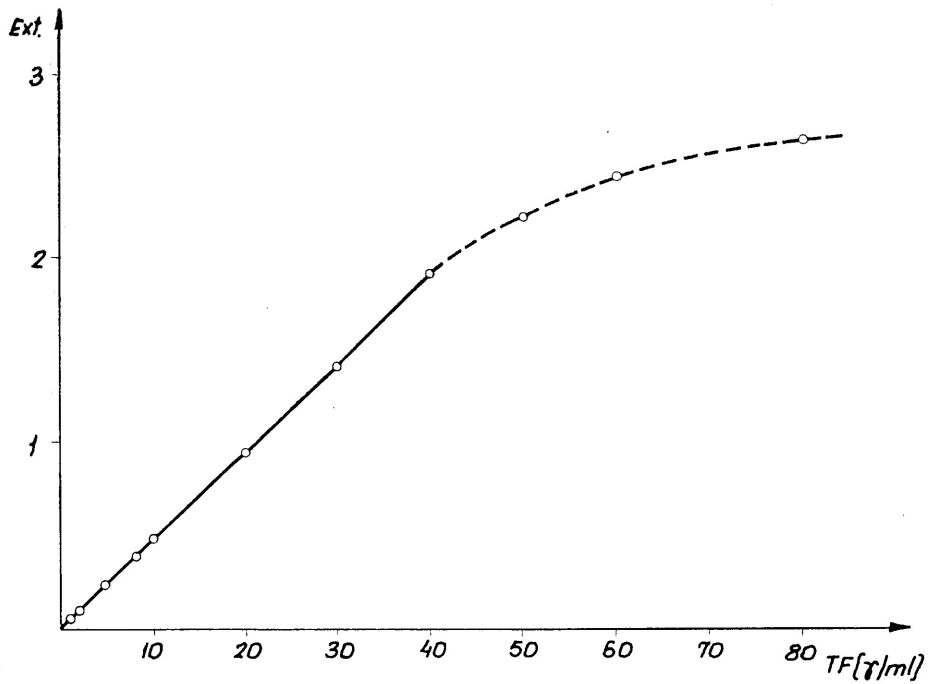


Fig. 6. — Courbe étalon pour le TF.

CONCLUSION

La méthode reposant sur l'application du chlorure de triphényl 2, 3, 5-tétrazolium (TTC) est simple, rapide et précise pour contrôler l'élaboration du vin mousseux en cuve close. On établit le nombre de levures vivantes par mesure de l'activité de la déshydrogénase, c'est-à-dire de la quantité de triphénylphormazane (TF) formé. Au cours de l'élaboration d'un vin mousseux encore en fermentation et contenant 10^6 à 10^8 de levures vivantes par ml, on applique la méthode par centrifugation ; on reprend ensuite le sédiment dans un tampon phosphate qui contient du glucose et du TTC, on laisse incuber à l'obscurité à 27 °C durant un temps déterminé, puis on arrête la réduction avec l'acide acétique ; on extrait le TF avec l'éther de pétrole et on mesure l'extinction à 510 mμ. On détermine le nombre des levures vivantes par rapport à une courbe étalon. La précision de la méthode est convenable, l'erreur relative varie entre ± 1,24 et 2,72 %. On peut appliquer cette méthode pour le contrôle de l'élaboration du vin mousseux en cuve close, en usine.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) JORGENSEN A. — **Mikroorganismen der Gärungindustrie.** Verlag Hans Carl, Nürnberg 1956.

(2) STAUDENMAYER Th. — Eine verbesserte Methode zur Unterscheidung von lebenden Mikroorganismen und Einweisstrub im Wein. **Die Wein-Wissenschaft,** 1966. **21.**127-129.

(3) MILISAVLJEVIC D. — Contrôle microbiologique du vin. **Bull. de l'O.I.V.** 1967. **40.**451-474.

(4) JAKUBOWSKA J. — Analyse microbiologique des vins à l'aide des filtres à membranes. **Bull. de l'O.I.V.** 1963. **36.** 812-824.

(5) SOOS I. — **Boraszati Mikrobiologia.** Mezogazdesagi Kiado, Budapest, 1954.

(6) JAMBOR B. — **Tetrazoliumsalze in der Biologie.** Fischer Verlag, Jena 1960.

(7) BORZANI W. et VAIRO M.I.R. — Quantitative adsorption of methylene blue by dead yeast cells. **J. Bacteriol.** 1958. **76.** 251-255.

(8) VAIRO, M.I.R. — A modified adsorption method for determinig percentage of dead yeast cells. **Biotechn. and Bio-engineering,** 1962. **IV.** 247-254.

(9) EDELENYI M. — A tankpezsgogyartas mikrobiologia ellenörzése I. **Borgazdasag,** 1968, **XVI.** 135-137.

(10) JAMBOR B. et DEVAY M. : Növényi dehidrogenaz rendszereck mérése trifenil-tetrazolium-kloriddal. I. Az inkubacios ido megvalasztasa. **MTA Bioloogiai Csoportjanak Közleményei,** 1959. **3.** 401-412.

(11) EDELÉNYI M. — A tankpezsgogyartas mikrobiologiai ellenörzése III. Tankpezsgogyartasi folyamat ellenörzése à TTC-eljaras segitségével. **Borgazdasag,** 1969. **XVII.** (sous presse).