ETUDE DES BACTERIES ACETIQUES ISOLEES DE RAISINS ET DE VINS

II. - PRODUCTION DE COMPOSES CETONIQUES

A.C. BLACKWOOD
Professeur de Microbiologie
Collège Mc. DONALD, Université Mc. GILL
Province de Québec, Canada (*)

La deuxième partie de ce travail sur les bactéries acétiques isolées de raisins et de vins est consacrée à l'étude de deux problèmes principaux : d'une part l'identification par chromatographie sur papier des principales substances cétoniques réductrices, d'autre part la détermination de l'influence de divers facteurs sur la croissance des souches représentatives de chaque groupe taxonomique.

A. IDENTIFICATION DES PRINCIPAUX COMPOSES CETONIQUES FORMES

On procède au développement des cultures dans des erlenmeyers de 100 ml contenant 25 ml de milieu à 10 % de glucose, 0,1 % d'extrait de levure (Difco) et 3 % de carbonate de calcium. On ajoute 2 % d'un levain développé sur glucose et extrait de levure et on laisse incuber, sans agitation, à 28 °C pendant 10 jours.

On contrôle chaque culture au microscope et on note les caractéristiques suivantes : présence d'un voile, quantité restante de carbonate de calcium, couleur du liquide fermenté, présence de cristaux caractéristiques de céto-2 gluconate de calcium.

On décante, on mesure le pH et on ajoute de l'acide oxalique pour amener le pH à une valeur inférieure ou égale à 2. Ce dernier traitement, recommandé par FRATEUR et *al.* (1), est indispensable pour précipiter le calcium et libérer les acides céto-2 et céto-5 gluconiques.

En ce qui concerne la séparation des composés cétoniques par chromatographie sur papier, on a essayé un certain nombre de solvants

(*) Travail effectué à l'INSTITUT D'ŒNOLOGIE de BORDEAUX.

et de révélateurs. La technique appliquée à tous les échantillons est la suivante : 10 µl de la solution à analyser sont chromatographiés sur papier Whatman n° 4 en chromatographie descendante avec le phénol saturé d'eau comme solvant; le développement dure environ 12 heures à la température ambiante. On sèche les chromatogrammes et on pulvérise les révélateurs : oxalate d'aniline (mélange de 100 ml d'acide oxalique 0,1 N et de 0,9 ml d'aniline) ou naphtyléthylènediamine (on dissout 1,3 g de dichlorhydrate de N - (1-naphtyl) éthylènediamine dans un mélange de 2,5 ml de glycérol, 5 ml d'eau et 42 ml d'acétone); ce dernier révélateur (2) est stable à la température ambiante; avant l'emploi on lui ajoute 10 % d'acide phosphorique pur (3). Les chromatogrammes sont ensuite placés dans une étuve à 95-100 °C, jusqu'à ce que les spots soient bien développés.

Sur chaque chromatogramme, on dépose à côté du glucose, les acides céto-2 et céto-5 gluconiques témoins. L'acide céto-2 gluconique témoin est obtenu par réaction de son sel de calcium (1 % dans l'eau) avec l'acide oxalique commercial (Nutritional Biochemical); on peut également utiliser un produit isolé à partir de milieux de fermentation de plusieurs cultures et purifié par plusieurs recristallisations dans l'eau. Aucun échantillon commercial de céto-5 gluconate de calcium n'ayant une pureté convenable, on en a préparé un échantillon. Dans ce but on isole à partir de plusieurs milieux de fermentation les sels de calcium que l'on purifie par recristallisation dans l'eau chaude; avant emploi l'acide céto-5 gluconique en solution à 1 % est libéré par l'acide oxalique.

TABLEAU I

Rf et réactions colorées des substances témoins

Substance	Rf observé	Coloration en présence de	
		Oxalate d'aniline	Naphtyléthylène diamine
Glucose	0,38	Brun	Brun
Céto-2 gluconate	0,28	Rouge	Jaune
Céto-5 gluconate	0,24	Brun	Brun

Toutes les substances témoins donnent, sur le papier, un spot unique, semblables à ceux décrits dans la littérature (4); leur Rf et leurs réactions colorées sont rassemblés dans le tableau I. Les valeurs

rapportées par FRATEUR et *al.* (1) sont respectivement 0,4 pour le glucose, 0,2 pour le céto-2 gluconate et 0,15 pour le céto-3 gluconate.

L'identification est facile quand les concentrations en glucose et en cétoacides sont faibles; elle devient difficile quand l'une des substances est en grande concentration par rapport aux autres.

Résultats et discussion

Les résultats obtenus pour chaque culture sont résumés dans le tableau II.

TABLEAU II

Composés cétoniques formés par différentes cultures de bactéries

Type	Nombre total de cultures	Nombre de cultures formant du céto-2 gluconate	Nombre de cultures formant du céto-5 gluconate	Nombre de cultures formant d'autres substances
Acetobacter				
- groupe **oxydans**	16	14	5*	5
- groupe **mesoxydans**	6	5	5	6
- groupe **suboxydans**	21	18	18	4
Pseudomonas	8	6	3	3

(*) Ces cultures donnent un spot d'un Rf légèrement plus élevé que celui du céto-5 gluconate, bien que de la même couleur; aucune culture ne forme dans le milieu de fermentation de cristaux de céto-5 gluconate.

Toutes ces cultures, sauf trois souches, produisent des composés cétoniques. Dans un but pratique, on distingue généralement les bactéries de type cétogène (c'est-à-dire produisant de la dihydroxyacétone à partir du glycérol et du céto-5 gluconate à partir du glucose) et les bactéries de type non cétogène; cette distinction ne se justifie pas, étant donné que le céto-2 gluconate est formé, à partir du glucose, par les deux types de cultures à la fois.

Au cours de ces essais, nous n'avons pas essayé de doser ces substances, mais quelques-unes de ces cultures forment certainement de grandes quantités de céto-2 gluconate et de céto-5 gluconate. On peut considérer chaque **Acetobacter** comme potentiellement cétogène; il faut également noter que tous les **Pseudomonas** isolés au cours de ces essais forment des composés réducteurs.

FRATEUR (4) a établi qu'aucune culture formant du céto-5 gluconate ne se trouve dans le groupe **oxydans.** Cependant, d'après les autres critères, cinq cultures étudiées formant une substance susceptible d'être considérée comme du céto-5 gluconate se classeraient dans le groupe **oxydans.** Pour cette raison, et à cause également de la valeur du Rf de cette substance, légèrement différent de celle du céto-5 gluconate, la nature exacte de ce spot demeure inconnue.

De nombreuses cultures forment d'autres composés réducteurs non identifiés, en particulier toutes les cultures du groupe **mesoxydans;** la signification de cette aptitude demeure inconnue.

B. INFLUENCE DE L'ADDITION DE QUELQUES SUBSTANCES SUR LA CROISSANCE DES BACTERIES

Les résultats obtenus en isolant les bactéries acétiques à partir des raisins d'une part, et pendant la vinification d'autre part, mettent en évidence un effet sélectif, non seulement vis-à-vis du nombre des bactéries, mais également vis-à-vis de leur type. Dans ces essais, nous avons étudié l'influence de l'alcool éthylique, de l'anhydride sulfureux et de l'acide sorbique.

TABLEAU III

Influence de l'addition d'alcool éthylique, d'anhydride sulfureux et d'acide sorbique sur la croissance d'Acetobacter sp. (*)

Culture	Numéro de la culture dans la collection	Témoin	+ Alcool éthylique (60 g/l)	+ Anhydride sulfureux (400 mg/l)	+ Acide sorbique (500 mg/l)
Groupe **suboxydans**	16	6	0	0	25
	39	15	0	0	27
	44	22	0	0	16
Groupe **mesoxydans**	18	36	0	0	33
Groupe **oxydans**	11	32	9	0	21
	22	51	30	0	39
	24	46	25	0	42

(*) Les résultats sont exprimés en unités de néphélomètre.

Les souches choisies ont été cultivées après repiquages, dans 25 ml d'un milieu contenant 10 % de glucose, 0,1 % d'extrait de levure (Difco)

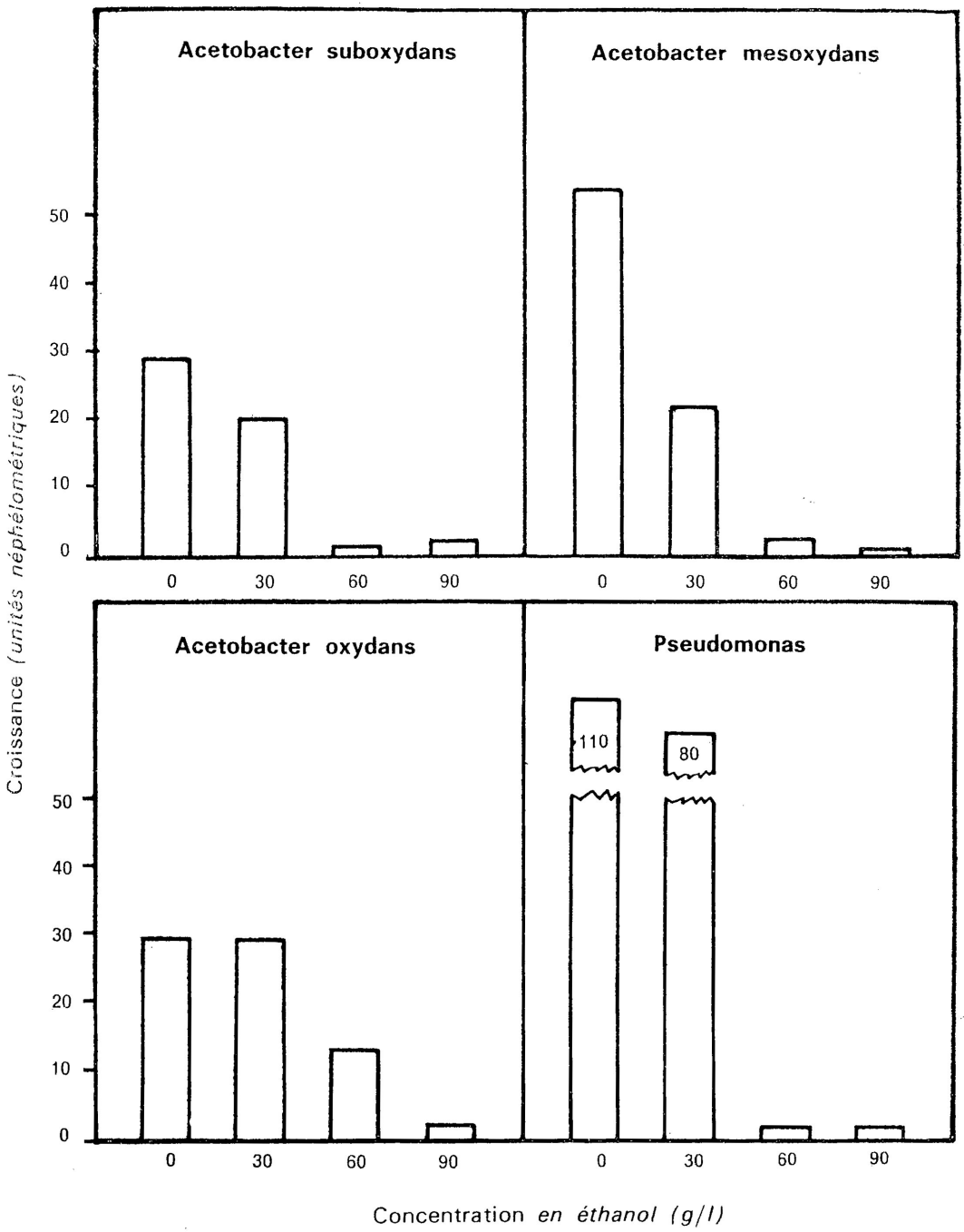


Fig. 1. - Influence de l'éthanol sur la croissance des bactéries acétiques après 48 heures d'incubation

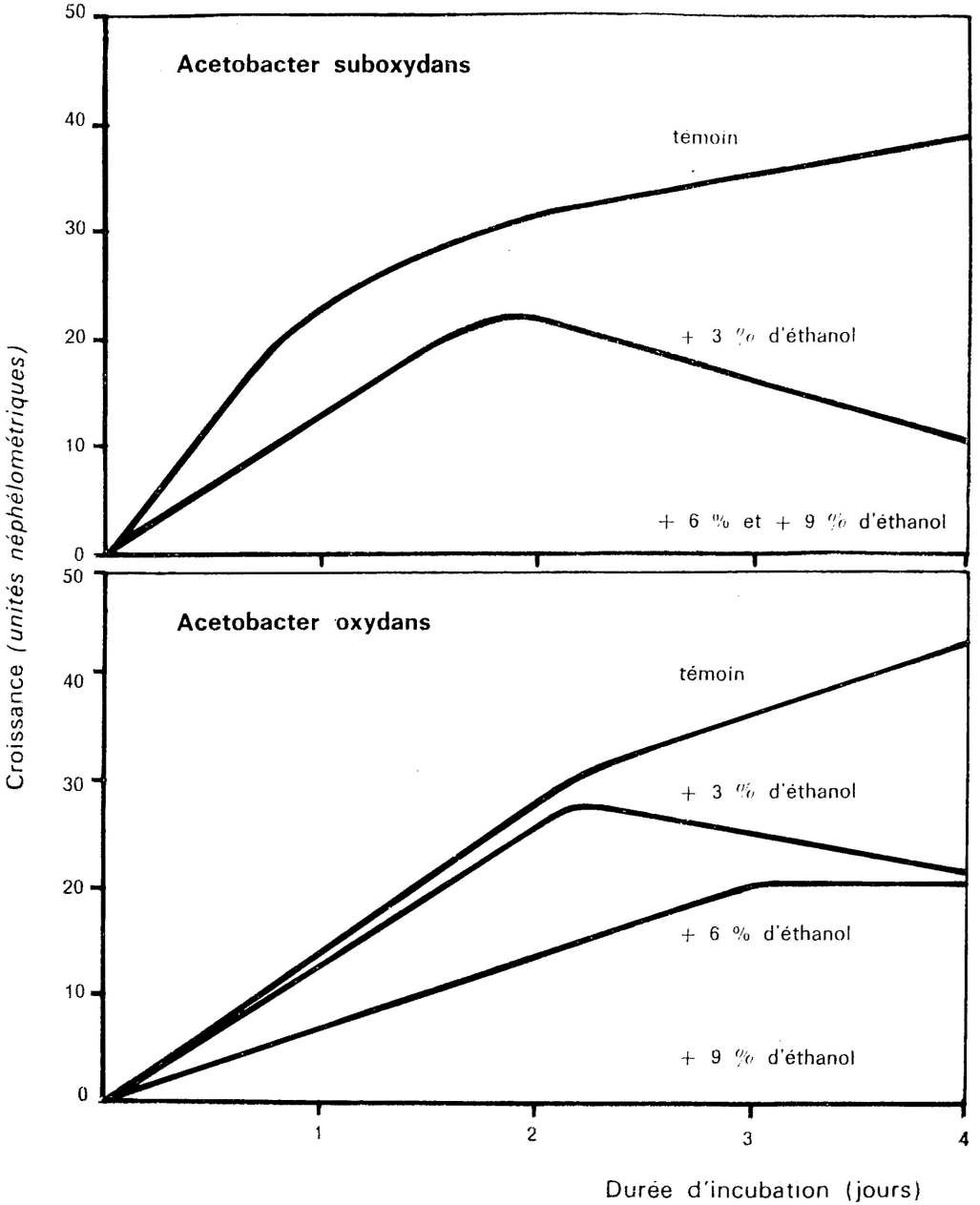


Fig. 2. - Influence de l'éthanol sur la croissance des bactéries acétiques

et 2 % de carbonate de calcium. L'incubation se fait à 28 °C au bain-marie, avec une agitation suffisante pour assurer une croissance uniforme des bactéries ainsi qu'une aération convenable, (agitateur réglé à 90 mouvements par minute avec une amplitude de 3,5 cm). On prélève 5 ml d'échantillon qu'on mélange avec 5 ml d'acide chlorhydrique normal afin de solubiliser le carbonate de calcium restant. On mesure la croissance au moyen d'un néphélomètre (Electro-synthèse, modèle J 60) en utilisant un filtre d'absorption maximale à 575 nm; les résultats ont montré qu'il existe un rapport linéaire correct entre le nombre de bactéries et les unités données par l'appareil. Au moment de l'ensemencement on ajoute les quantités convenables des diverses substances, stérilisées par filtration sur membranes Millipore.

Résultats et discussion

Les résultats de l'influence, à des concentrations déterminées, de l'addition de quelques inhibiteurs sur la croissance de diverses cultures de bactéries acétiques, sont rassemblés dans le tableau III.

Le développement de toutes les cultures est complètement inhibé par l'anhydride sulfureux mais reste insensible à l'acide sorbique. Après addition de 60 g par litre d'alcool éthylique, seul le groupe **oxydans** se développe; cela provient peut-être de la possibilité d'oxydation par ces cultures, de l'éthanol en acide acétique.

Des essais ultérieurs, avec d'autres concentrations en alcool éthylique, ont montré que les différences de l'effet inhibiteur varient en fonction de la concentration en alcool éthylique : cet effet est plus faible avec 30 g par litre d'alcool éthylique, tandis qu'à la concentration de 90 g par litre l'inhibition est totale.

Les résultats relatifs au développement de trois souches d'**Acetobacter** et d'une souche de **Pseudomonas** sont rassemblés dans la figure 1; ces résultats sont obtenus après 48 heures d'incubation, quand les différences de croissance des diverses souches sont les plus grandes. La figure 2 montre l'évolution de la croissance durant les 4 premiers jours d'incubation.

On peut expliquer, à partir de ces résultats, l'effet sélectif de l'acide sorbique. Celui-ci a peu d'effet sur la croissance des bactéries acétiques, par contre, il inhibe le développement des levures et empêche la formation d'alcool. Les cultures choisies sont les types écologiquement dominants, c'est-à-dire ceux appartenant au groupe cétogène des bactéries

fortement oxydantes. En l'absence d'acide sorbique, les levures se développent et l'alcool éthylique formé, inhibant le développement des types cétogènes, permet au groupe **oxydans** non cétogène de devenir prédominant; cet effet indirect de l'acide sorbique est susceptible d'être utilisé pour l'isolement de l'un ou l'autre groupe de bactéries.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) FRATEUR J. — Essai sur la systématique des **Acetabocter, La Cellule,** 1950, **53,** 287-392.

(2) GORDON H.T., THORNBURG W. et WERUN L.N. — Rapid paper chromatography of carbohydrates and related compounds, **Anal. Chem.,** 1956, **28,** 849.

(3) GUIMBERTEAU G. — Etude de la formation des polyols dans la fermentation lactique des glucides, **Conn. Vigne Vin,** 1969, **3,** 1.

(4) FRATEUR J., SIMONART P. et COULON T. — Chromatography study of cultures of **Acetobacter, Antonie van Leeuwenhoek,** 1954, **20,** 111-128.