ETUDE DE L'ANTAGONISME ENTRE LES LEVURES ET LES BACTERIES LACTIQUES DU VIN

M^me^ A.M. BOIDRON

Station Agronomique et Œnologique de Bordeaux

INTRODUCTION

La plupart des vins rouges et certains vins blancs sont le produit de deux fermentations; celles des sucres par les levures et celle de l'acide malique par les bactéries lactiques.

Bien que les levures et les bactéries soient présentes à la fois sur la vendange et le matériel vinaire, ces deux fermentations ne se produisent pas ensemble : on observe d'abord la fermentation alcoolique qui est le phénomène fondamental, puis, après un délai très variable, la fermentation malolactique. Cette dernière peut d'ailleurs ne pas se produire spontanément. Il y a donc dans un tel cas prédominance des levures sur les bactéries.

En introduisant des bactéries cultivées dans le vin, on provoque parfois la fermentation malolactique mais pas toujours. En ensemençant le moût par ces bactéries on peut obtenir un développement tel qu'il gêne les levures et le déroulement de la fermentation alcoolique.

L'antagonisme microbien dans les boissons fermentées a fait l'objet de recherches nombreuses dont la plupart démontrent l'inhibition des bactéries par les levures. Mais le phénomène inverse fut cependant observé dès 1873 par PASTEUR, puis en 1913 par MULLER-THURGAU et OSTERWALDER. Plus récemment (1964), deux auteurs russes KONDO et FADENKO, constatent l'impossibilité d'obtenir la xérisation des vins en présence de bactéries lactiques, qui empêchent la formation du voile

(★) Ce mémoire constitue le condensé d'une thèse de doctorat de 3^e^ cycle en chimie mention biochimie, soutenue à la Faculté des Sciences de l'Université de Bordeaux, le 17 juin 1969.

de levures indispensable. En 1967, PEYNAUD et GUIMBERTEAU remarquent que le nombre de levures actives diminue dans les vinificateurs continus au moment où intervient le développement des bactéries lactiques. Ayant nous-même observé, dans la pratique normale de la vinification et au cours de vinifications expérimentales, l'inhibition des levures par les bactéries lactiques, nous nous sommes attaché à l'étude de ce phénomène.

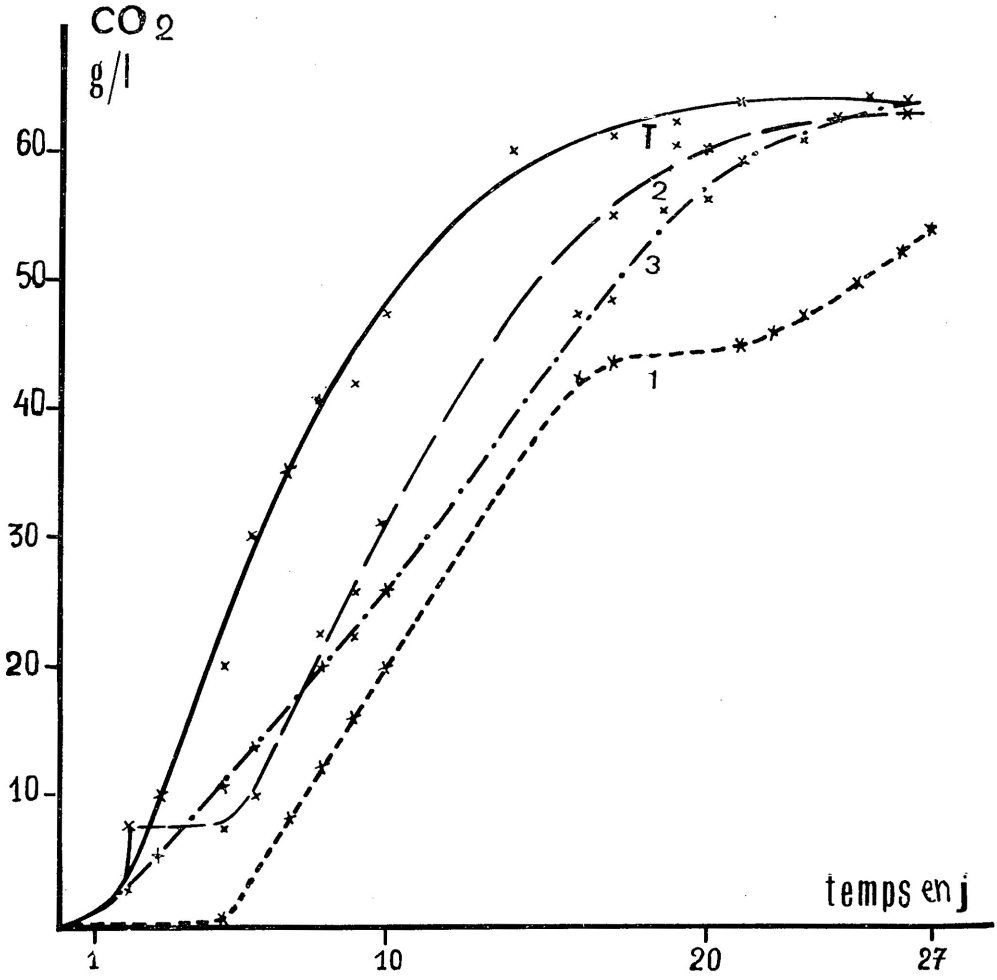


Fig. 1 - Influence du moment de l'ensemencement bactérien sur le déroulement de la fermentation alcoolique d'un moût.
La courbe représente le dégagement de gaz carbonique en g par litre.
Le témoin fermente sans avoir reçu de bactéries.
Le n° 1 est ensemencé par les bactéries après le pressurage.
Le n° 2 est ensemencé 24 heures après, le n° 3 48 heures après.

CHAPITRE I

PREMIERES OBSERVATIONS DE L'ANTAGONISME ENTRE LES LEVURES ET LES BACTERIES LACTIQUES

I. AU COURS DE VINIFICATIONS EXPERIMENTALES

C'est une observation fortuite effectuée au cours de vinifications expérimentales qui a d'abord retenu notre attention. L'expérience était en réalité conduite dans le but de provoquer la fermentation malolactique par un ensemencement de bactéries lactiques cultivées. Notre essai consistait à rechercher le moment le plus favorable à la multiplication des bactéries; nous avons donc été conduit à ensemencer du moût, puis du moût légèrement fermenté, ou très fermenté et enfin du vin.

A) CONDITIONS EXPERIMENTALES

Nous répartissons un moût d'Ugni blanc, choisi pour son acidité, en bouteilles de 750 cm^3 aussitôt après le pressurage afin d'éviter son oxydation. Ce moût n'est pas sulfité; il conserve donc l'intégrité de sa flore indigène et subit spontanément la fermentation alcoolique. Les bouteilles sont bouchées par des barboteurs à eau. Nous disposions de 12 échantillons numérotés de 1 à 12. Le premier échantillon reçoit des bactéries dès la répartition du moût en bouteilles; l'échantillon n° 2 est ensemencé dans les mêmes conditions le lendemain, le n° 3 le jour suivant et ainsi de suite jusqu'au douzième.

La culture pure de bactéries lactiques utilisée pour ces ensemencements est une souche de **Leuconostoc mesenteroides,** var. **arabinosus** P6 isolée dans le vignoble bordelais. C'est un coque hétérofermentaire. Le volume de levain employé, toujours constitué de cellules bactériennes jeunes et actives, est de 0,5 cm^3.

Nous disposons donc en définitive d'une série d'ensemencements bactériens, échelonnés au cours de la fermentation alcoolique. Le déroulement de celle-ci est suivi par pesée des bouteilles. L'acidité fixe et la concentration en acide malique (estimée par chromatographie sur papier), permettent de savoir si la fermentation malolactique se produit. L'incubation a lieu à température ambiante.

B) RESULTATS

Pour ce qui est de la fermentation malolactique, nous n'avons tiré aucun renseignement intéressant de cette expérience. Mais nous avons eu

la surprise de constater que la fermentation alcoolique spontanée du moût est perturbée par un apport précoce de bactéries lactiques. La fermentation alcoolique, qui se déroule normalement dans les témoins et les derniers échantillons ensemencés, est nettement retardée dans

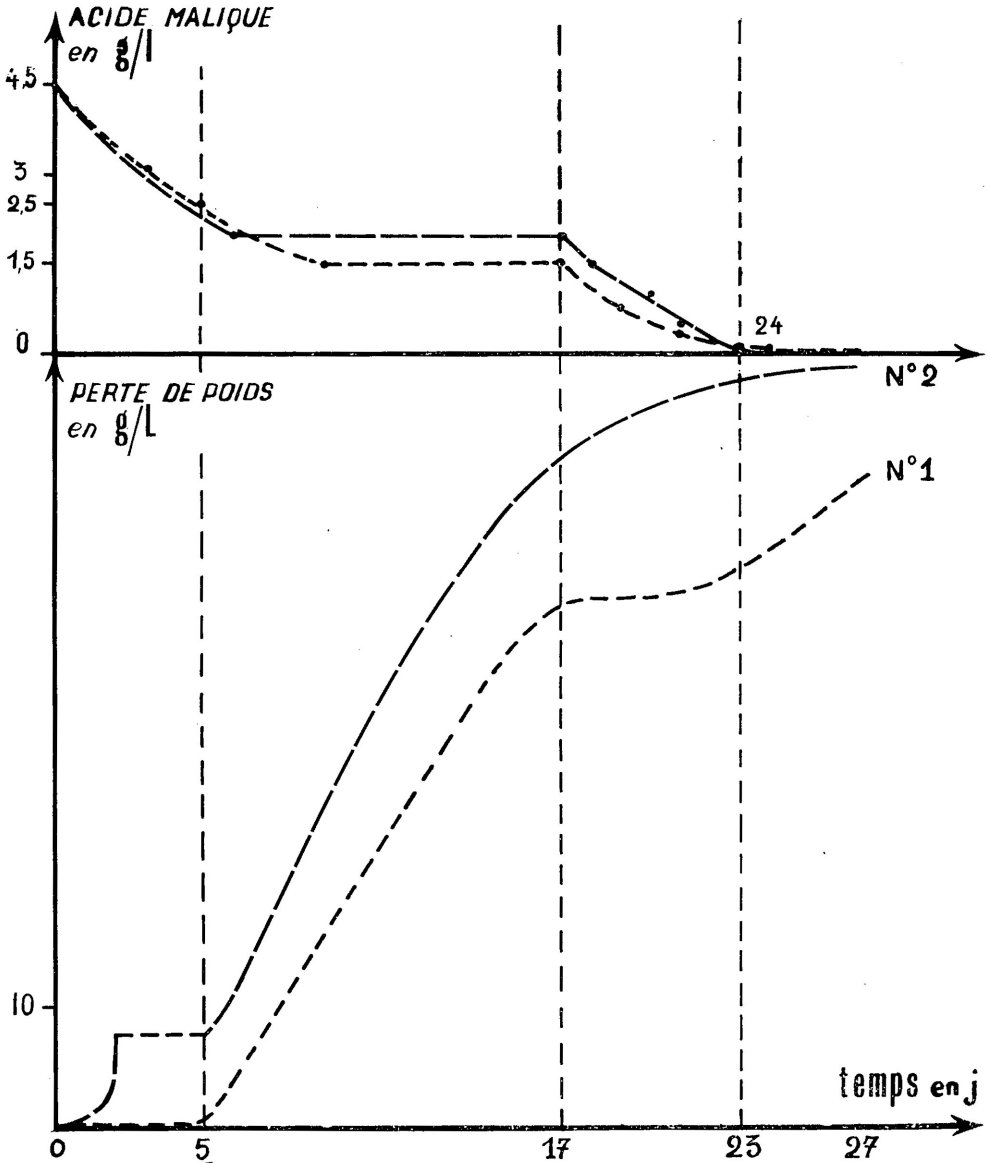


Fig. 2 - Comparaison des courbes de fermentation alcoolique et de fermentation malolactique dans deux cas d'ensemencement mixte.
L'échantillon n° 1 reçoit les bactéries dès le pressurage et le n° 2, 24 heures après.

les quatre premiers échantillons, c'est-à-dire dans ceux qui ont reçu des bactéries dès le pressurage ou dans les trois premiers jours de la fermentation alcoolique. Les courbes de fermentation construites à l'aide du dégagement de gaz carbonique en fonction du temps, sont représentées par la figure 1. Pour l'échantillon qui a reçu les bactéries immédiatement après le pressurage, la fermentation alcoolique débute avec cinq jours de retard. Dans l'échantillon n° 2 il se produit, le deuxième jour, un arrêt de la fermentation alcoolique. Cet arrêt dure environ trois jours. Lorsque l'ensemencement bactérien a lieu le troisième jour, on ne constate plus d'arrêt de fermentation mais celle-ci est ralentie. La courbe de fermentation de l'échantillon n° 4 se rapproche de celle du témoin.

En somme, il apparaît donc sur cet exemple, que la fermentation alcoolique se déroule d'autant moins bien que les bactéries se développent plus précocement et sont mieux implantées dans le milieu.

En posant pour hypothèse que la dégradation de l'acide malique est le reflet du développement des bactéries, on peut comparer les courbes de la fermentation alcoolique et celles de la fermentation malolactique. On a ainsi une représentation de l'influence du développement des bactéries sur celui des levures. Ces courbes sont représntées par la figure 2 où nous avons matérialisé par des traits pointillés verticaux, les différentes périodes que nous allons décrire. Le caractère anormal de la fermentation alcoolique dans les cinq premiers jours a déjà été noté plus haut; pendant la même période on constate une nette diminution de l'acide malique. Au cours de la période suivante cette fermentation malolactique cesse puisqu'on observe du cinquième au dix-septième jour une teneur sensiblement constante de l'acide malique. Pendant cette période, la fermentation alcoolique est sensiblement normale quoique ralentie lorsque les bactéries sont introduites précocement. Au moment où, pour une raison inconnue, la fermentation de l'acide malique reprend, on observe une période d'arrêt (n° 1) ou de ralentissement (n° 2) de la fermentation alcoolique. A cette troisième période, succède la reprise de la fermentation alcoolique, mais seulement après l'achèvement de la fermenation malolactique.

Le phénomène d'inhibition de la fermentation alcoolique a été observé par SUDRAUD (1963) sur un grand volume de vendange rouge précocement ensemencé par des bactéries lactiques.

II. REPRODUCTION AU LABORATOIRE DU PHENOMENE D'INHIBITION DES LEVURES.

A) PAR QUATRE SOUCHES DIFFERENTES DE BACTERIES LACTIQUES

Nous provoquons au laboratoire l'inhibition de **Saccharomyces ellipsoideus 19 e $_1$**, par quatre souches différentes de bactéries lactiques. Parmi les souches homofermentaires, nous choisissons d'étudier les genres **Lactobacillus** et **Pediococcus** avec les variétés **L. plantarum B4** et **P. cerevisiae S52.** Parmi les souches hétérofermentaires, nous étudions un représentant du genre **Lactobacillus (L. hilgardii LL2)** et un représentant du genre **Leuconostoc (L. mesenteroides** var. **arabinosus** P6**).**

Afin de nous placer dans des conditions expérimentales voisines de celles de la pratique précédemment décrite, nous employons du moût blanc de pH égal à 3,0 et dont l'acidité totale, exprimée en g d'acide sulfurique par litre est de 5,90. Le moût est stérilisé à l'autoclave pendant 30 minutes à 100 °C. De même que précédemment cette expérience est effectuée en bouteilles.

Quelle que soit la souche de bactéries, l'inhibition des levures est toujours constatée si l'ensemencement bactérien est simultané au levurage. Quand l'apport de bactéries survient quelques heures après le levurage, l'inhibition de la fermentation alcoolique est moins nette. Enfin, on ne constate plus qu'une action très faible des bactéries si l'ensemensement est réalisé 24 heures après le levurage.

Ainsi, dans les ensemencements mixtes, le moment de l'apport bactérien détermine l'importance de l'inhibition des levures.

B) AMPLIFICATION DU PHENOMENE D'INHIBITION AVEC **LACTOBACILLUS HILGARDII LL2**

Pour accentuer l'inhibition des levures par les bactéries, il suffit de favoriser la croissance bactérienne dans le milieu. On dispose à cet effet de deux possibilités : élever le pH du moût et réaliser l'ensemencement bactérien avant le levurage.

1. Conditions expérimentales

Le moût, désacidifié jusqu'à pH 4,6, est réparti en bouteilles de 750 cm^3 à raison de 600 cm^3 par bouteille.

Le volume de culture bactérienne servant à l'ensemencement est de 6 cm^3 (1 %). Le levurage est réalisé avec une seule goutte de levain.

TABLEAU I

Exemples d'inhibition de la fermentation alcoolique par Lactobacillus hilgardii LL2

Durée de la ferment. (jours)	Conditions / Dosages	Témoin sans bactéries	Bactéries ajoutées 3 jours avant les levures	Bactéries ajoutées 2 jours avant les levures	Bactéries ajoutées en même temps que les levures	Bactéries ajoutées 1 jour après les levures
0	Alcool	0	0	0	0	0
	Ac. malique	4	0,5	1	4	4
2	Alcool	0°7	0	0°15		
	Ac. malique	3,5	0	0,5	2,5	
3	Alcool	2°2	0°1	0°2	0°3	0°8
	Ac. malique	3,5	0	0	2,0	
6	Alcool	6°9	0°8	1°8	1°5	5°8
	Ac. malique	3,5			1,0	
7	Alcool	7°8	3°	3°	3°	6°3
	Ac. malique				traces	
9	Alcool	8°75	5°5	5°2	4°1	6°6
	Ac. malique	3,5				
13	Alcool	9°6	7°9	7°9	5°9	6°6
	Ac. malique				0	
15	Alcool	11°1	8°3	8°1	7°3	7°1
	Ac. malique	3,5				

Les résultats sont exprimés en degrés pour l'alcool éthylique et en g par litre pour l'acide malique.

Trois échantillons sont respectivement ensemencés par les bactéries trois jours, deux jours et un jour avant le levurage c'est-à-dire aux temps — 3, — 2, — 1. Deux autres échantillons reçoivent des bactéries, l'un en même temps que les levures, l'autre un jour après, donc au temps + 1.

La fermentation alcoolique est suivie par dosage de l'alcool formé.

2. Résultats.

Le rappel des conditions expérimentales, le degré alcoolique et le taux d'acide malique, sont rapportés dans le tableau I.. La diminution du taux d'acide malique est la preuve du développement des bactéries ; si le levurage est effectué dans un moût ne titrant plus que 0,5 g d'acide malique par litre, on peut admettre que les levures sont introduites dans un milieu contenant déjà un grand nombre de bactéries actives.

Toutes les concentrations d'alcool formé sont beaucoup plus importantes dans le témoin que dans les échantillons ensemencés. Trois jours après le levurage par exemple, on trouve seulement 0 °1 et 0 °2 d'alcool dans les échantillons ensemencés trois jours ou deux jours avant le levurage, alors que le degré alcoolique du témoin est égal à 2 °2 ; l'échantillon ensemencé par les bactéries en même temps que les levures, ne titre que 0 °3 et celui où les bactéries sont introduites 24 heures après les levures, ne titre que 0 °8. Non seulement l'inhibition de la fermentation alcoolique est très importante mais encore elle est durable ; celle-ci reste incomplète dans tous les échantillons ensemencés par les bactéries ; les différences de degré alcoolique entre ces échantillons et le témoin sont comprises entre deux et trois degrés.

A cause du pH élevé, le phénomène d'inhibition est ici très accusé ; ces expériences indiquent le sens dans lequel il se produit dans le moût où son amplitude est évidemment moins grande.

En conclusion, nous avons reproduit et accentué au laboratoire la perturbation de la fermentation alcoolique que nous avions observée dans la pratique de la vinification. Nous disposons d'une technique simple ; il suffit de favoriser le développement des bactéries en les introduisant avant les levures dans le moût déjà désacidifié.

L'influence des bactéries est caractérisée par un ralentissement de la fermentation alcoolique qui reste souvent incomplète. Toutes les souches de bactéries lactiques isolées du vin semblent pouvoir provoquer ces perturbations.

CHAPITRE II

METHODES UTILISEES POUR L'ETUDE EXPERIMENTALE DE L'ANTAGONISME MICROBIEN

I. SOUCHES DE MICROORGANISMES CHOISIES - MILIEUX DE CULTURE UTILISES - TECHNIQUE D'ENSEMENCEMENT.

Les recherches qui font l'objet de cette partie de notre travail sont effectuées exclusivement avec les souches **Saccharomyces ellipsoideus** 19 e_1 , et **Lactobacillus hilgardii LL2.** Cette souche de bactéries présente trois avantages principaux : sa facilité de culture au laboratoire où trois à quatre jours d'incubation suffisent à fournir un nombre élevé de cellules, sa facilité de conservation par le froid en milieu liquide à + 4 °C, enfin son aptitude à se développer dans le moût à un pH relativement bas.

Le milieu est du jus de raisin, dont le pH est ajusté à la valeur choisie par l'addition de soude 10 N ; il n'est pas enrichi en vitamines ni en composés azotés. Il est stérilisé 15 minutes à 105-110 °C et utilisé dès son refroidissement.

Les ensemencements sont réalisés avec des cultures parvenues à la phase de multiplication active, c'est-à-dire âgées de 3 à 4 jours. Le volume de culture bactérienne servant à l'ensemencement est inférieur ou égal à 1 % du volume du milieu. Le volume de levain servant au levurage est faible : une goutte s'écoulant d'une pipette pasteur effilée.

II. METHODES DE COMPTAGE DES MICROORGANISMES.

A) EXPOSE DES DIVERSES METHODES DE DENOMBREMENT

1. Dénombrement au microscope

Pour déterminer le nombre de levures totales d'un milieu qui contient également des bactéries on effectue un dénombrement au microscope à l'aide de l'hématimètre de MALASSEZ. C'est la seule technique utilisable en culture mixte.

2. Dénombrement des cellules vivantes.

Pour compter les levures ou les bactéries vivantes, on opère par culture sur milieu nutritif gélosé.

Les levures sont cultivées sur moût gélosé simple et les bactéries sur moût gélosé additionné d'extrait de levure Difco et ajusté à pH 4,5. A l'addition d'inhibiteurs chimiques, nous avons le plus souvent préféré utiliser une sélection grâce à la nature du milieu de culture et au temps d'incubation. Les levures en effet se développent très bien sur moût gélosé à pH 3,0 ou 3,2, alors qu'il faut aux bactéries un moût enrichi et de pH élevé. Il est donc improbable que les colonies bactériennes apparaissent sur les boîtes de Pétri préparées pour compter les levures. Nous avons remarqué d'autre part qu'une boîte préparée pour le comptage des bactéries et inoculée par une culture mixte, présente après 48 heures d'incubation, des colonies qui sont toujours dues à la multiplication de levures. Les colonies de bactéries n'apparaissent jamais avant cinq jours d'incubation à 25 °C. Le comptage des bactéries nécessite une dilution telle de la culture d'inoculation des boîtes qu'une ou deux colonies de levures seulement s'y développent ; elles ne peuvent donc suffire à gêner la numération des bactéries lorsqu'on l'effectue. Ainsi, pour les essais contenant levures et bactéries on prépare deux séries de boîtes de Pétri ; une série avec du moût gélosé à pH 3,2 destinée à la numération des levures que l'on compte après trois jours et après cinq jours pour vérification ; et une série avec le milieu de culture pour bactéries à pH 4,5 où on compte les colonies bactériennes après cinq jours d'incubation. S'il existe, dans cette séries de boîtes, une colonie de levures elle est très facile à distinguer des colonies bactériennes ne serait-ce que par sa taille. La nature de chaque colonie peut en outre être vérifiée au microscope.

Cette méthode est critiquée ; divers auteurs pensent qu'elle ne peut servir pour compter les bactéries. CLIFTON écrit en 1950 : « toutes les cellules vivantes ne se multiplient pas pendant l'incubation, et certaines colonies peuvent représenter des groupes de bactéries plutôt que des cellules individuelles ». MONOD (1942) n'utilise pas non plus cette méthode dans ses recherches concernant la croissance bactérienne. Cette technique nous a cependant beaucoup servi pour dénombrer les levures vivantes dans les cultures mixtes, mais pour déterminer le nombre de bactéries vivantes, nous avons comparé les résultats obtenus aux résultats donnés par d'autres méthodes que nous allons décrire.

B) COMPTAGE DES MICROORGANISMES PAR DETERMINATION DE LEUR POIDS SEC

Dans les milieux qui contiennent à la fois des levures et des bactéries, il est indispensable de séparer les unes des autres, afin de déterminer le poids sec de chacune d'elles. Pour le cas précis qui nous intéresse ici, nous avons mis au point une méthode simple de séparation.

1. Séparation des levures et des bactéries par centrifugation.

Une centrifugation fractionnée permet de recueillir les levures à faible vitesse en ne conservant que les bactéries dans le surnageant. Celles-ci sont ensuite récoltées par une nouvelle centrifugation beaucoup plus rapide que la première.

Pendant les trois premiers jours de la fermentation alcoolique, on doit tout d'abord dégazéifier par agitation sous vide durant quinze minutes, puis refroidir pour faciliter la sédimentation et ralentir l'activité des levures. A cet effet, 100 cm^3 du milieu dégazéifié sont disposés dans les pots de centrifugeuse, et placés ainsi dans un mélange de glace, d'eau et de sel. On maintient la température du milieu à — 2 °C pendant 15 minutes. Immédiatement après, on effectue la première centrifugation à 3.000 tours par minute pendant cinq minutes. L'observation microscopique du surnageant montre qu'il contient encore des levures ; nous en avons en moyenne dénombré 400 par mm^3. Si l'on augmente la vitesse ou la durée de la centrifugation, on entraîne des bactéries lactiques dans le culot. Par contre, en procédant à une nouvelle centrifugation du surnageant seul, les levures qu'il contient déposent ; il suffit de 2 minutes à 3.000 tours par minute. Ces essais ont été renouvelés un grand nombre de fois ; le surnageant de la seconde centrifugation ne contient jamais de levures. Nous avons procédé à ces deux centrifugations jusqu'au quatrième jour de la fermentation. Dès le cinquième jour, la première centrifugation est suffisante. Les levures récoltées sont lavées à l'eau distillée.

Le surnageant qui ne contient plus que des bactéries est centrifugé 20 minutes à 7.500 tours par minute. On lave deux fois le culot de centrifugation et on le reprend par un volume connu d'eau.

2. Détermination directe du poids sec.

Cette technique est seulement utilisée pour les levures ; le culot de centrifugation est séché à l'étuve à 100 °C jusqu'à poids constant que l'on détermine après refroidissement dans un dessicateur.

C) EVALUATION DE LA POPULATION BACTERIENNE PAR NEPHELOMÈTRIE

Cette méthode est basée sur le fait qu'il existe un rapport entre l'opacité des suspensions bactériennes et le poids sec des germes qu'elles contiennent par unité de volume. Nous conviendrons d'appeler « concentration » de la culture bactérienne, le nombre de germes qu'elle

contient par unité de volume. MONOD (1942), a montré que la graduation néphélométrique lue est proportionnelle à la concentration bactérienne. Nous utilisons pour nos mesures un spectophotomètre spectral « Jouan junior Rf 1560 » fonctionnant en néphélomètre grâce à l'addition d'un dispositif spécial. La courbe de proportionalité entre l'opacité et le poids sec est établie expérimentalement avec **Lactobacillus hilgardii LL2.** Cette souche est mise en culture à 25 °C sur le milieu habituel jusqu'à formation d'un dépôt important. Ce dépôt recueilli par centrifugation rapide, lavé deux fois puis pesé après égouttage, est partagé en deux parties égales dont l'une sert à déterminer le poids sec correspondant et l'autre à former une suspension de base pour la néphélométrie. On effectue une série de dilutions de cette suspension ; chaque dilution placée dans une cuve parallélépipédique est soumise au contrôle néphélométrique. Le zéro de l'appareil est fait avec de l'eau distillée. Pour chaque dilution testée on note la densité optique, et on construit la courbe étalon en portant le poids sec en abscisse et la densité optique de la suspension correspondante en ordonnée. Cette courbe est une droite elle permet de connaître immédiatement la concentration bactérienne d'une suspension dont on a mesuré la densité optique.

III. METHODES DE DOSAGE.

1. Le pourcentage **d'alcool** est déterminé chimiquement par la méthode de CORDEBARD.

2. Les **sucres réducteurs** sont dosés par la méthode de G. BERTRAND. Les résultats sont exprimés en g par litre.

3. Le titrage de **l'acidité totale** est fait à l'aide de soude décinormale, en présence de bleu de bromothymol comme indicateur de virage.

4. Le dosage de **l'acidité volatile** est fait par la méthode DUCLAUX-GAYON, vérifié fréquemment par la méthode de JAULMES. Les résultats sont exprimés en g d'acide sulfurique par litre.

5. **L'éthanal** est dosé par la méthode de JAULMES et ESPEZEL modifiée par PEYNAUD (1947).

6. Pour déterminer la concentration de **l'acide pyruvique** nous utilisons la méthode enzymatique optique de KUBOWITZ et OTT adaptée aux moûts et aux vins par BLOUIN.

7. On recherche le **mannitol** selon la technique de DUBOURG et GAYON décrite par RIBÉREAU-GAYON et PEYNAUD (1958).

IV. METHODE D'IDENTIFICATION DES AMINOACIDES.

A) METHODE GENERALE

La séparation des différents acides aminés est faite grâce à la chromathographie bidimentionnelle sur papier. Les spots sont ensuite révélés par la ninhydrine-collidine et identifiés grâce à leur coloration, la valeur de leur Rf et par chromatographie simultanée de solutions de référence.

B) ISOLEMENT D'UN ACIDE AMINE PARTICULIER

On doit isoler les acides aminés que l'on ne peut identifier par cette méthode.

1. Chromatographie de séparation.

Il peut arriver que le corps à isoler soit très près de la ligne de base de l'un des solvants ; cela signifie qu'il est peu entraînable par ce solvant. Cette propriété est alors exploitée. La solution d'acides aminés contenant le corps inconnu est déposée sous forme d'un trait fin long de 10 cm sur une longue bande de papier. On laisse descendre le solvant une vingtaine d'heures au cours desquelles il entraîne les acides aminés assez loin de la ligne de base, pouvant même en éliminer certains à l'extrémité libre du papier. Après séchage, on découpe une étroite bande sur toute la longueur du chromatogramme. On la révèle et par confrontation on localise les divers acides aminés sur la partie non révélée du chromatogramme.

2. Elution

La bande de papier portant l'acide aminé inconnu est découpée puis placée entre deux lames de microscopie accolées par des élastiques. L'ensemble est placé dans une coupelle contenant soit un mélange hydro-alcoolique à 30 %, soit de l'ammoniaque 2N. Par capillarité le liquide imbibe la bande de papier et s'écoule à son extrémité libre entraînant ainsi la substance intéressée. On peut vérifier le déplacement complet de cet acide aminé en révélant à la ninhydrine le papier. Si l'élution a duré suffisamment longtemps (une trentaine d'heures), aucune coloration n'apparaît.

Cet éluat est chromatographié avec un autre solvant. On peut alors déterminer le Rf qui est égal au rapport de la distance parcourue par l'acide aminé à la distance parcourue par le solvant. On trouve dans les

ouvrages de chromatographie la valeur des Rf des différents acides aminés dans un solvant donné. On effectue alors la chromatographie du corps inconnu et des témoins dont les Rf se rapprochent de la valeur trouvée et par comparaison on identifie le corps.

V. RECHERCHE D'UNE SUBSTANCE ANTAGONISTE FORMEE PAR LES BACTERIES

A) EN MILIEU LIQUIDE

Afin de savoir si les bactéries sont capables d'émettre dans le milieu des substances antagonistes des levures, il convient de cultiver les cellules bactériennes dans le moût habituel, de les éliminer après un certain temps de culture, et de soumettre le milieu où elles se sont développées à la fermentation des levures.

Le milieu est très largement ensemencé par les bactéries puis maintenu trois jours à l'étuve à 25 °C en anaérobiose.

Afin d'éliminer les bactéries, on peut soit stériliser par la chaleur, soit procéder à une ultrafiltration. Pour stériliser tout en préservant les substances fragiles du moût, nous chauffons à 110 °C pendant 5 minutes.

L'ultrafiltration des milieux, effectuée ici à l'aide d'un petit ultrafiltre de type « LKB 6301 A », donne de bons résultats. L'appareil est immergé dans la solution à débarrasser de ses microorganismes. On établit une dépression à l'intérieur du filtre grâce à une trompe à eau. On provoque ainsi le passage du liquide à l'intérieur du filtre. Les solutés de poids moléculaire inférieur à 30.000 traversent la membrane, les bactéries et les protéines sont retenues à l'extérieur.

Le tube de dialyse est un tube sans soudure en cellulose régénérée (procédé viscose); le rayon moyen de ses pores est de 24 $\mathring{A}$. L'appareil entier peut-être stérilisé à l'autoclave. Il fonctionne assez vite.

Le milieu est ensuite ensemencé par les levures et on suit la fermentation alcoolique; si elle est anormale, c'est que le milieu contient une substance antagoniste des levures.

B) SUR MILIEU SOLIDE

La recherche sur milieu solide est la méthode la plus largement employée pour mettre en évidence l'effet inhibiteur d'un microorganisme sur un autre. Elle consiste à cultiver les deux microorganismes ensemble et à observer le développement des cultures.

Nous employons du moût enrichi en extrait de levures Difco dont le pH est ajusté à 4,6, par addition de soude 10 N, solidifié par la gélose, pour effectuer successivement les essais suivants :

Selon la méthode de GARRE (1887), on trace avec chaque culture sur le milieu solidifié des stries radiantes, alternées.

En suivant la méthode de FROST (1904), on inocule toute la boîte par les levures (avant solidification) puis on trace une croix à l'aide de l'ensemenceur chargé de culture bactérienne. Après incubation on observe le pourtour de cette croix.

Le même auteur décrit une méthode dite « des deux boîtes »; avant stérilisation on place à l'intérieur de la boîte un morceau d'agitateur de verre qui la partage en deux demi-boîtes. Après stérilisation on verse d'un côté un tube de milieu gélosé stérile et de l'autre un tube de milieu ensemencé par des bactéries. Dès que l'ensemble est solidifié on retire l'agitateur de verre et avec l'ensemenceur chargé de culture de levures on fait des tries parallèles en allant de la zone centrale vers la périphérie. Ces stries de levures peuvent être effectuées dès la préparation des boîtes ou après quelques jours; dans ce cas la culture bactérienne est développée. On observe l'évolution des stries de levures.

On peut procéder à un ensemencement par point des levures sur une culture bactérienne développée. On doit alors préparer une boîte témoin sans culture bactérienne pour comparer le développement des levures dans chaque cas.

Enfin on peut inoculer la boîte par une culture mixte et observer le fond de la boîte sur une surface sombre après quelques jours d'incubation; les colonies de l'organisme inhibiteur doivent s'entourer de zones où l'autre organisme ne se développe pas.

CHAPITRE III

ETUDE NUMERIQUE DES MICROORGANISMES EN PRESENCE

Cette étude a pour but de nous faire connaître, d'une part, si le nombre de levures actives est affecté par la présence de bactéries lactiques, et quel est, d'autre part, l'évolution numérique des bactéries dans les cultures mixtes.

I. ÉVOLUTION NUMERIQUE DES LEVURES EN PRESENCE DE BACTERIES

Suivant le moment ou l'importance de l'apport bactérien, on réalise des conditions expérimentales où les levures se trouvent en présence de nombres différents de bactéries.

A) INFLUENCE DE L'EPOQUE D'ENSEMENCEMENT

La numération des levures vivantes est effectuée à la fois dans un témoin de fermentation alcoolique (T) où elles se multiplient seules et dans des essais où elles fermentent en présence de bactéries lactiques.

Le pH du moût est ici égal à 4,0.

L'évolution du nombre de levures en fonction du temps est représentée par les courbes de la fig. 3; qui font apparaître l'influence défavorable de la présence des bactéries lactiques sur la multiplication des levures. Si l'ensemencement bactérien est antérieur de 3 jours au levurage (condition désignée par EA_3), le nombre de levures ne dépasse pas le tiers de ce qu'il est dans le témoin. Si l'ensemencement bactérien et le levurage sont simultanés, la multiplication des levures est normale jusqu'au deuxième jour, après quoi elle s'arrête; le nombre maximum de levures vivantes reste inférieur à la moitié du maximum atteint dans le témoin. Si l'ensemencement bactérien est postérieur au levurage (condition conventionnellement désignée par EP_1 pour un ensemencement bactérien réalisé ici 1 jour après le levurage) les bactéries exercent encore une action inhibitrice sur la multiplication des levures.

Le nombre de levures vivantes est d'autant plus affecté dans les cultures mixtes que les bactéries sont mieux développées dans le milieu au moment du levurage.

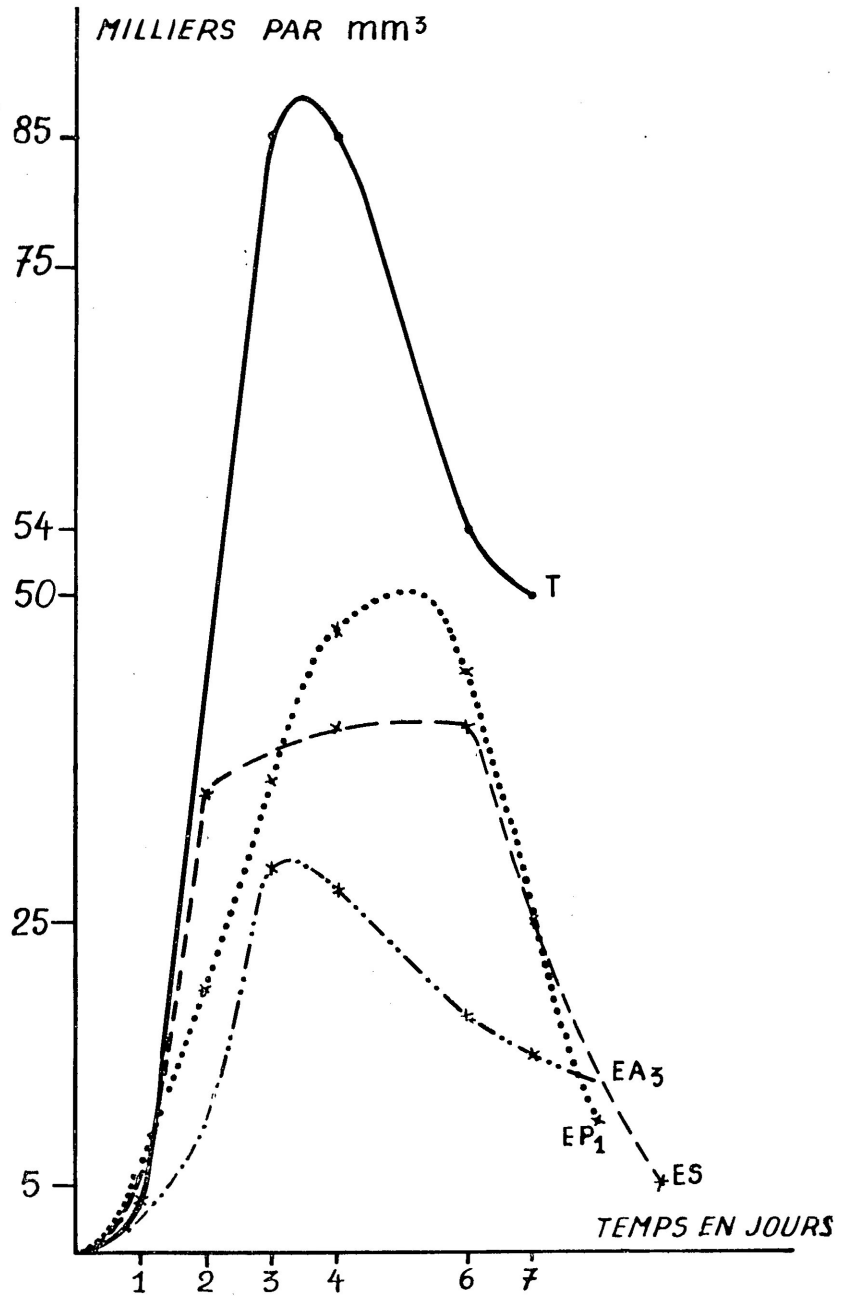


Fig. 3 - Influence des bactéries sur le nombre de levures vivantes, au cours de la fermentation alcoolique, pour trois époques différentes d'ensemencement bactérien.

EA_3 = ensemencement 3 jours avant le levurage
ES = ensemencement simultané au levurage
EP_1 = ensemencement 1 jour après le levurage
T = courbe témoin (levures seules)

B) INFLUENCE DU NOMBRE DE BACTERIES PRESENTES DANS LE MILIEU AU MOMENT DU LEVURAGE

Cette série d'expériences est réalisée à pH 3,6.

Le moût est ensemencé dans ce cas trois jours avant le levurage par des volumes différents de culture bactérienne apportant respectivement 10.000; 20.000; 90.000 et 100.000 bactéries vivantes par mm^3 dans les échantillons respectivement numérotés 1, 2, 3, 4.

Le levurage apporte 200 levures vivantes par mm^3.

L'influence défavorable des bactéries sur la croissance des levures est très nette; dans le cas où le milieu contient 10.000 ou 20.000 bactéries vivantes au moment de l'apport de levures la multiplication de celles-ci est lente; leur nombre maximum reste faible et ne dépasse pas le tiers du nombre observé dans le témoin.

La croissance des levures est encore plus inhibée quand elles se multiplient en présence d'un nombre de bactéries de l'ordre de 100.000 par mm^3. Dans ce cas extrême, on ne dénombre jamais plus de 15.000 levures par mm^3 dans le milieu.

C) CONCLUSION

La présence de bactéries lactiques dans le moût gêne toujours la multiplication des levures. Celle-ci est plus lente et conduit à un nombre maximum inférieur à celui que l'on observe dans le témoin sans bactéries.

L'influence des bactéries sur les levures est fonction de leur nombre au moment où sont introduites les levures. Si l'ensemencement est antérieur au levurage, l'effet est très important; si l'ensemencement est plus tardif (simultané ou postérieur au levurage) l'effet est moindre et se remarque après deux jours de culture mixte, délai nécessaire pour un développement des bactéries.

II. EVOLUTION DU NOMBRE DE BACTERIES LACTIQUES DANS LES CULTURES MIXTES

Après avoir étudié l'importante perturbation apportée à la multiplication des levures par la présence des bactéries lactiques, nous nous proposons de suivre l'évolution de ces bactéries.

A) RAPPEL CONCERNANT LA CROISSANCE BACTERIENNE

Il est établi (LAMBIN et GERMAN, 1961) que l'évolution d'une culture bactérienne comporte schématiquement cinq phases :

— Une phase « de latence » que MONOD (1942) subdivise en deux périodes, la première pendant laquelle la croissance est nulle et l'autre qui correspond à une accélération du taux de croissance.

— Une phase de multiplication désignée par les termes « phase exponentielle ».

— Une phase de ralentissement du taux de croissance.

— Une phase de maximum stationnaire.

— Une phase de déclin ou de décroissance.

B) INFLUENCE DE LA PRESENCE DE LEVURES

1. **Conditions**

Nous décrivons deux exemples, l'un à pH 3,6, l'autre à pH 4,0. La croissance bactérienne est suivie par détermination du poids sec et par dénombrement des cellules vivantes. Nous étudions le cas de l'ensemencement très légèrement antérieur au levurage (EA_1 et EA_2) et celui de l'ensemencement simultané (ES). Exceptionnellement ici, le temps zéro désigne le moment de mise en culture des bactéries. La croissance bactérienne est également suivie dans un témoin sans levures.

2. **Résultats**

Lorsque les bactéries sont introduites dans le milieu en même temps que les levures (ES), la phase de latence ne dure qu'un jour au lieu de deux jours dans le témoin. La phase de croissance rapide débute donc plus tôt que dans le témoin; mais elle s'arrête très vite, dès le troisième jour.

Si les levures sont introduites dans le milieu un jour après les bactéries, cet apport de levures fait immédiatement cesser la latence; la croissance rapide commence donc ici 24 heures plus tôt que dans le témoin. Dans cet échantillon, le nombre de bactéries est le troisième jour deux fois plus élevé que dans le témoin. Mais cette accélération de la croissance bactérienne dure peu; la multiplication prend fin le quatrième jour.

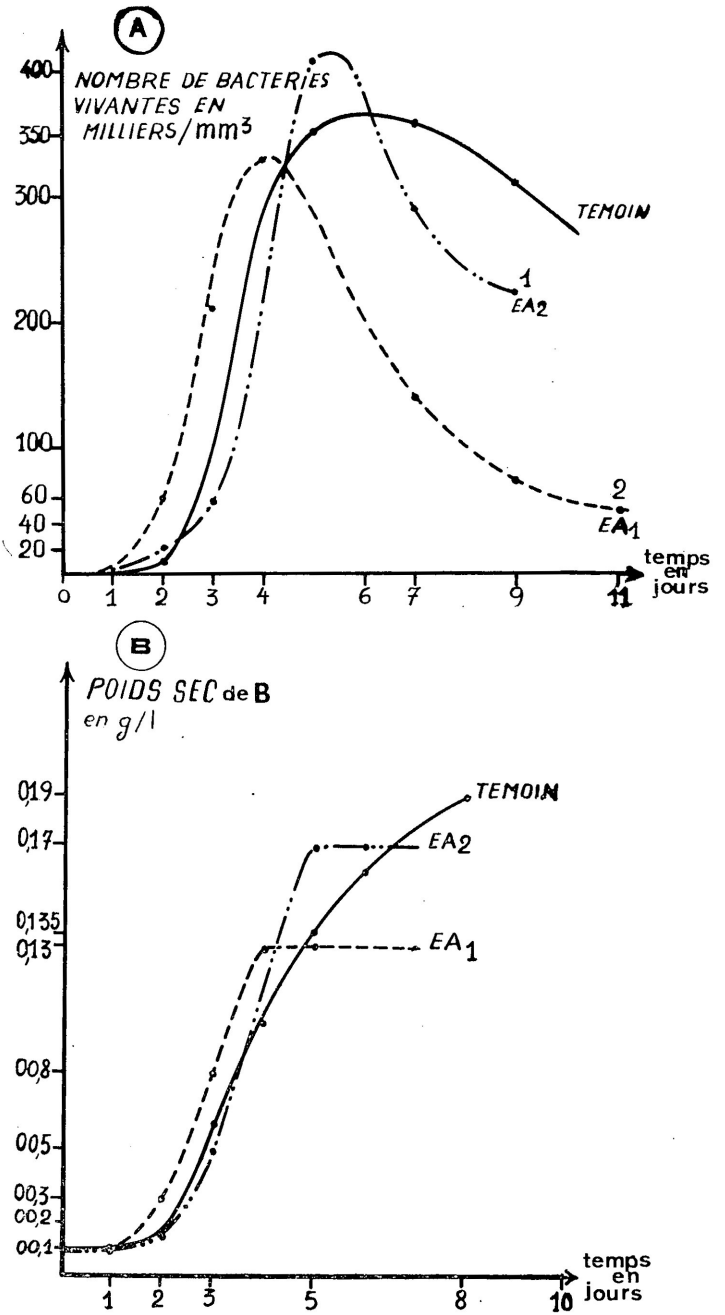


Fig.4 - Influence de l'apport de levures sur la croissance bactérienne à pH = 4,0.
A : Suivie par numération des bactéries vivantes
B : Suivie par néphélométrie
Dans le témoin, les bactéries se multiplient seules.
En culture mixte, les levures sont ajoutées 2 jours après les bactéries (EA_2) et 24 heures après (EA_1).

Si les levures sont introduites deux jours après les bactéries (EA_2), on constate encore une activation passagère de la multiplication bactérienne. Le nombre de bactéries vivantes peut devenir, dans ce cas de culture mixte, supérieur à celui que l'on observe quand les bactéries se multiplient seules dans le même milieu. La fig. 4 représente la croissance bactérienne à pH 4,0 dans un témoin sans levures et dans des cultures mixtes.

3. **Conclusion**

L'influence favorable des levures sur la multiplication des cellules bactériennes est très nette lorsque les bactéries concernées sont jeunes. Cette activation cesse après trois jours de culture mixte dans le cas de l'ensemencement simultané : elle est plus durable si l'introduction des levures est faite alors que les cellules bactériennes sont plus âgées.

III. ACTION RECIPROQUES DES DEUX MICROORGANISMES

1. **Conditions expérimentales**

Nous nous servons d'un exemple déjà décrit, où le levurage est réalisé trois jours après l'ensemencement bactérien, au moment où les milieux contiennent des nombres très différents de bactéries allant de 10.000 à 100.000 par mm^3.

La croissance est suivie par dénombrement des germes vivants.

2. **Résultats**

Si on rapproche l'évolution du nombre de bactéries de celui du nombre de levures, en construisant par exemple les courbes de croissance sur le même graphique, (fig. 5) on décèle l'influence réciproque des deux microorganismes.

En effet, (cas du n° 1), relativement peu de bactéries au moment du levurage ralentissent la multiplication des levures mais ne l'empêchent pas. On peut alors observer une activation des bactéries par les levures. Par contre, un nombre de bactéries voisin de 100.000 par mm^3 inhibe la multiplication des levures de façon considérable, surtout au début de la fermentation alcoolique. Il est donc logique de supposer que les bactéries ne reçoivent pas d'activation de la part de ces quelques levures; le rythme de leur multiplication reste le même.

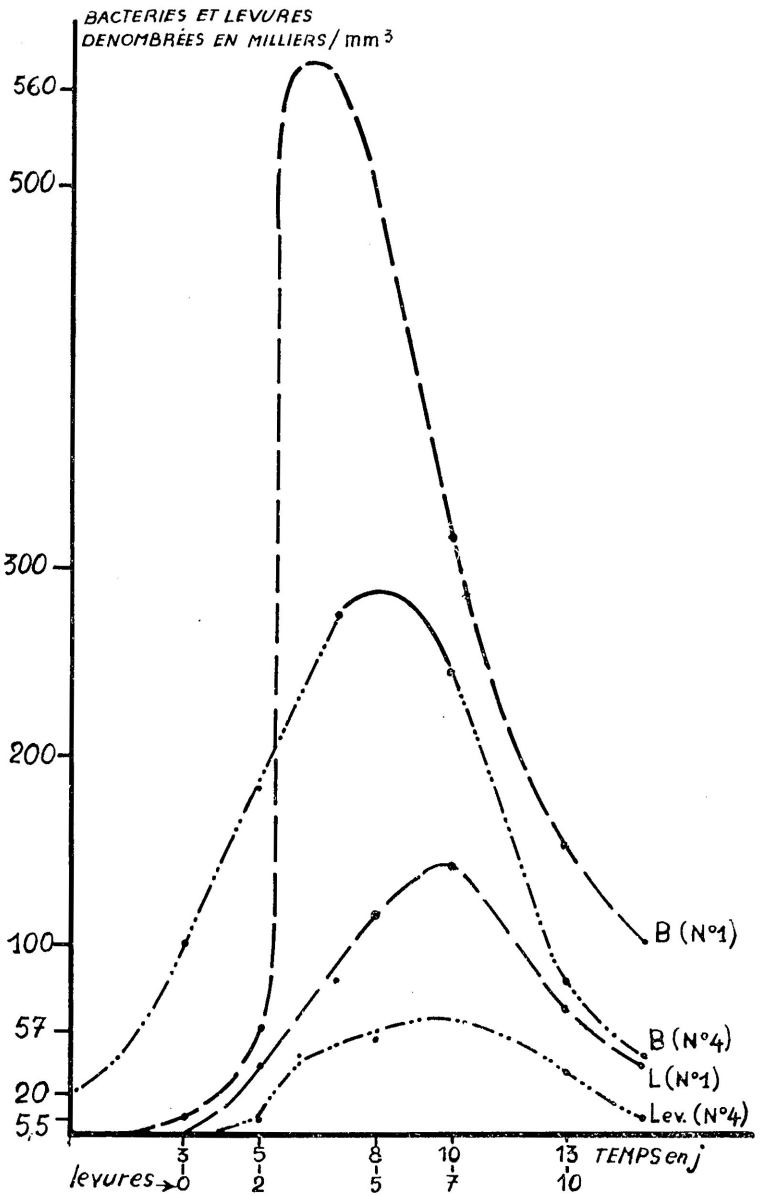


Fig. 5 - Comparaison de l'évolution numérique des levures et des bactéries vivantes en culture mixte. Les échantillons n° 1 et n° 4 contiennent respectivement 10.000 et 100.000 bactéries vivantes au moment du levurage.

IV. CONCLUSION

L'évolution numérique des levures et des bactéries présentes ensemble dans le moût de raisin nous renseigne sur l'antagonisme qui les oppose.

La multiplication des levures est toujours ralentie par la présence de bactéries quel que soit le moment d'introduction de celles-ci mais d'autant plus que les bactéries sont plus nombreuses dans le milieu au moment du levurage.

Par contre, la multiplication des bactéries est activée par la présence de levures; l'apport de levures déclenche la phase de multiplication active des bactéries, écourtant ainsi la phase de latence. L'influence favorable des levures sur les cellules bactériennes moins jeunes est toujours constatée. Dans tous les cas, cependant, l'activation des bactéries par les levures est un phénomène de courte durée.

L'influence réciproque des deux microorganismes est apparente. Les levures activent les bactéries à condition toutefois que celles-ci ne soient pas trop nombreuses pour empêcher le développement des levures. L'activation dure peu car les levures produisent rapidement trop d'alcool, lui-même inhibiteur du développement bactérien.

CHAPITRE IV

ETUDE EXPERIMENTALE DE LA COMPETITION ALIMENTAIRE

Cette étude a pour but de déterminer dans quelle mesure la compétition alimentaire entre les levures et les bactéries, pour les composants carbonés et les composants azotés du moût, peut expliquer l'inhibition observée. Les composés pour lesquels levures et bactéries sont susceptibles d'entrer en compétition sont ceux qu'elles sont toutes deux capables d'utiliser.

Les sucres réducteurs du moût (glucose et fructose) sont fermentescibles par les levures et par les bactéries lactiques. Une mise au point concernant la fermentation lactique des sucres a été faite par FORNACHON (1963).

Les composés azotés du moût constituent également un substrat que levures et bactéries doivent utiliser. La nature des composés azotés du moût a été établie grâce aux travaux de GENEVOIS et RIBÉREAU-GAYON (1936) et à ceux de PEYNAUD (1939). L'azote se trouve dans le vin sous forme d'azote organique comportant protéines, peptones, polypeptides, acides aminés et amides, et sous forme d'azote minéral. En ce qui concerne les acides aminés, la consultation des nombreux travaux réalisés à ce jour, prouve que les vins n'ont pas la même composition qualitative et quantitative selon les différents cépages dont ils proviennent. En outre, la fermentation alcoolique entraîne un appauvrissement et un remaniement qui semble spécifique des levures responsables du phénomène. Enfin, le vin lui-même n'a pas une composition azotée définitive; si une fermentation malolactique intervient, le taux et la nature des acides aminés change.

I. COMPETITION POUR LES SUCRES FERMENTESCIBLES DU MOUT

A) MISE EN EVIDENCE DE L'UTILISATION DES SUCRES PAR LES BACTERIES

Elle peut être faite par la recherche, dans les milieux de culture mixte, des produits spécifiques de la transformation des sucres par les bactéries. En décomposant le glucose, les bactéries hétérofermentaires produisent une fermentation dite lactique mixte (LAMBIN et GERMAN, 1961) conduisant en particulier à la formation d'acide lactique, et d'acide acétique.Par ailleurs, lorsque les bactéries lactiques utilisent le fructose elles forment du mannitol. La présence de ce corps dans les cultures

mixtes est donc la preuve que les bactéries ont soustrait du milieu une certaine quantité du fructose qu'il contenait.

1. Dosage des acidités fixe et volatile.

L'acide lactique n'a pas été dosé mais l'élévation considérable de l'acidité fixe des cultures mixtes par rapport à celle des témoins de fermentation alcoolique pure ne peut être due qu'à l'accumulation d'acide lactique.

TABLEAU II

Influence de la présence des bactéries lactiques sur la teneur finale en acides fixes et volatils

pH	Conditions	Acidité totale		Acidité volatile		Acidité fixe	
		dosée	Différence avec le témoin	dosée	Différence avec le témoin	dosée	Différence avec le témoin
pH = 4,6	Témoin	2,2		0,4		1,8	
	EA_4	10,8	8,5	5,7	5,3	5,1	3,3
	EA_1	11,7	9,4	5,9	5,5	5,8	4,0
	ES	13,3	11,0	7,0	6,6	6,3	4,5
	EP_1	12,9	10,6	6,5	6,1	6,5	4,7
pH = 4,2	Témoin	2,9		0,4		1,5	
	EA_2	13,3	10,4	4,6	4,2	8,7	7,2
	EP_1	13,6	10,7	4,6	4,2	9,0	7,5

Les résultats sont exprimés en g d'acide sulfurique par litre.

Témoin : fermentation alcoolique pure

EA_x : ensemencement bactérien antérieur au levurage de x jours

ES : ensemencement simultané

EP_x : ensemencement bactérien postérieur au levurage de x jours

Les résultats de dosages effectués en fin de fermentation alcoolique dans les divers échantillons contenant levures et bactéries et dans un témoin contenant seulement des levures, sont rassemblés dans le tableau II. A pH 4,6 les plus fortes teneurs en acides volatils sont produites lorsque les bactéries sont apportées au milieu en même temps ou 24 heures après les levures.

2. **Recherche du mannitol**

La recherche du mannitol est effectuée dans tous les milieux fermentés provenant de nos expériences, et conservés après stérilisation en bouteilles. Dans tous les cas de culture mixte, le produit fermenté contient du mannitol alors que le test est négatif avec les milieux de fermentation alcoolique pure.

3. **Conclusion**

Bien que cela fût prévisible, il est prouvé que, dans les conditions de pH élevé exposées ici, les bactéries lactiques se développent au cours de la fermenation alcoolique en prélevant une certaine quantité des sucres fermentescibles. Ce phénomène compétitif conduit à des degrés alcooliques plus faibles.

B) ETUDES DES FACTEURS INFLUENÇANT LA FERMENTATION BACTERIENNE DES SUCRES DANS LES CULTURES MIXTES

1. **Influence du pH**

Il faut s'attendre à ce que les bactéries utilisent davantage de sucre lorsque le pH du milieu se rapproche de 5,0 que quand il est voisin de 3,0. La quantité de sucre fermenté par les levures est connue grâce au dosage de l'alcool dans le milieu. La quantité de sucre fermenté par les bactéries ne peut être déterminée que par différence entre la quantité de sucre du moût et celle de sucre fermenté par les levures. Certains résultats obtenus à différents pH sont groupés dans la fig. 6. L'observation de l'acidité volatile des cultures mixtes aux différents pH conduit aux mêmes conclusions.

2. **Influence du moment d'introduction des bactéries**

La figure 6 fait ressortir l'importance du moment d'introduction des bactéries. La quantité de sucre prélevée par les bactéries à pH 4,0 dépasse 15 % du sucre total dans le cas de l'ensemencement antérieur au levurage, et atteint 12 % dans le cas de l'ensemencement simultané. On remarque que le prélèvement de sucre par les bactéries est continu au

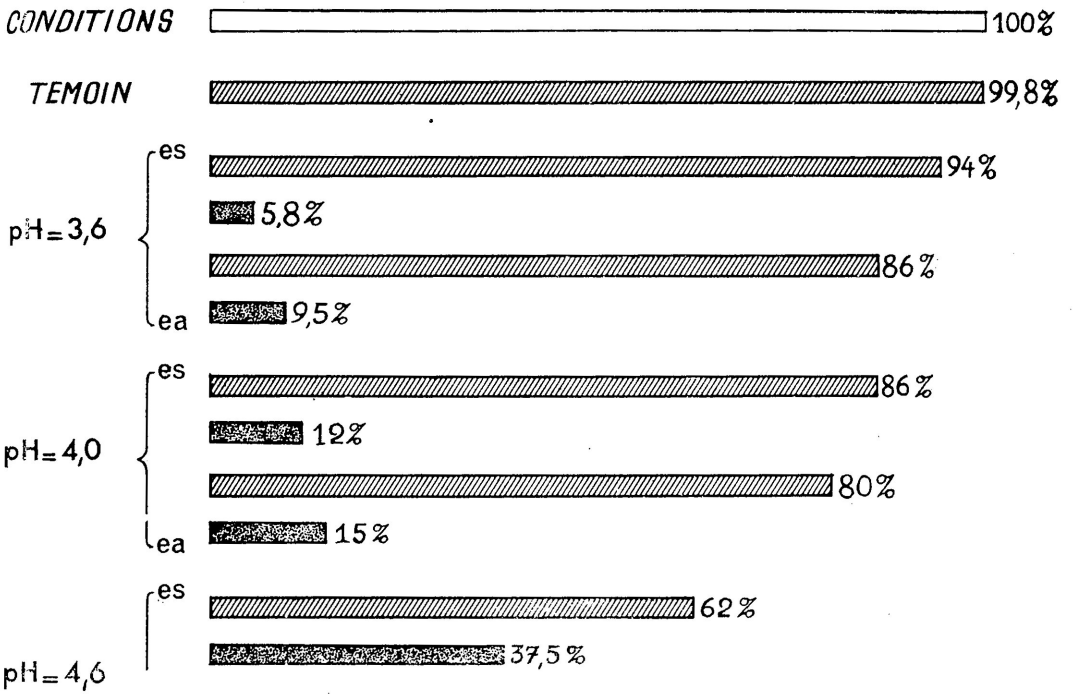


Fig. 6 - Pourcentages de sucres réducteurs fermentés par les levures d'une part et les bactéries d'autre part, dans les cultures mixtes, suivant le pH et l'époque d'introduction des bactéries dans le milieu

e s : ensemencement simultané par levures et bactéries
e a : ensemencement bactérien antérieur au levurage

Quantité de sucre fermenté par les levures.

Quantité de sucre fermenté par les bactéries.

cours de la fermentation alcoolique, ce qui prouve encore que les bactéries se développent en même temps que les levures. Comme on pouvait s'y attendre, l'ensemencement bactérien antérieur au levurage entraîne une consommation de sucres par les bactéries plus importante que dans les autres conditions expérimentales.

3. **Influence de la présence de levures.**

Nous comparons ici la fermentation bactérienne des sucres en culture pure et en culture mixte dans le cas d'un ensemencement simultané. La figure 7 représente l'évolution dans le temps de la vitesse d'utilisation des sucres par les bactéries. La courbe est régulière si les bactéries sont

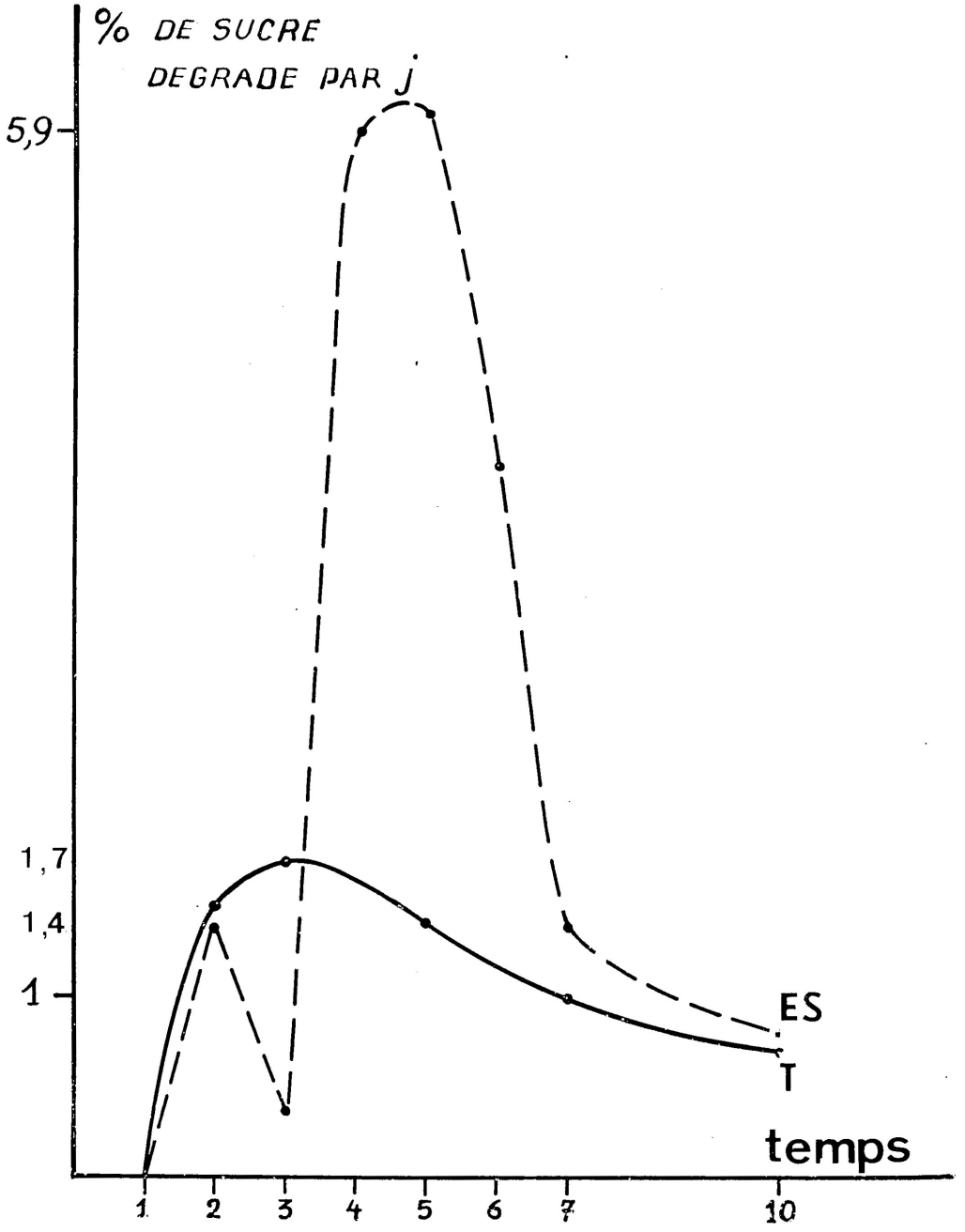


Fig. 7 - Evolution en fonction du temps de la quantité de sucre utilisée par jour par les bactéries en culture pure (T) ou en culture mixte avec ensemencement simultané (ES).

seules dans le milieu ; pour une même condition de pH et pendant une durée d'observation de huit jours, la quantité de sucre métabolisé, par jour, augmente jusqu'au troisième jour puis elle diminue lentement. Dans les cas d'ensemencement mixte, au contraire, on observe une certaine irrégularité de la vitesse de fermentation bactérienne des sucres jusqu'au troisième jour puis une extraordinaire accélération de celle-ci les quatrième et cinquième jours ; en effet, la quantité de sucre fermenté par les bactéries devient trois fois plus importante qu'elle ne l'était en culture pure. Le sixième jour, la vitesse de fermentation bactérienne reste encore deux fois plus importante mais elle décroît rapidement.

Il est certain que ce phénomène est étroitement lié à l'activation observée au chapitre précédent de la multiplication des bactéries par les levures.

Ainsi, en présence de levures, les bactéries utilisent plus de sucre qu'en leur absence, le maximum du prélèvement bactérien se situant entre le troisième et le septième jour.

II. COMPETITION POUR LES COMPOSES AZOTES DU MOUT.

Le but de notre étude est de déterminer la teneur en azote total et la nature des acides aminés offerts par le moût de base, puis de préciser l'évolution de ces corps sous l'influence des souches de microorganismes étudiées. Nous espérons de cette façon, apprendre s'il y a ou non compétition entre les levures et les bactéries lactiques pour les constituants azotés du moût.

A) ETUDE COMPAREE DE L'EVOLUTION DE L'AZOTE TOTAL DANS LES CULTURES MIXTES ET DANS LES CULTURES PURES DE LEVURES ET DE BACTERIES

1. **Conditions de fermentation**

Le dispositif expérimental est identique à celui qui nous a aidé à déterminer la compétition pour les sucres réducteurs. A pH 3,6 et à pH 4,0 les bactéries sont placées dans le milieu avant les levures (2, 3 et 4 jours suivant les cas; conditions conventionnellement désignées par l'abréviation EAx). On dispose également de cultures pures de levures et de bactéries (TL et TB). L'inhibition des levures est constatée dans tous les cas de culture mixte que nous décrivons.

2. **Résultats**

Le moût de base contient 303 mg par litre d'azote total. Les dosages d'azote effectués en fin de fermentation et après élimination des micro-organismes, donnent des résultats rapportés dans le tableau III.

TABLEAU III

Comparaison des teneurs en azote total du moût et des produits fermentés soit par des cultures pures de levures ou de bactéries, soit par des cultures mixtes

pH	Conditions	Degré alcoolique	Azote total	
			résiduel (mg par l)	utilisé (p. 100)
	Moût de base		303	
3,6	**Cultures pures**			
	TL	11°1	185	39 %
	Cultures mixtes			
	EA_4	9°5	230	24%
	EA_3	10°8	218	28 %
	ES	11°1	185	39 %
4,0	**Cultures pures**			
	TL	10°3	180	40 %
	TB		276	9 %
	Cultures mixtes			
	EA_3	7°7	196	35 %
	EA_2	6°7	200	34 %

TL : Levures seules dans lc milieu
TB : Bactéries seules dans le milieu
EA_x : Cultures mixtes avec ensemencement bactérien antérieur au levurage de x jours
ES : Culture mixte avec ensemencement simultané

Les degrés alcooliques figurent dans ce même tableau afin de montrer l'importance de l'inhibition. Dans les témoins où la fermentation se déroule sous la seule influence des levures, nous constatons une diminution du taux d'azote total de l'ordre de 39 % à pH 3,6 et de 40 % à pH 4,0.

Dans les cas où les bactéries se développent seules, 9 % seulement de l'azote total sont consommés à pH 4,0 qui est une condition favorable au développement bactérien.

Dans le cas d'ensemencement mixte, l'azote utilisé par les levures et les bactéries varie de 24 à 39 % à pH 3,6 alors qu'il est de l'ordre de 35 % à pH 4,0.

3. **Conclusion**

La quantité d'azote total que les levures seules utilisent pendant la fermentation alcoolique est très élevée, alors que les bactéries lactiques n'effectuent qu'un faible prélèvement d'azote total en dix jours d'incubation.

Quand les levures fermentent en présence de bactéries pendant dix jours, le milieu est toujours moins appauvri en azote total que lorsque les levures fermentent seules.

Il n'est cependant pas facile de conclure car, dans les cultures mixtes, la consommation d'azote dépend de la croissance des deux micro-organismes. Si la croissance des levures est inhibée par la présence des bactéries, le milieu conservera d'autant plus d'azote total que l'inhibition sera importante. Cependant si le développement bactérien est favorisé soit pas l'activation que les bactéries reçoivent des levures soit par un pH élevé, le prélèvement d'azote par les bactéries s'élève. Aucun moyen ne permet de déterminer la part d'azote attribuable aux levures seules et aux bactéries seules dans les cultures mixtes. Le moût contient assez d'azote total pour permettre (au moins pendant la durée de la fermentation alcoolique) le développement simultané des levures et des bactéries lactiques.

B) ETUDE QUALITATIVE DES AMINOACIDES DU MOUT DE BASE

Toutes les figures que nous présentons ici ont été décalquées sur nos chromatogrammes; les intensités des taches reproduisent aussi fidèlement que possible les concentrations apparentes des divers spots. La figure 8 représente le chromatogramme des acides aminés contenus

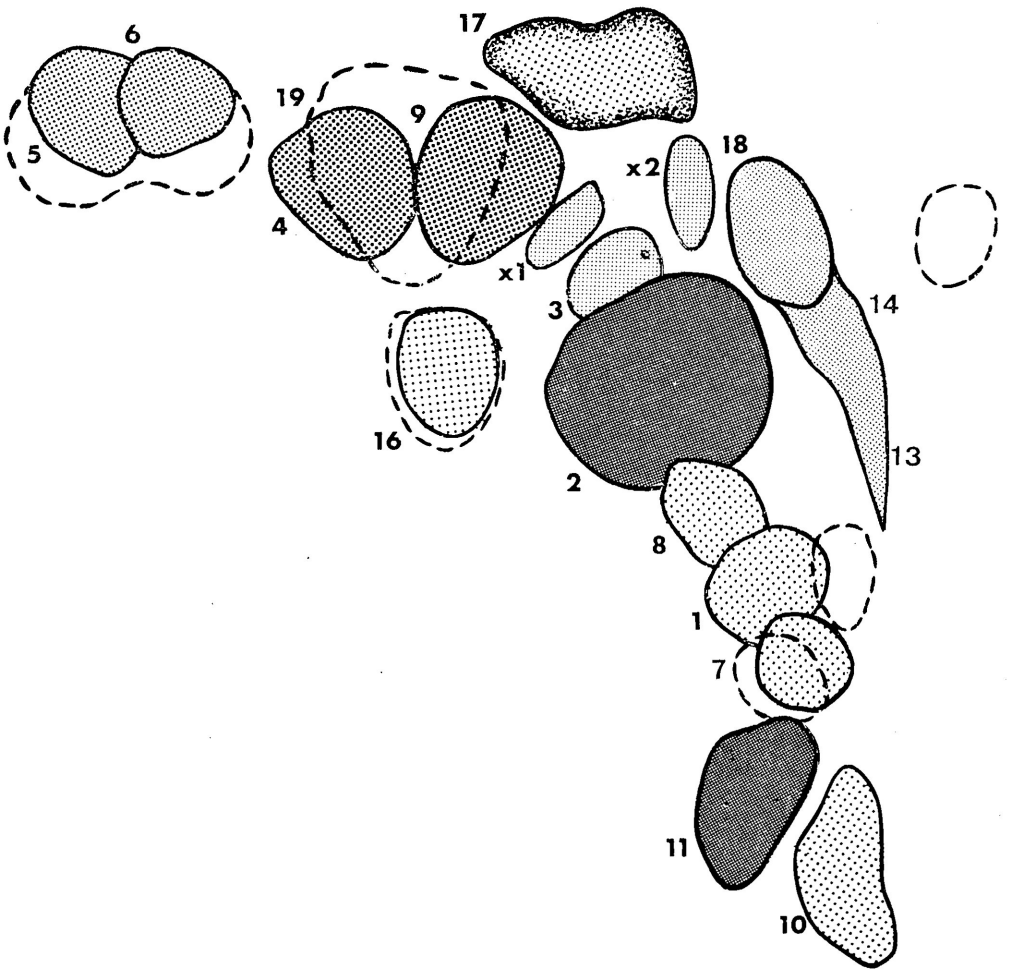


Fig. 8 - Chromatographie des acides aminés du moût de base (spot de 20 mm3, d'un éluat concentré jusqu'à 2 cm3)

1 glycocolle
2 alanine
3 β-alanine
4 valine
5 leucine
6 isoleucine
7 sérine
8 thréonine
9 méthionine
10 ac.aspartique + asparagine
11 acide glutamique
13 lysine
14 arginine
16 tyrosine
17 proline
18 histidine
19 tryptophane

dans 0,5 cm^3 de moût (on part de 50 cm^3 de moût que l'on concentre 25 fois et on réalise la chromatographie de 20 mm^3 du produit concentré).

Le moût contient donc par ordre de quantité décroissante l'alanine (2), la glutamine (11), la proline (17), la méthionine (9), puis en quantité légèrement inférieure : la valine (4), la leucine (5), l'isoleucine (6), l'acide aspartique et l'asparagine (10), non dissociés sur le chromatogramme, et la tyrosine (16). Viennent ensuite en quantité sensiblement équivalente la sérine (7), le glycocolle (1), la thréonine (8), l'histidine (18), l'arginine (14) et la lysine (13). Enfin, les acides aminés les moins importants sont la β-alanine, (3) et deux corps non identifiés se révélant, l'un (x 1) entre la β-alanine et la méthionine, l'autre (x 2) entre la β-alanine, l'histidine et la proline. Ces corps inconnus sont si peu concentrés qu'il n'apparaissent plus sur les chromatogrammes réalisés avec une prise d'essai deux fois plus faible.

Parmi les acides aminés non révélés par la ninhydrine mais fluorescents en lumière de Wood, le tryptophane est le plus concentré mais il en existe d'autres (en pointillé sur la figure) que nous n'avons pas identifiés.

C) ETUDE COMPAREE DE L'EVOLUTION DE CES ACIDES AMINES DANS LES CULTURES PURES DE LEVURES OU DE BACTERIES

1. **Influence des levures seules**

Cette étude est faite après huit jours de fermentation alcoolique avant que le phénomène d'autolyse des levures ait pu rendre au milieu certains composés azotés.

La figure 9 représente côte-à-côte en B le chromatogramme du produit fermenté par les levures seules et en A celui du moût, mais ce dernier est à dessein obtenu à l'aide d'un volume deux fois plus faible afin que si une tache en B est moins intense qu'en A, on sache que plus de la moitié de l'acide aminé considéré a disparu.

Nous observons en premier lieu une importante utilisation par les levures des acides aminés de la série aliphatique; la β-alanine disparaît complètement, l'alanine est extrêmement diminuée ainsi que la valine, la leucine et l'isoleucine. Les acides aminés hydroxylés (sérine et thréonine), la méthionine (acide aminé soufré), et les acides monoaminés dicarboxyliques (acides aspartique et glutamique) sont également très diminués à la suite de la fermentation alcoolique. En somme tous les acides monoaminés présents sont métabolisés, sauf le glycocolle.

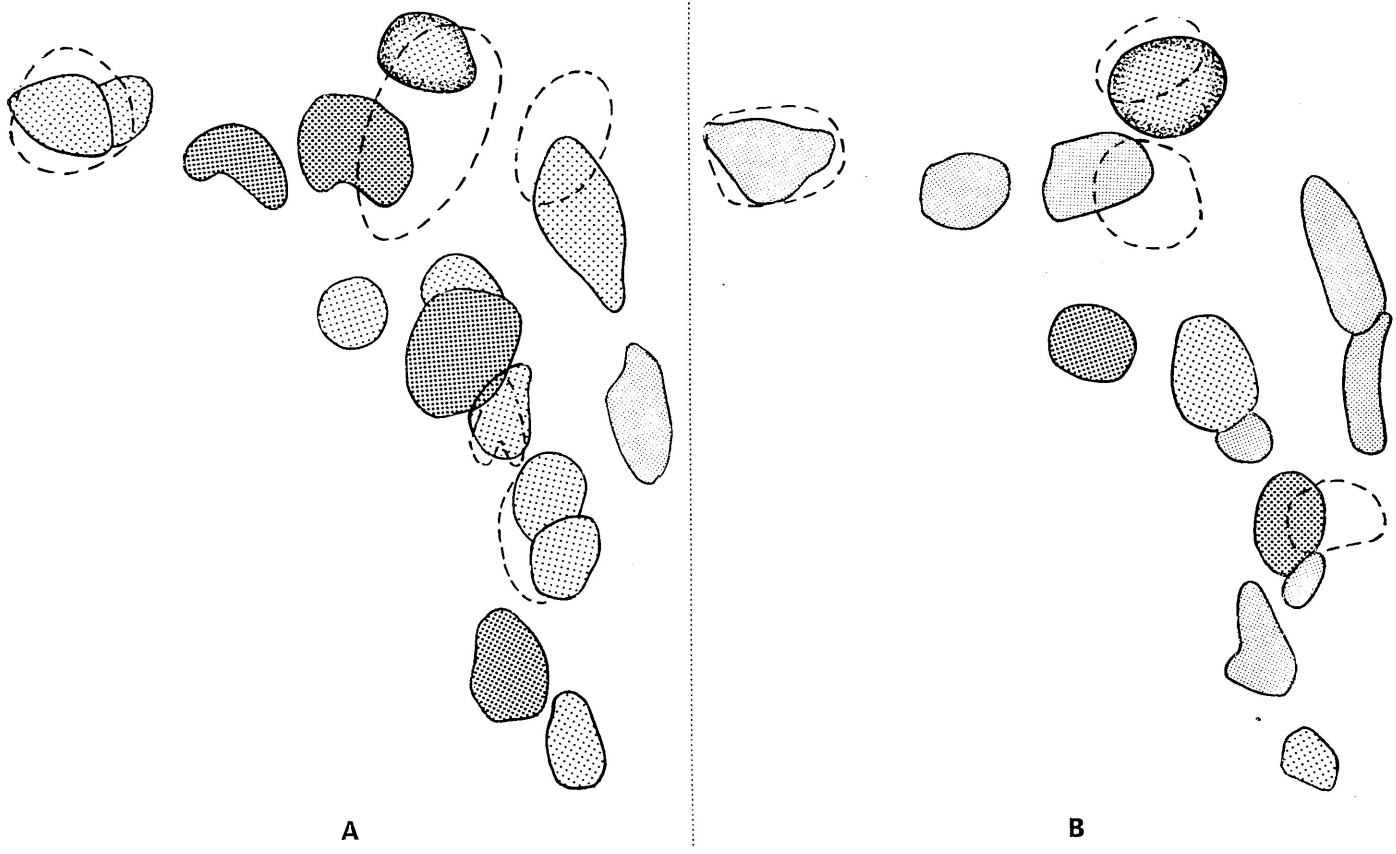


Fig. 9- Chromatogrammes des acides aminés du moût (A) et du produit fermenté par les levures seules (B). Pour la chromatographie du moût le volume utilisé est deux fois plus faible que pour celle du produit fermenté par les levures seules.

Parmi les acides diaminés, la lysine est très utilisée alors que l'arginine l'est peu.

Parmi les acides aminés cycliques, proline et tyrosine ne semblent pas diminuer au cours de la fermentation alcoolique mais l'histidine est largement métabolisée.

L'évolution des aminoacides au cours de la fermentation a fait l'objet de nombreux travaux et en leur comparant nos résultats, nous remarquons que la forte consommation de β-alanine, méthionine et valine est également constatée par COLAGRANDE et AMBROGGI (1958) alors que pour d'autres auteurs dont WEISS **et al.** (1960), les acides aminés qui diminuent le plus au cours de la fermentation alcoolique sont la sérine, la thréonine et la glutamine. Le désaccord entre les divers résultats s'explique par le fait que ni les milieux ni les souches de levures engagées dans la fermentation alcoolique ne sont les mêmes. Pour appuyer cette affirmation nous pouvons citer une étude réalisée sur les moûts de bière par JONES et PIERCE (1964) montrant précisément que l'absorption d'un acide aminé (l'arginine) varie suivant la souche de levure employée et dépend en règle générale des conditions de milieu et de la concentration des autres acides aminés dans ce milieu.

2. **Influence des bactéries lactiques**

Les bactéries sont cultivées sept jours dans le milieu à pH 4. La figure 10 B représente les acides aminés restant dans ce milieu. Elle est rapprochée du chromatogramme 10 A des aminoacides contenus dans le même volume de moût. On remarque en premier lieu une faible différence entre les deux; la dégradation bactérienne des aminoacides concerne surtout la série aliphatique; la β-alanine est éliminée du milieu, les leucines le sont presque aussi. La valine est un peu utilisée et il en est de même des acides aspartique et glutamique. Par contre, l'arginine et la lysine sont très diminués, la tyrosine disparaît, l'histidine est vraisemblablement utilisé. Mais la concentration d'un grand nombre d'acides aminés reste inchangée; ce sont : le glycocolle et l'alanine, la sérine et la thréonine, la méthionine, la proline.

Il est remarquable de constater que les bactéries comme les levures éliminent la β-alanine. D'autre part, les bactéries utilisent la totalité de la tyrosine du moût alors que les levures la laissent inchangée. Les bactéries semblent utiliser davantage de leucine et d'isoleucine que les levures.

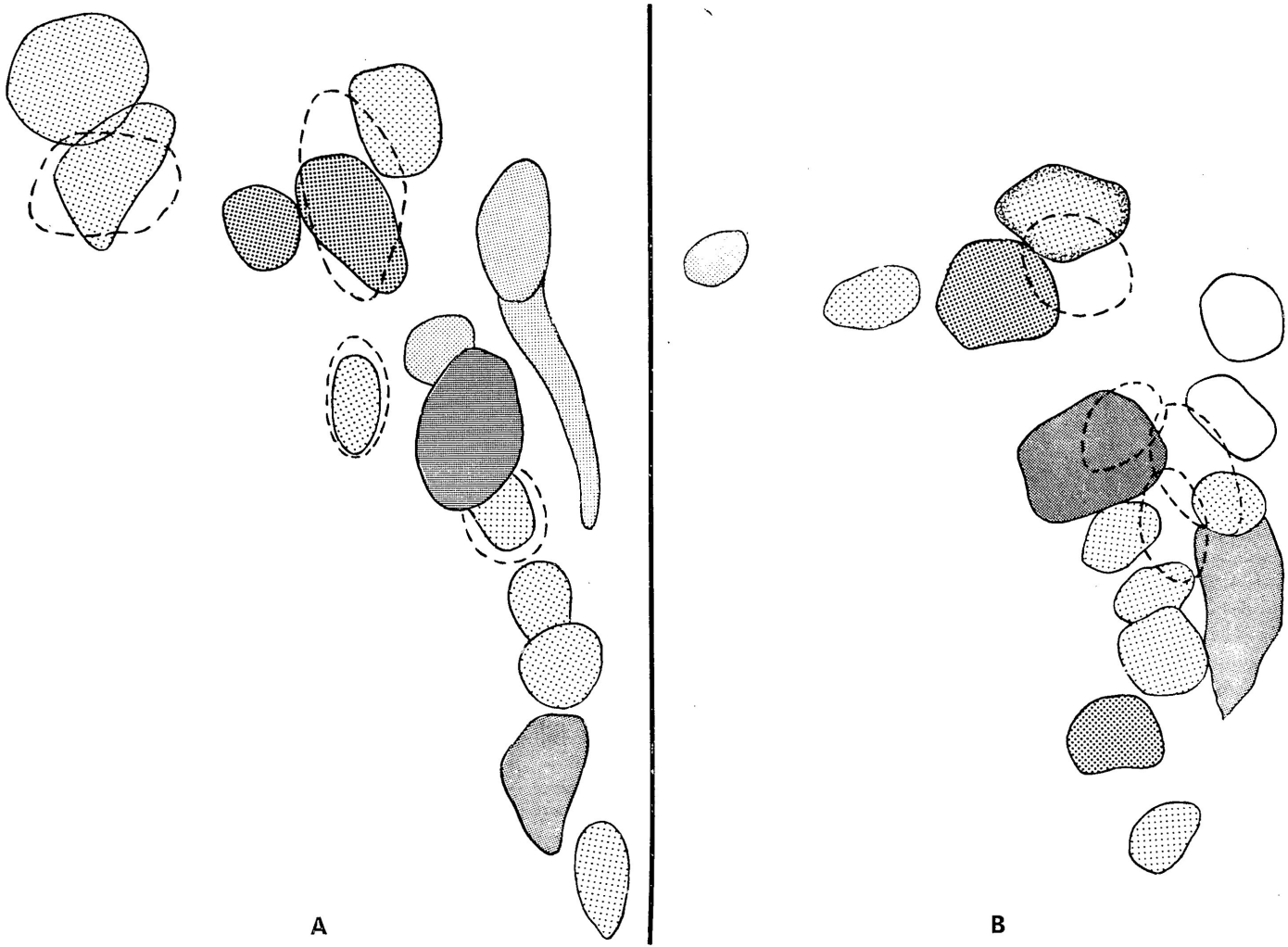


Fig. 10 - Chromatogrammes des acides aminés du moût (A) et du milieu fermenté par les bactéries (B).

Enfin, le chromatogramme des acides aminés du milieu d'incubation des bactéries est surchargé par un spot n'existant pas dans le moût. La concentration de ce corps est importante; il sera identifié par la suite.

D) ETUDE COMPAREE DE L'EVOLUTION DES AMINOACIDES DANS LES CULTURES MIXTES

Les chromatogrammes des acides aminés présents dans les milieux après huit jours de culture mixte sont représentés par la figure 11. Quand ont les compare aux figures 9 et 10 qui correspondent aux cultures pures, on note que le nombre et la concentration des spots y paraissent en général plus importants que dans les cultures pures de levures et moins importants que dans les cultures pures de bactéries. Ainsi dans la plupart des cas, les acides aminés plus concentrés après culture mixte que fermentation alcoolique pure sont notamment : l'alanine et la β-alanine, la valine, la sérine, la méthionine, les acides aspartique et glutamique. Enfin l'apparition d'un composé inconnu X surcharge les chromatogrammes et tend à renforcer cette impression de plus grande richesse.

A la lumière des résultats obtenus en culture pure, on pouvait s'attendre à la disparition totale de la tyrosine (puisque les bactéries seules l'utilisent totalement), ainsi qu'à la diminution des leucines, de l'histidine, de l'acide aspartique et de la glutamine. Par contre, la présence de la β-alanine est surprenante puisque ce corps est totalement utilisé par les bactéries seules et par les levures seules. La disparition de la thréonine en culture mixte, alors que les bactéries ne semblent pas l'utiliser et que les levures seules ne l'épuisent pas complètement est également étonnante.

Nous retiendrons que la composition en acides aminés des milieux de culture mixte reflète l'inhibition des levures par les bactéries; c'est parce que les levures n'ont pas pu s'y développer normalement que ces milieux sont relativement peu épuisés. D'autre part, le développement bactérien s'accompagne de l'émission dans le milieu d'un acide aminé inconnu X.

Ce corps se rencontre dans tous les milieux qui ont contenu des bactéries lactiques.

1. **Influence du pH**

Les cultures mixtes sont effectuées à pH 4,0 et 3,6. Dans ce dernier cas, il ne reste plus dans le milieu que 11 des 20 aminoacides qu'il contenait avant incubation. La leucine et l'isoleucine, la tyrosine, l'arginine,

la lysine, la thréonine, x1, x2, x3 ont disparu. Le milieu contient en plus le corps inconnu X. A pH 4,0 on note encore la présence d'histidine et des leucines. L'intensité de la tache X est en outre plus importante. Il est donc probable que les bactéries se développant mieux à ce pH, inhibent davantage les levures et qu'en conséquence les acides aminés sont moins utilisés.

2. **Influence du moment d'introduction des bactéries par rapport au levurage**

Nous ne pouvons comparer que des essais effectués dans les mêmes conditions de pH

a) à pH 4,0

Les bactéries sont introduites, soit deux jours avant les levures, soit trois jours avant.

Le nombre de spots est le même. Ils sont plus intenses si les bactéries ont été introduites plus tôt. L'importance de la tache X dans ce cas prouve un bon développement bactérien. On peu conclure qu'à ce pH il reste une plus forte concentration d'acides aminés dans le cas d'ensemencement bactérien antérieur de trois jours au levurage que dans le cas d'un ensemencement bactérien plus rapproché.

b) à pH 3,6

Nous étudions trois conditions : ensemencement bactérien antérieur de 4 jours (figure 11 A) et de trois jours (figure 11 B) au levurage et ensemencement simultané (figure 11 C).

C'est la culture mixte avec ensemencement bactérien précédant le levurage de trois jours qui épuise le plus le milieu. L'importance de la tache X montre que les bactéries se sont moyennement développées dans ce cas, les levures ont été peu inhibées et leur prélèvement reste important. Il s'y ajoute un prélèvement bactérien notable.

Ce résultat n'est pas en contradiction avec ce que nous venons d'écrire; la culture mixte de levures et de bactéries épuise généralement moins que ne le fait la culture pure mais à côté de ces cas fréquents, il nous est arrivé d'obtenir des chromatogrammes très dépouillés comme celui de la figure 11 C. Il ne reste plus dans le milieu que dix acides aminés (le onzième étant la susbtance inconnue X).

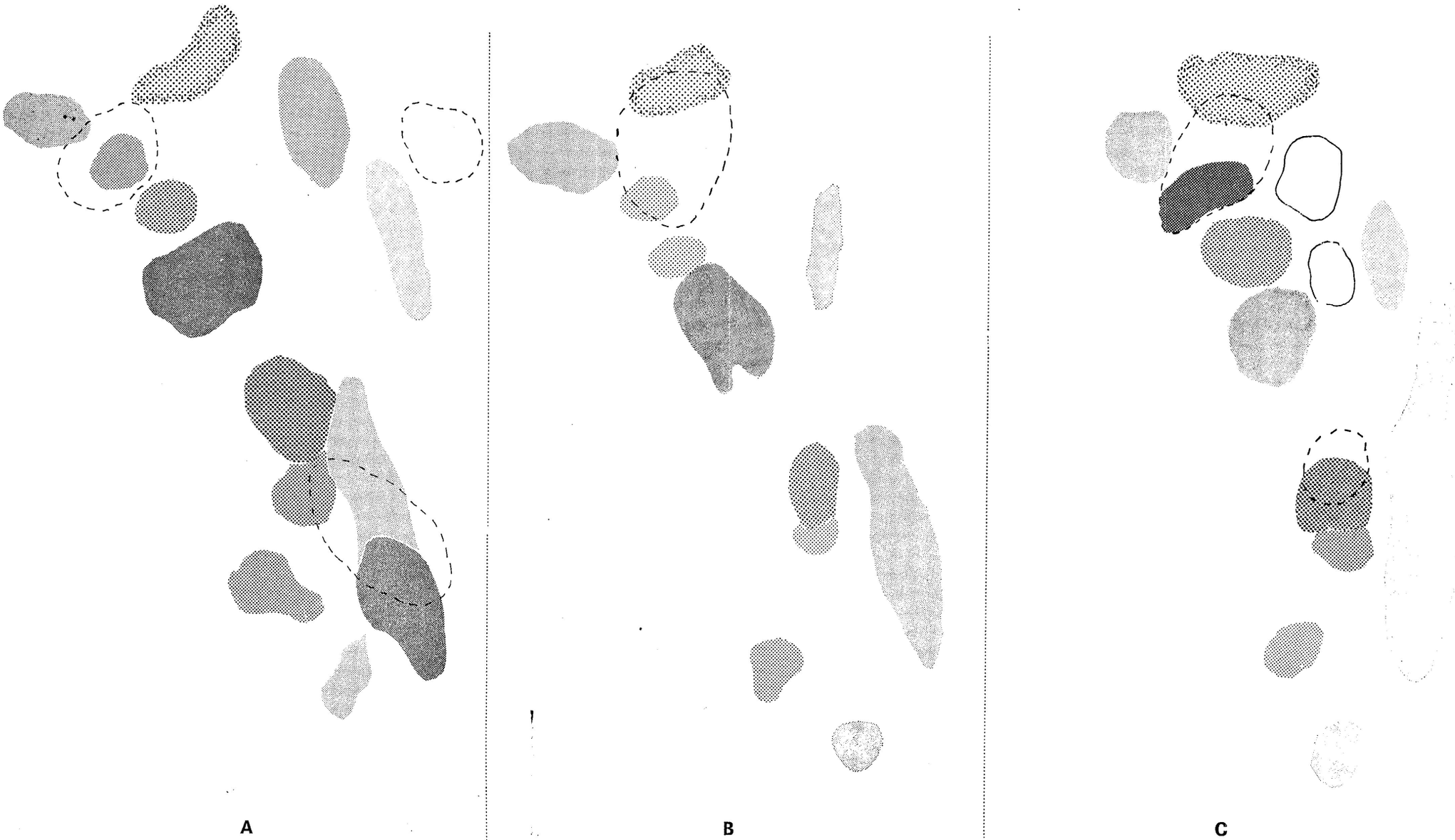


Fig. 11 - *Chromatogrammes des acides aminés présents dans le milieu après 8 jours de culture mixte à pH 3,6* .
Les bactéries sont apportées au milieu 4 jours (en A) et 3 jours (en B) avant les levures; et en même temps en C . .

On note la disparition de la tyrosine, des leucines, de la thréonine, de l'arginine et de la lysine. De plus, la méthionine, les acides aspartique et glutamique, l'histidine sont très diminués. Le glycocolle lui-même est attaqué. En somme, tous les aminoacides sont attaqués, sauf l'alanine.

Il n'est donc pas exclu que la concurrence entre les levures et les bactéries existe dans ce cas et qu'elle soit déterminante. La disparition de la thréonine, jamais observée dans les cultures pures et l'utilisation du glycocolle pourraient résulter de la disparition d'autres acides aminés. Les levures en effet utilisent parfois certains acides aminés en remplacement d'autres, absents du milieu.

III. CONCLUSION

Dans les milieux où elles parviennent à se développer en même temps que les levures, les bactéries prélèvent une quantité notable des sucres fermentescibles. L'importance du prélèvement est lié à trois critères : le pH qui favorise d'autant mieux la croissance bactérienne qu'il est plus élevé, l'époque d'ensemencement bactérien par rapport au levurage, l'activation des bactéries par la présence des levures.

Ces conditions optimales du développement des bactéries étant réalisées, le prélèvement du sucre est si important qu'il justifie les différences de plusieurs degrés d'alcool observées entre les cultures mixtes et les témoins de fermentation alcoolique pure.

Cependant, la compétition alimentaire pour les sucres ne peut en aucun cas expliquer le retard ou le ralentissement de la fermentation alcoolique dans les cultures mixtes tout au début de l'incubation c'est-à-dire quand le milieu contient une forte quantité de sucre.

Le prélèvement d'azote total au moût par les bactéries ne représente vraisemblablement pas un facteur compétitif pour les levures.

L'étude de la composition en acides aminés des milieux où se sont développé levures ou bactéries montre que la fermentation alcoolique pure épuise davantage le moût en acides aminés que ne le fait une culture bactérienne pure.

La composition des milieux de culture mixte dépend étroitement des conditions de pH et du moment d'introduction des bactéries par rapport au levurage.

Les milieux les plus épuisés en acides aminés sont ceux où l'inhibition a été moyenne; dans ce cas les levures font fermenter et appauvrissent le milieu mais les bactéries se développent également, comme le prouvent la disparition de la tyrosine et des leucines et la présence du corps X.

Les autres cas sont des intermédiaires; si les levures sont très inhibées, on observe une sorte de protection des acides aminés. Ce phénomène peut être dû à l'action des bactéries sur le nombre des levures. Il peut aussi se faire que la présence d'un acide aminé nouveau à très forte concentration dans le milieu, gêne la fixation des autres acides aminés par les levures.

Certains aminoacides du moût sont utilisés par les bactéries et les levures au point de disparaître parfois.

Il est donc probable que le prélèvement d'acides aminés par les bactéries représente un facteur inhibiteur, puisque ceux-ci améliorent généralement la multiplication des levures du genre **Saccharomyces.**

CHAPITRE V

ROLE DES PRODUITS INTERMEDIAIRES DE LA FERMENTATION ALCOOLIQUE DANS LA COMPETITION

L'acide pyruvique et l'éthanal sont produits au cours des réactions intermédiaires de la fermentation alcoolique; une faible quantité de chacun est émise dans le milieu. L'éthanal ainsi libéré a été soigneusement dosé par LAFON (1955) et la teneur en acide pyruvique libre du moût en fermentation a fait l'objet des travaux de LAFON - LAFOURCADE et PEYNAUD (1966). D'après ces différents auteurs, la teneur en éthanal titré dans le milieu augmente rapidement pendant la fermentation des premiers 50 g. de sucre pour décroître ensuite; c'est également au début de la fermentation que la teneur en acide pyruvique s'élève « jusqu'à un maximum qui correspond sensiblement à la transformation de la moitié du sucre initial » pour diminuer ensuite lentement. BLOUIN et PEYNAUD (1963) ont démontré la présence de 10 à 460 mg d'acide pyruvique dans les vins; ceux-ci contiennent par ailleurs 40 à 120 mg par litre d'éthanal libre.

Les milieux fermentés que nous obtenons expérimentalement à la suite d'ensemencements mixtes ne contiennent jamais d'acide pyruvique libre et moins d'éthanal que le produit de la fermentation du même moût par les levures seules. Nous nous proposons donc d'étudier la dégradation de ces deux corps par les bactéries lactiques.

I. UTILISATION BACTERIENNE DE L'ACIDE PYRUVIQUE

A) MISE EN EVIDENCE

Il suffit d'ajouter au moût du pyruvate de sodium afin de réaliser une série d'enrichissements respectivement de 5, 10. 20. 50, 100 et 200 mg d'acide pyruvique par litre. Les échantillons sont stérilisés puis ensemencés par une culture bactérienne à raison de 1 cm^3 pour 400 cm^3 de milieu. Après huit jours d'incubation, aucun des échantillons ne contient plus d'acide pyruvique; les bactéries sont donc capables de faire disparaître en huit jours des doses d'acide pyruvique allant jusqu'à 200 mg. par litre.

B) VITESSE D'UTILISATION DE L'ACIDE PYRUVIQUE

1. **Conditions expérimentales**

Le moût est enrichi en acide pyruvique que l'on dose avant l'ensemencement bactérien. L'un des échantillons, contenant 70 mg par litre

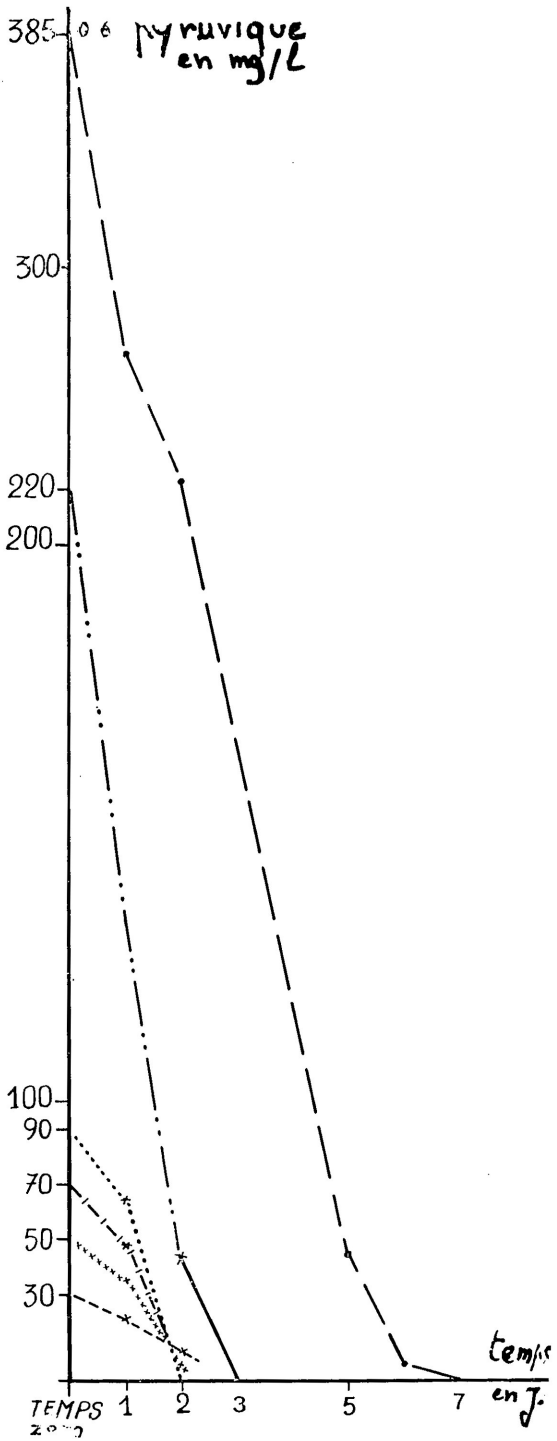


Fig. 12 - Diminution du taux d'acide pyruvique au cours de la fermentation lactique d'un moût initialement additionné de quantités différentes d'acide pyruvique.

n'est pas ensemencé, il indique la quantité d'acide pyruvique capable de se décomposer spontanément. Les échantillons ensemencés contiennent respectivement 30. 50. 70. 90. 220 et 385 mg par litre d'acide pyruvique. Dès l'ensemencement, le dosage est effectué tous les jours et l'évolution de l'acide pyruvique en fonction du temps est représenté par la figure 12.

2. **Résultats**

La disparition de l'acide pyruvique est très rapide : les échantillons 2, 3 et 4 contenant au départ respectivement 50, 70 et 90 mg par litre d'acide pyruvique n'en contiennent déjà plus après deux jours d'incubation en présence de bactéries et 220 mg par litre sont utilisés en 3 jours.

Les quantités décomposées par jour sont d'autant plus importantes que le milieu était plus riche au départ. Dans l'échantillon qui contenait 385 mg par litre la dégradation est cependant un peu plus lente mais cette concentration vraiment très forte peut freiner l'activité bactérienne. Notons que sept jours suffisent pour que cette quantité disparaisse.

C) RAPPORT ENTRE LA CROISSANCE BACTERIENNE ET L'UTILISATION DE L'ACIDE PYRUVIQUE

Les conditions expérimentales sont exactement les mêmes que précédemment.

Afin de discerner le début de la croissance bactérienne nous réglons le zéro du néphélomètre avec le moût juste après l'ensemencement par les bactéries; ainsi l'apparition d'un trouble même très faible sera la preuve de la multiplication bactérienne. Dès que le trouble du milieu s'accentue nous opérons les mesures suivant la méthode exposée au chapitre II pour déterminer le poids sec de bactéries présentes dans le milieu.

Les résultats sont exposés dans le tableau IV; il est évident que les milieux ensemencés pour lesquels nous indiquons un poids sec de bactéries égal à zéro contiennent cependant les bactéries apportées par l'ensemencement (un volume de culture bactérienne égal à 0,3 % du volume du milieu) mais que celles-ci ne se sont pas multipliées. L'examen des résultats montre que pour chaque échantillon la multiplication bactérienne ne commence que si le milieu ne contient plus d'acide pyruvique. La multiplication des bactéries commence plus tôt dans les échantillons contenant 50, 70 et 90 mg par litre d'acide pyruvique que dans les autres;

il faut attendre le cinquième jour pour observer un trouble dans l'échantillon contenant au départ 220 mg par litre et six jours pour l'échantillon contenant au départ 385 mg par litre d'acide pyruvique.

TABLEAU IV

Relation entre l'utilisation de l'acide pyruvique par les bactéries lactiques et leur croissance

Teneur initiale du milieu en acide pyruvique		30*	50	70	91	220	385
après 24 heures	acide pyruvique résiduel	23	37	48	64	165	270
	poids sec de bactéries	0	0	0	0	0	0
après 48 heures	acide pyruvique résiduel	10	4	4	2	47	224
	poids sec de bactéries	0	0,016	0,032	0,055	0	0
après 72 heures	acide pyruvique résiduel	0	0	0	0	0	46
	poids sec de bactéries	0,145	0,160	0,160	0,202	0,095	0
après 6 jours	poids sec de bactéries	0,200	0,245	0,235	0,235	0,142	0
après 7 jours	poids sec de bactéries	0,230	0,245	0,245	0,245	0,215	0,029

Les résultats sont exprimés en mg. par litre pour l'acide pyruvique et en g par litre pour les poids secs des bactéries.

* Teneur initiale du moût sans addition.

D) UTILISATION BACTERIENNE DE L'ACIDE PYRUVIQUE NATURELLEMENT EMIS PAR LES LEVURES

1. Conditions expérimentales

Nous ne pouvons observer cette évolution que par référence à un témoin où la fermentation alcoolique se produit sous l'influence des

TABLEAU V

Evolution de l'acide pyruvique et de l'éthanal libres au cours de la fermentation alcoolique en présence de Lactobacillus hilgardii

Durée de la fermentation (jours)	Témoin			Ensemencement simultané			Ensemencement bactérien antérieur		
	Alcool	Acide pyruvique	Ethanal	Alcool	Acide pyruvique	Ethanal	Alcool	Acide pyruvique	Ethanal
2	2.4	231	36	2.2	35	0	1.2	44	25
3	5.4	253	59	5.3	traces	16	3.1	—	47
4	9.3	286	40	7.3	0	12	5.5	51	34
5	10.7	293	38	—	traces	12	8.7	28	30
7	—	177	—	9.3	0	—	—	25	—
8	10.7	118	32	9.3	0	12	8.7	0	20

Les résultats sont exprimés : en degrés pour l'alcool éthylique
en mg. par litre pour les autres substances

levures seules. Ce témoin renseigne sur les quantités maximum d'acide pyruvique pouvant être émis; il n'est pas certain en effet que les levures produisent autant d'acide pyruvique en présence de bactéries puisque nous savons qu'elles sont moins nombreuses.

Deux cas seulement de culture mixte sont rapportés ici : celui où l'ensemencement est simultané (ES) et celui d'un ensemencement bactérien antérieur au levurage (EA). Le pH est égal à 4,0.

2. **Résultats**

Les résultats des dosages d'alcool, d'acide pyruvique et d'éthanal sont rassemblés dans le tableau V. La fermentation alcoolique pure (témoin) produit une élévation continue de la teneur en acide pyruvique durant les cinq premiers jours, jusqu'à un maximum voisin de 300 mg par litre. Cette teneur diminue ensuite mais l'échantillon conserve le huitième jour 120 mg par litre d'acide pyruvique libre. En culture mixte avec ensemencement simultané le milieu ne contient jamais d'acide pyruvique libre et relativement peu dans le cas d'ensemencement bactérien antérieur au levurage. La même constatation a été faite par PEYNAUD et LAFON-LAFOURCADE (1966). Le cas de culture mixte avec ensemencement simultané est tout à fait remarquable car les dosages d'alcool montrent qu'il n'y a pas d'inhibition des levures pendant les trois premiers jours; les levures libèrent donc là autant d'acide pyruvique que dans le témoin. Cet acide pyruvique est totalement utilisé par les bactéries.

3. **Conclusion**

Les faibles teneurs ou l'absence d'acide pyruvique au cours de fermentations alcooliques qui se déroulent en présence de bactéries sont normales puisque celles-ci possèdent les déshydrogénases lactiques leur permettant de transformer l'acide pyruvique en acide lactique. Nous avons expérimentalement démontré que les quantités d'acide pyruvique pouvant ainsi être transformées sont importantes.

L'influence négative de l'acide pyruvique sur la croissance bactérienne est remarquable; l'activation des bactéries par la présence de levures n'est donc pas due à ce corps. L'acide pyruvique prolonge la phase de latence de la croissance bactérienne et ceci explique les faibles nombres de bactéries que nous avons remarqué (chapitre V) dans les cultures mixtes avec ensemencement simultané.

II. ETUDE DU COMPORTEMENT DES BACTERIES LACTIQUES VIS-A-VIS DE L'ETHANAL

A) ESSAI D'ADDITION D'ETHANAL

L'éthanal est extrêmement vite utilisé par les bactéries; on ne retrouve plus d'éthanal après 24 heures d'incubation bactérienne dans les échantillons qui en contenaient 20 et 40 mg par litre, 60 et 100 mg par litre sont transformés en 48 heures et 200 mg par litre en trois jours d'incubation.

B) INFLUENCE DE L'ETHANAL SUR LA CROISSANCE BACTERIENNE

Les mesures néphélométriques effectuées chaque jour dans tous les milieux ont donné exactement les mêmes résultats; l'éthanal n'a aucune influence ni pour favoriser la croissance bactérienne ni pour la déprimer.

C) EVOLUTION DANS LES CULTURES MIXTES DE L'ETHANAL FORME PAR LES LEVURES

1. **Conditions expérimentales**

Dans les conditions habituelles de pH (3,6 et 4,0), nous comparons les doses d'éthanal libre dans un témoin où la fermentation alcoolique se déroule sous la seule influence des levures et dans des cultures mixtes avec ensemencement bactérien.

2. **Résultats**

Les résultats des dosages d'alcool et d'éthanal sont rassemblés dans le tableau VI; on remarque en premier lieu que la concentration finale du milieu fermenté obtenu en présence de bactéries est dans tous les cas inférieure à celle que l'on observe dans les témoins.

Au cours de la fermentation alcoolique ,la teneur en éthanal augmente dans les témoins jusqu'au troisième jour, puis elle diminue lentement pour se stabiliser, en fin de fermentation autour de 25 mg par litre à pH 3,6 et de 30 mg par litre à pH 4,0.

Quand le milieu contient des bactéries introduites avant les levures (EA_4) on observe très peu d'éthanal libre à pH 3,6; le maximum se situe tout de même le 3^e jour de la fermentation; il est inférieur au quart de la concentration maxima observée le même jour dans le témoin. Mais on observe en même temps dans ce cas une très grande perturbation de la fermentation alcoolique, de sorte qu'il n'est pas possible de connaître

TABLEAU VI

Influence de la présence de bactéries lactiques sur l'éthanal libéré par les levures en fermentation

	Durée de la fermentation (jours) / Conditions		2	3	4	5	8
pH 3,6	Témoin	Ethanal	51	80	46	25	25
		Alcool	2°8	3°7	6°	7°7	9°
	EA 4	Ethanal	6	18		12	8
		Alcool	0°3			5°2	5°8
	EP 2	Ethanal	50	54		17	16
		Alcool	2°8	3°5		4°6	7°7
pH 4,0	Témoin	Ethanal	36	59	40	38	32
		Alcool	2°4	5°4	9°3		10°7
	EA 2	Ethanal		47	34	30	20
		Alcool	1°2	3°1	5°5		8°7
	ES	Ethanal	0	16	12	12	12
		Alcool	2°2	5°3	7°3		9°3

Les résultats sont exprimés en degrés pour l'alcool éthylique, en mg. par litre pour l'éthanal.

Témoin : Les levures sont seules dans le milieu

EA x : Culture mixte avec ensemencement bactérien antérieur de x jours au levurage

ES : Culture mixte avec ensemencement simultané

EP x : Culture mixte avec ensemencement bactérien postérieur au levurage

dans le détail les quantités d'éthanal émises dans le milieu par les levures.

A pH 4,0, l'inhibition des levures est dans cette expérience moins forte; le milieu contient plus d'éthanal que précédemment, mais toujours moins que le témoin.

Lorsque les bactéries sont introduites en même temps que les levures (ES) il n'y a pas d'éthanal libre après deux jours de fermentation alors que le témoin en contient 36 mg/l. Cet exemple est particulièrement remarquable parce que, à ce stade l'inhibition de la fermentation alcoolique est infime.

Enfin si l'ensemencement bactérien se produit après le levurage, l'effet est immédiat; la teneur en éthanal passe de 50 mg à 24 mg par litre en 24 heures. Elle continue à décroître par la suite.

III. CONCLUSION

Grâce à leur système enzymatique les bactéries lactiques détiennent la possibilité de transformer les produits intermédiaires de la fermentation alcoolique et donc de les éliminer du milieu de façon continue, au fur-et-à-mesure de leur formation par les levures. Ces produits étant des activateurs de la fermentation alcoolique il est certain que leur disparition représente un facteur inhibiteur. Mais il n'y a pas d'inhibition indirecte par accroissement du nombre de bactéries car l'éthanal est sans influence sur la croissance bactérienne et l'acide pyurique empêche la multiplication des bactéries.

CHAPITRE VI

INHIBITION DES LEVURES PAR EMISSION BACTERIENNE D'UNE SUBSTANCE ANTAGONISTE

Malgré l'importance de la compétition pour divers substrats, il est impossible de conclure sans rechercher la preuve d'une inhibition de type chimique, c'est-à-dire provoquée par l'émission de la part des bactéries d'une substance toxique pour les levures. La production de telles substances par les bactéries est décrite souvent ; WAKSMAN (1948) rapporte l'exemple de **Bacillus antracis** inhibant **Saccharomyces cerevisiae.** Ceci est également démontré par KOPACZEWSKI (1931). Certaines levures sont inhibées par la streptothricine (WOODRUFF, 1943). Plus récemment, KODAMA (1952) parvient à extraitre de **Lactobacillus plantarum** une substance antibiotique qu'il nomme « Lactolin ».

Si de telles substances existent et sont émises dans le cas qui nous intéresse ici nous devons pouvoir mettre l'effet inhibiteur en évidence, en l'absence des cellules du microorganisme responsable de leur formation.

I. MISE EN EVIDENCE

A) ETUDE EN MILIEU LIQUIDE

Nous démontrons que les milieux de culture bactérienne, débarrassés de leurs germes par la chaleur ou par ultrafiltration, conservent cependant la faculté d'inhiber le développement des levures.

Mais l'action inhibitrice est faible; on ne la constate que si les bactéries se sont bien développées dans le milieu.

B) RECHERCHE DE L'ACTION INHIBITRICE DES BACTERIES SUR MILIEU SOLIDE

Les méthodes de recherche sont exposées au chapitre II. Nous présentons ici tous les résultats obtenus.

En traçant les stries radiantes alternées nous n'observons aucune zone d'inhibition; il se peut que la substance émise par les cultures de bactéries soit incapable de diffuser à distance dans la gélose; de plus les levures se développent plus vite que les bactéries. De même une croix de bactéries tracée sur un milieu solide inoculé par des levures, ne provoque autour d'elle aucune zone d'inhibition des levures.

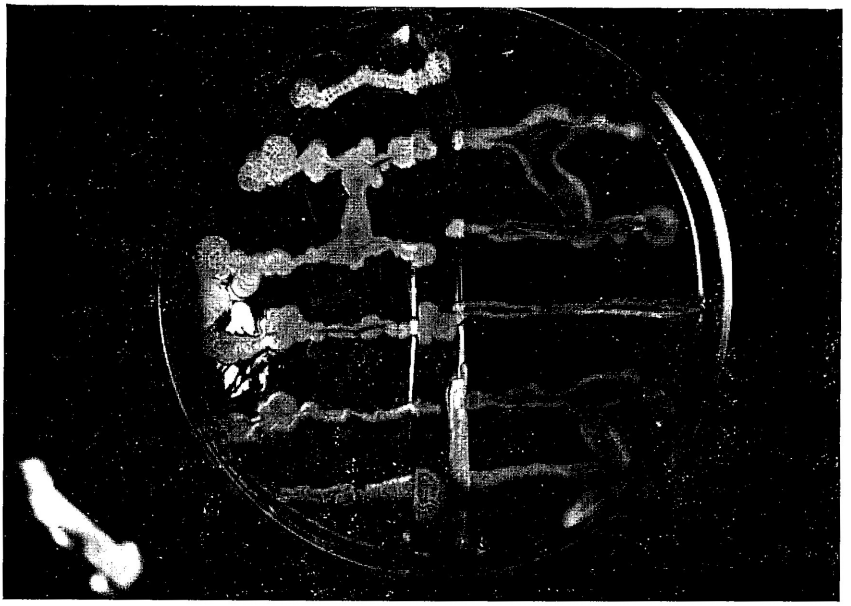


Fig. 13 - Demi-boîtes de FROST (à gauche les stries de levures sont faites sur préculture bactérienne)



A B

Fig. 14 - Ensemencement par points du moût gélosé stérile (A) et du même moût avec précu.ture bactérienne (B).

Par la méthode des deux boîtes de FROST nous obtenons de bien meilleurs résultats, en faisant les stries du 1er au 6e jour d'incubation bactérienne. Si les stries sont faites avant toute incubation de la culture bactérienne il n'y a pas de différences entre elles quand elles apparaissent. Si les stries sont faites après 24 heures et 48 heures d'incubation de la culture bactérienne ou de préculture bactérienne (la demi-boîte correspondant à la culture bactérienne est déjà trouble) on peut observer d'excellents résultats; du côté non ensemencé les stries sont remplacées en 48 heures par une large bande de levures épaisse et brillante, alors que sur la demi-boîte de préculture bactérienne les stries sont à peine décelables et parfois pas du tout. Après 3 et 4 jours d'incubation il est fréquent d'observer le long de ces stries le développement des levures sous forme d'une sorte de pointillé. Cette observation a été faite sur une série de 18 boîtes de Pétri, par la suite malgré nos efforts nous n'avons pu reproduire le phénomène.

Par contre, dans tous nos essais nous constatons toujours le phénomène suivant : quand on fait des stries, avec des levures, sur deux demi-boîtes dont une moitié est ensemencée par des bactéries et l'autre pas, quel que soit l'âge de la culture bactérienne (inférieur à 5 jours) au moment où on fait la strie, si les stries se chargent de levures, l'aspect du trait de levures au-dessus de la zone bactérienne est très différent de ce qu'il est dans la zone non ensemencée par les bactéries. En effet, ce trait qui apparaît dès 24 heures d'incubation se plisse considérablement à la 48e heure et reste très plissé comme on peut s'en rendre compte sur la figure 13. Ces essais ont été effectués avec 64 boîtes de Pétri.

Cet aspect des colonies de levures se retrouve lorsqu'on ensemence par points sur une préculture bactérienne. Les deux boîtes A et B représentées figure 14 sont deux boîtes contenant le même milieu; la boîte B contient une préculture bactérienne âgée de 24 heures au moment où ont été réalisés les apports de levures. La boîte A contient le moût gélosé stérile au moment de l'apport des levures. Ces boîtes sont placées à l'étuve en même temps; l'aspect représenté par la figure 14 est celui que l'on observe après 4 jours d'incubation. En A, les levures se sont multipliées en colonies épaisses, lisses et brillantes alors qu'en B on observe autour de chaque point d'ensemencement une zone plate, très mince, d'apparence sèche et plissée sur le fond opaque correspondant au développement des bactéries. Cet essai reconduit dans 24 boîtes B et 2 témoins A a toujours donné ce résultat.

Les ensemencements mixtes, avec nombre faible de bactéries que nous avons réalisés n'ont jamais donné de résultats assez nets pour les exposer.

C) CONCLUSION

Les différents tests positifs sont en faveur de l'émission, de la part des bactéries, d'une substance capable de gêner le développement des levures.

Les échecs qui ont eu lieu et l'impossibilité de reproduire le phénomène d'inhibition totale observé une première fois en milieu solide mettent en relief la nécessité à peu près certaine de conditions optimales, que nous n'avons pas saisies mais qu'il est indispensable de réunir pour observer l'inhibition des levures.

L'antagonisme est donc en partie dû à l'émission par les bactéries d'une substance fongistatique qui diffuse peu ou pas dans la gélose, qui n'est pas thermolabile. Nous n'avons pas cherché à isoler ce corps des cultures mixtes car il paraît y être émis en très faible quantité.

Notre étude est dirigée vers le test de l'influence sur les levures d'un corps mis en évidence sur les chromatogrammes des acides aminés des milieux ayant contenu des bactéries lactiques.

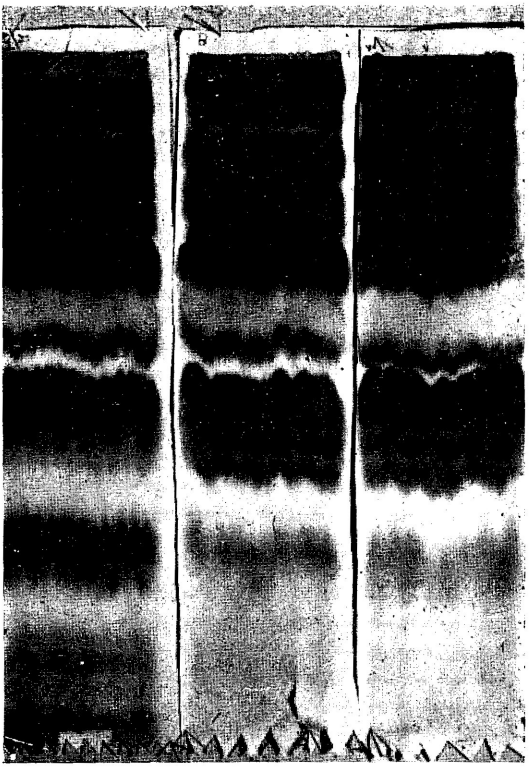
II. ETUDE DE L'INFLUENCE SUR **SACCHAROMYCES ELLIPSOIDEUS** DU COMPOSE X REVELE SUR LES CHROMATOGRAMMES D'ACIDES AMINES

A) IDENTIFICATION DE CE CORPS A LA L-ORNITHINE

Pour être entraîné lors de l'élution des acides aminés et révélé par la ninhydrine ce corps ne peut-être qu'un acide aminé ou un très petit peptide.

1. **Isolement et concentration**

Nous avons réussi à en isoler des quantités assez importantes, grâce à la chromatographie des extraits de culture de bactéries ou de cultures mixtes. Cette chromatographie est conduite dans une seule dimension avec le mélange butanol-acide acétique-eau. On obtient une excellente séparation des acides aminés en 16 heures de chromatographie, la proline est alors entraînée jusqu'à 16 cm.



A B C

Fig. 15 - Chromatogrammes monodimentionnels des aminoacides
A : moût de base
B : produit fermenté par les bactéries
C : produit fermenté par les levures et les bactéries.

La chromatographie du moût témoin, présente à partir de la ligne de base, comme on peut s'en rendre compte sur la figure 15, une zone très claire qui ne correspond à aucun corps; puis une bande bleue pâle suivie d'une bande beige qui sont respectivement l'acide aspartique et la sérine.

La chromatographie de l'échantillon ayant contenu des bactéries présente par contre dès la ligne de base une bande bleue-violet de couleur très intense qui est la substance X. Ce corps masque l'acide aspartique et la bande suivante est la sérine. Cette bande occupe une largeur de 3 cm. Si l'on augmente le temps de la chromatographie on peut obtenir l'étalement de cette substance sur une largeur de 6 cm.

On procède ensuite à l'élution de cette substance par l'ammoniaque 2 N, à partir de chromatogrammes non révélés.

2. **Seconde chromatographie**

Cet éluat est de nouveau chromatographié. Les chromatogrammes réalisés avec le mélange phénol-eau comme solvant présentent après révélation à la ninhydrine, trois taches bien nettes, une première bleue, puis une rosée (2), puis une violette (3) ou rose-violet. Le corps le plus abondant est le n° 3. Avec le butanol acétique on ne remarque plus que deux taches.

3. **Mesures des Rf**

La détermination des Rf pour chacune de ces taches a été faite. Nous avons trouvé un Rf_1 de 34/286 = 0,11 pour la tache bleue un Rf_2 de 57/286 = 0,20 pour la tache rose et enfin un Rf_3 de 166/286 = 0,40 pour la tache rose-violet, quand le solvant de chromatographie est le mélange phénol-eau.

4. **Comparaison avec des solutions témoins**

A l'aide des Rf nous comparons à la substance inconnue l'urée, l'arginine et l'ornithine. On dépose 5 et 10 mm^3 de chaque solution sous forme de tache et sur la même ligne de base, 25 mm^3 de la solution inconnue. Sur les chromatogrammes obtenus avec le mélange butanol-acide acétique-eau, la susbtance à tester ne donne qu'une seule tache, au même niveau et absolument idendique à celle du témoin L-ornithine. Avec le butanol-formique comme solvant et 30 heures de chromatographie on obtient encore une tache au même niveau que le témoin ornithine et une autre tache que nous n'avons pu identifier. Quand on emploie le mélange phénol-eau comme solvant on observe que le témoin L-ornithine se révèle sous forme de deux taches distinctes, rose-mauve. La première de Rf égal à 0,20 est beaucoup plus intense que l'autre dont le Rf est égal à 0,40. Le chromatogramme de l'éluat présente les deux mêmes taches que le témoin L-ornithine, mais la tache supérieure est plus violette et plus intense que l'autre.

Nous avons conclu de ces essais que la substance X était la L-ornithine.

B) ACTION DE L'ORNITHINE SUR LA FERMENTATION DE **SACCHAROMYCES ELLIPSOIDEUS** 19e$_1$

Dans un premier temps nous avons essayé l'action de doses assez considérables d'ornithine, en apportant au moût 500 mg par litre de L-ornithine d'une part et 1 g par litre d'autre part. Ceci nous a permis de mettre en évidence l'effet inhibiteur de l'ornithine. Puis nous avons essayé des concentrations moins fortes allant de 25 à 500 mg par litre.

TABLEAU VII

Influence de l'ornithine sur la fermentation alcoolique par Saccharomyces ellipsoideus 19e$_1$

Ornithine ajoutée mg/l	Après 2 jours		3 jours		4 jours	6 jours	8 jours	10 jours		12 jours	
	Alcool formé	Perte de poids	Alcool formé	Perte de poids	Perte de poids	Alcool formé	Perte de poids	Alcool formé	Perte de poids	Alcool formé	Perte de poids
0	3°4	0,3	4°6	22,6	41,1	11°2	70,0	11°7	77,0	11°7	91,6
25	2°4	0,2	3°5	18,3	34,8	9°8	65,0	11°3	74,0	11°3	82,3
50	2°4	0,2	4°0	18,1	34,1	9°8	60,1	11°4	68,3	11°4	75,6
200	2°4	0,2	3°5	17,4	31,8	9°4	57,1	11°2	63,6	11°2	66,6
500	2°3	0,2	3°5	16,6	31,0	9°2	61,0	11°5	69,7	11°3	76,3

Les résultats sont exprimés en degrés pour l'alcool formé et en g par litre pour la perte de poids.

Les résultats expérimentaux figurent dans le tableau VII. On y trouve à la fois les degrés alcooliques et les pertes de poids en g par litre, car l'observation est faite simultanément sur une série d'erlenmeyers bouchés par des barboteurs et une série de flacons bouchés par des tubes effilés.

Après deux jours de fermentation alcoolique en présence de 25 mg par litre d'ornithine, le milieu présente un écart de 1° avec le témoin. Cette différence se maintient et s'accentue jusqu'au 6^e jour de la fermentation alcoolique. Du 6^e au 10^e jour le degré alcoolique de l'échantillon additionné d'ornithine se rapproche de celui du témoin pour ne plus

présenter le 12e jour que 0°4 d'écart avec celui-ci. Les mêmes constatations se rapportent aux échantillons additionnés de 50 à 500 mg d'ornithine par litre.

L'action de l'ornithine se situe dons les premiers jours de la fermentation alcoolique; 25 mg par litre de L-ornithine sont suffisants pour provoquer un important retard.

C) HYPOTHESES EMISES SUR LE MODE D'ACTION ET L'ORIGINE DE L'ORNITHINE

1. **Mode d'action**

Nous ne savons pas si l'ornithine agit sur le nombre de levures. Ce corps peut aussi agir sur le métabolisme et en particulier sur l'absorption des acides aminés. Il existe des rapports étroits entre la perméabilité cellulaire des levures du genre **Saccharomyces** à l'azote aminé et la composition qualitative et quantitative du milieu en acides aminés. Un acide aminé peut se montrer inhibiteur de la pénétration d'un autre. SURDIN **et al.** (1964) démontrent ainsi que l'accumulation de L--méthionine est inhibée par l'arginine, l'histidine, le tryptophane, et l'ornithine. HALVORSON et COHEN (1958) observent l'inhibition de l'accumulation de la phénylalanine par d'autres aminoacides. Enfin GRENSON (1967) provoque l'inhibition de la vitesse initiale d'entrée de la L-arginine par différents acides aminés dont en particulier la L-ornithine qui provoque 25 % d'inhibition.

Il est possible qu'un phénomène analogue se produise pour **Saccharomyces ellipsoideus** $19e_1$. L'enrichissement accidentel (dû à la présence de bactéries dans le milieu ou dû à un apport expérimental) en ornithine peut être nuisible à la nutrition azotée de la levure en en conséquence à la fermentation alcoolique puisque l'intensité fermentaire des levures est d'autant plus forte qu'elles sont plus riches en azote.

2. **Origine de l'ornithine**

Le moût de base de nos essais ne contient pas d'ornithine. Nous avons recherché sa présence dans des jus de pressurage de raisins de cépages connus. Les raisins sont choisis sains et mûrs. Ils proviennent des vendanges de l'année 1966. Les cépages rouges étudiés sont le Malbec, le Merlot et le Cabernet et les cépages blancs, le Sauvignon la Muscadelle et le Sémillon. Ces jus ne contiennent pas d'ornithine. Après stérilisation de ces moûts, ensemencement par **Saccharomyces ellipsoideus** $19e_1$ et fermentation 15 jours à 25 °C les six vins obtenus étaient également dépourvus d'ornithine.

L'ornithine peut être le produit de l'hydrolyse de l'arginine du moût par les bactéries lactiques. Elle peut aussi provenir des cellules bactériennes elles-mêmes; les travaux de WORK (1964), de PERKINS et CUMMINS (1957) et de CUMMINS (1965) mettent en évidence la présence d'ornithine dans les parois cellulaires de certaines bactéries Gram + dont un lactobacille. Enfin PLAPP et KANDLER (1967) identifient la L-ornithine dans la paroi cellulaire de **Lactobacillus cellobiosus.**

La bibliographie enseigne une autre source possible d'ornithine. En 1967, KINOSHITA **et al.** démontrent la possibilité d'accumulation d'acide glutamique et de L-ornithine à partir d'hydrate de carbone et d'ammoniac comme sources par **Micrococcus glutamicus.**

III. ETUDE DE L'INFLUENCE DE L'ORNITHINE SUR D'AUTRES SOUCHES DE LEVURES

La sensibilité des souches est recherchée en présence de 25 mg par litre de L-ornithine. Les résultats sont rassemblés dans le tableau VIII.

A) LEVURES DU GENRE **SACCHAROMYCES**

1. Levures de l'espèce ellipsoideus

Saccharomyces ellipsoideus 88e
Saccharomyces ellipsoideus 31e
Saccharomyces ellipsoideus $13e_1$
Saccharomyces ellipsoideus TM 912e
Saccharomyces ellipsoideus T 40e

Toutes ces variétés sont sensibles à l'ornithine, la variété 31e semblant la plus sensible.

2. Autres espèces de **Saccharomyces**

Parmi les sept autres espèces que nous avons testées, **Saccharomyces carlsbergensis** et **Saccharomyces elegans** sont inhibées par l'ornithine.

B) INFLUENCE DE L'ORNITHINE SUR LES LEVURES APPARTENANT A D'AUTRES GENRES

Parmi les levures sporogènes, nous étudions les genres : **Torulaspora, Hansenula, Debaryomyces** et **Schizosaccharomyces.**

Parmi les levures asporogènes, le genre **Kloeckera.**

TABLEAU VIII

Influence de la L-ornithine sur la fermentation de certaines souches de levures

Perte de poids pour 100 cm³ / Souches sensibles à l'ornithine	+ 2 jours	+ 3 jours	+ 6 jours	+ 7 jours	+ 9 jours	+ 10 jours	+ 11 jours	+ 13 jours	+ 20 jours
Saccharomyces ellipsoideus									
31 e	0,71		1,24	1,50		1,24		0,70	0,45
19 e_1	0,04	0,42		1,07		1,00	0.59	0,07	0,29
13 e_1				0,22		0,42		1,39	2,22
TM 912 e		0,33	1,07	0,90		0,28			0,28
T 40 e	0.2	0,41	0,13	0,51		0,45			0,1
Saccharomyces carlsbergensis	0,03	0,42	0,14	0,26		0,48		0,54	0,53
Saccharomyces elegans		0,03	0,02	0,08	0,14		0,32	0,32	0,20
Hansenula anomala	0,01		0,12		0,20			0,48	

Les chiffres représentent la valeur de la différence entre la perte de poids (en g pour 100 cm³) du témoin et de l'échantillon additionné d'ornithine.

La fermentation alcoolique est nettement inhibée pour **Hansenula anomala.**

Pour **Debaryomyces hansenii** qui est une levure en voile la pesée ne pouvait donner aucun résultat valable mais, alors que dans le témoin le voile se forme très vite et devient de plus en plus épais et de plus en plus plissé, en présence d'ornithine il reste peu important et mince, beaucoup de levures tombant au fond du flacon. Nous n'avons constaté aucune influence de l'ornithine sur les levures des genres **Schizosaccharomyces** et **Kloeckera.**

IV. CONCLUSION.

Nous sommes expérimentalement parvenu à la conviction qu'un ensemble de substances inhibitrices des levures est émis par les bactéries dans certains cas de culture mixte.

Nous avons par ailleurs constaté l'accumulation d'un composé inconnu réactif à la ninhydrine dans tous les milieux où se sont dévelóppées des bactéries lactiques.

Grâce à une succession de chromatographies sur papier et d'élutions nous avons réalisé l'extraction de ce corps des milieux et nous l'avons identifié à l'ornithine.

L'ornithine se révèle inhibiteur de la fermentation alcoolique par **Saccharomyces ellipsoideus** 19e $_1$; il est donc certain que les bactéries lactiques réalisent l'inhibition des levures par l'émission d'ornithine.

Ce corps est également capable de freiner la fermentation alcoolique d'autres souches de levures mais, parmi les genres testés, le genre **Saccharomyces** est particulièrement sensible à cette inhibition. Parmi les autres souches de levures certaines sont inhibées et d'autres ne le sont pas.

CONCLUSION

Les faits observés montrent que les bactéries lactiques exercent une action inhibitrice sur les levures **Saccharomyces** chaque fois qu'elles parviennent à se multiplier dans le milieu de fermentation.

Les conditions de l'inhibition sont étroites car les bactéries ont des difficulttés à se développer dans le moût dont le pH est bas.

L'inhibition dure peu; très nette au début de la fermentation alcoolique elle s'atténue au fur et à mesure que les levures produisent de l'alcool ce corps gênant à son tour la croissance bactérienne.

Les mécanismes de l'inhibition des levures par les bactéries lactiques sont très divers; ce phénomène est produit à la fois :

— par la compétition pour les principes alimentaires, particulièrement les sucres fermentescibles et les aminoacides.

— par l'élimination par les bactéries de l'acide pyruvique, de l'éthanal et de certains aminoacides, donc d'activeurs de la fermentation alcoolique,

— enfin, par émission bactérienne dans le milieu de culture de substances antagonistes des levures, tout particulièrement la L-ornithine capable de freiner la fermentation alcoolique.

BIBLIOGRAPHIE

BLOUIN J. et PEYNAUD E. — 1963, Présence constante des acides pyruvique et α-cétoglutarique dans les moûts de raisins et les vins. **C.R. Acad. Sci., 256,** 4521.

BLOUIN J. — 1964, Application des méthodes analytiques optiques au dosage de certains constituants des boissons. **Chimie Analytique, 10,** 513.

CLIFTON C.E. — 1950, **Introduction to the Bacteria. Mc. Graw. Hill Book Company Inc.,** p. 243.

COLAGRANDE O. et AMBROGGI C. — 1958, Evoluzione degli amino-acidi durante la fermentazione alcoolica dei mosti di uva. **Ann. del Facolta di Agraria, 7,** fasc. II.

CUMMINS C.S. — 1965, Ornithine in mucopeptide of Gram-positive cell walls. **Nature G. B.** 206.

FORNACHON J.C.M. — 1963, Travaux récents sur la fermentation malolactique. **Symposium intern. Œnologie, Bordeaux.**

FROST W.D. — 1904, The antagonism exhibited by certain saprophytic bacteria against Bacillus typhosus Gaffky. **J. Infect. Dis., 1,** 559.

GARRE C. — 1887, Über Antagonisten unter den Bakterien. **Zentralblatt für Bakteriol., 2,** 312.

GAUTIER J.A. et BLANC-GUENEE J. — 1962, Recherches chromatographiques sur les acides aminés libres des vins naturels. **Chromatographie Symposium II,** p. 225.

GENEVOIS L. et RIBÉREAU-GAYON J. — 1936, **Ann. Ferment., I** 34.

GILLILAND R.B. et LACEY J.P. — 1966, An acetobacter lethal to yeasts in bottled beer. **J. Inst. Brew., 72,** 291.

GRENSON M. — 1967, Le transport des métabolites — en particulier des acides aminés — à travers les membranes cellulaires. **Rev. Ferm. Ind. alim. 22,** 7.

GROSSOWICS N., KAPLAN D. et SCHEERSON S. — 1947, Production of an antibiotic substance by a Lactobacillus. **Rept. Proc. Intern. Congr. Microbiol. Copenhage, 4th,** 137.

HALVORSON O. et COHEN N. — 1958, Incorporation des aminoacides endogènes et exogènes dans les protéines de levures. **Ann. Inst. Pasteur, 95,** 73.

JONES M. et PIERCE J.S. — 1964, Absorption of amino acids from wort by yeasts. **J. Inst. Brew., 70,** 308.

KINOSHITA S., UDAKA S. et SHIMONO M. — 1957, Studies on the amino-acid fermentation. Part I : Production of L-glutamic acid by various microorganisms. **J. Gen. Appl. Microbiol., 3,** 193.

KINOSHITA S., NAKAYAMA K. et UDAKA S. — 1967, Part. 2 : Production of L-ornithine by fermentation. **J. Gen. Appli. Microbiol. 3,** 276.

KODAMA R. — 1952, Studies of lactic acid bacteria. II : Lactolin a new antibiotic substance produced by lactic acid bacteria. **J. Antibiotics, 5,** 72.

KONDO G.F. et FADENKO P.S. — 1964, Rôle des bactéries malolactiques lors de la fabrication du Xérès (en russe). **Vinod. vinogr. U.R.S.S. 2,** 26.

KOPACZEWSKI W. — 1931, Composition physicochimique de la cellule microbienne. **Arch. microb. 2,** 187.

LAFON M. — 1954, Contribution à l'étude de la formation des produits secondaires de la fermentation alcoolique. **C.R. Acad. Sci, 238,** 847.

LAFON-LAFOURCADE S. et PEYNAUD E. — 1966, Sur les taux des acides cétoniques formés au cours de la fermentation alcoolique. **Ann. Inst. Pasteur, 110,** 766

LAMBIN S. et GERMAN A. — 1961, **Précis de microbiologie, Masson ed., Paris, p. 376.**

MONOD J. — 1942, Recherches sur la croissance des cultures bactériennes. **Thèse Doct. ès-Sciences, Paris.**

MULLER-THURGAU H. et OSTERWALDER A. — 1913, **Die Bakterien im Wein und Obstwein, Fischer.**

PASTEUR L. — 1873, **Etudes sur le vin, 2e éd.,** Libr. Savy, Paris.

PERKINS H.R. et CUMMINS C.S. — 1964, **Nature G.B., 201,** 1105.

PEYNAUD E. — 1939, L'azote aminé et l'azote amidé dans les vins de Bordeaux. **Ann. Falsif. Fraudes, 366.**

PEYNAUD E. et GUIMBERTEAU G. — 1967, Vinification continue. Mise au point œnologique. **Conn. Vigne Vin, 3,** 128.

PLAPP R. et KANDLER O. — 1967, Identification of L-ornithine and δ amino-succinyl ornithine in cell-wall hydrolysates of **Lactobacillus cellobiosus. Nature G.B., 213,** 803.

RIBÉREAU-GAYON J. et PEYNAUD E. — 1947, Sur le dosage et la chimie de l'éthanal et de ses combinaisons dans les vins et les alcools. **Ann. Inst. Pasteur, 73,** 777.

RIBÉREAU-GAYON J. et PEYNAUD E. — 1958, **Analyse et Contrôle des vins, 2e éd.,** Béranger, Paris.

SUDRAUD P. — 1963, Etude expérimentale de la vinification en rouge. **Thèse Docteur-Ingénieur, Bordeaux.**

SURDIN Y. **et al.** — 1964, Système d'accumulation des acides aminés chez **Saccharomyces cerevisiae** : propriétés et contrôle génétique. **C.R. Acad. Sci., 258,** 5046.

WAKSMAN S.A. — 1948, **Antagonismes microbiens et substances antibiotiques,** Sedes éd., Paris.

WEISS H., ROUSSET A., MAILLARD M.T. et BONNET R. — 1960, L'évolution qualitative et semi-quantitative des acides aminés au cours de la fermentation des moûts de raisins provenant des cépages d'Alsace. **C.R. Acad. Sci., 250,** 1322.

WORK E. — 1964, Amino-Acids of walls of **Micrococcus radiodurans. Nature G.B., 201,** 1107.

WOODRUFF H.B. et FOSTER J.W. — 1943, Microbiological aspects of streptothricin. **Arch. Biochem., 2,** 301.