

N° d'ordre :.....

## THESE

présentée

pour obtenir

**LE TITRE DE DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE**

École doctorale : Mécanique Energétique Génie Civil et Procédés

Spécialité : Génie des procédés et Environnement

Par Nancy NEHME

**Etude des interactions entre *Saccharomyces cerevisiae* et *Oenococcus oeni* :  
impact sur la réalisation de la fermentation malolactique en cultures  
séquentielles et mixtes.**

Soutenue le 25 Mars 2008 à 14 heures devant le jury composé de :

M.	Pierre STREHAIANO	Président
Mme	Patricia TAILLANDIER	Directeur de thèse
Mme	Florence MATHIEU	Codirecteur de thèse
Mme	Marielle BOUIX	Rapporteur
M.	Roger LTEIF	Rapporteur
Mme	Sibylle KRIEGER-WEBER	Membre



## Remerciements

*Je remercie Mesdames Marielle Bouix et Sibylle Krieger-Weber ainsi que Messieurs Roger Lteif et Pierre Strehaiano d'avoir accepté la charge de juger ce travail.*

*J'exprime toute ma reconnaissance à Madame Patricia Taillandier pour l'opportunité qu'elle m'a offerte et la confiance qu'elle m'a démontrée durant les années passées au sein du Laboratoire de Génie Chimique, ainsi que pour son soutien moral et sa disponibilité. Qu'elle veuille bien trouver ici le témoignage de ma respectueuse gratitude et de ma sincère amitié.*

*Je remercie très sincèrement Madame Florence Mathieu d'avoir accepté d'encadrer cette thèse. Sa disponibilité, son attention, ses conseils et ses encouragements m'ont été très précieux. Je lui exprime toute ma reconnaissance et mon amitié.*

*J'exprime ma respectueuse gratitude à Monsieur Pierre Strehaiano. Il s'est toujours intéressé à mes travaux qu'il a considérablement favorisés. Je le remercie de sa participation à ce jury.*

*Je remercie vivement Monsieur Roger Lteif pour l'enthousiasme qu'il m'a témoigné de participer à mon jury de thèse et pour s'être tout le temps intéressé à mon parcours scientifique.*

*Je remercie également Monsieur Jean-Pierre Monna et Madame Claire Albasi pour leur aide précieuse dans l'utilisation du bioréacteur à membrane. Leurs conseils scientifiques avisés et leur savoir-faire m'ont considérablement aidé.*

*Je n'oublierai jamais les bons moments passés au laboratoire en compagnie de tous mes collègues. Je pense particulièrement à Claire, Sandrine, Claudia, Dominique, Alain, Luis, Maria-Elena, Maha, Nicolas, Nelson, Alicia, Jesus, Micheline, Isariebel, Kathy, Amit, Rana, Huberson, Benjamin, Pascal, Romuald, Leonardo, Mallorie, Phong, Caroline et Hakima.*

*Je remercie infiniment la petite communauté libanaise de Toulouse qui a été une deuxième famille pour moi. Je remercie en particulier Dominique, Nicolas, Maha, Micheline, Youssef, Hikmat, Fady, Wissam et William pour leur amitié et pour toutes les chances qu'ils m'ont confiées. Elles m'ont permis d'apprécier les opportunités qui m'étaient offertes et de surmonter les moments moins faciles de la vie.*

*Enfin, pour Maman et Papa, pour Jad, Joëlle et Samer, pour tout votre amour, votre soutien et votre stimulante fierté. Les mots sont faibles pour exprimer la force de mes sentiments et la reconnaissance que je vous porte.*



## Résumé

Pour une bonne maîtrise de la fermentation malolactique (FML) en vinification, il est important d'étudier les différents types d'interactions pouvant exister entre les souches de *Saccharomyces cerevisiae* et d'*Oenococcus oeni*, d'identifier les phénomènes et les molécules qui en sont responsables et de définir la façon pertinente de gérer le procédé notamment pour l'inoculation de ces souches.

Dans ce travail, nous avons testé plusieurs couples levure-bactérie en appliquant deux stratégies d'inoculation différentes : cultures séquentielles et co-cultures, dans des milieux synthétiques liquides simulant les milieux naturels. Pour les cultures séquentielles, les bactéries lactiques ont étéensemencées à la fin de la fermentation alcoolique alors que pour les cultures mixtes les levures et les bactéries ont étéensemencées simultanément.

La réalisation des cultures séquentielles a permis de quantifier l'inhibition ou la stimulation de la FML en fonction des souches sélectionnées dans un couple.

Nous avons pu mettre en évidence que l'inhibition de la FML peut être en partie due à des peptides inhibiteurs, piste peu exploitée jusqu'à présent. La caractérisation partielle de deux peptides inhibiteurs synthétisés par deux souches de levure a pu être réalisée. Cet effet inhibiteur se rajoute à celui de certaines molécules inhibitrices déjà connues.

Comme alternative aux cultures séquentielles, des cultures mixtes de certains couples ont été réalisées dans un bioréacteur à membrane, outil d'étude dont l'avantage est de séparer physiquement les souches tout en permettant l'homogénéisation du milieu. Pour certains couples, la co-inoculation a pu améliorer le rendement de la FML sans risque de déviation.

Les résultats montrent que le choix du couple levure-bactérie est un critère très important dans la réussite de la FML. La réalisation de la co-culture peut être intéressante pour certains couples. En revanche une interaction positive a pu être observée pour d'autres couples dans le cas de cultures séquentielles. Cette stratégie classique peut alors être conservée.

**Mots clefs :** *Saccharomyces cerevisiae*, *Oenococcus oeni*, fermentation malolactique, cultures séquentielles, co-cultures, bioréacteur à membrane, molécules inhibitrices.

## Abstract

A good control of malolactic fermentation (MLF) during vinification, implies first to study the different kinds of interactions which may occur between *Saccharomyces cerevisiae* and *Oenococcus oeni* strains, second to identify the molecules responsible of these interactions and third to define the pertinent way of running the process notably in what concerns the inoculation of these strains.

In this work, we have tested several yeast-bacteria couples by applying two different inoculation strategies: the sequential fermentation and the co-culture, using synthetic liquid media which composition simulates natural ones. While during the sequential fermentations, the lactic acid bacteria were inoculated at the end of the alcoholic fermentation; both yeasts and bacteria were inoculated simultaneously during the co-culture.

The sequential fermentations allowed us to quantify the inhibition or stimulation of the MLF depending on the choice of the strains within a couple.

We have also showed that the inhibition of MLF can be partially due to inhibitory peptides in addition to some classical inhibitory molecules already described. The partial characterization of two inhibitory peptides synthesized by two yeast strains was carried out in this work. This factor has not been intensively investigated till now.

As an alternative for sequential fermentations, co-cultures of certain couples were carried out in a membrane bioreactor which advantage was to keep the strains physically separated while the medium was homogenous. For certain couples, the co-culture strategy improved the MLF output without a risk of deviation.

Results show that the choice of a yeast-bacteria couple constitutes an important criterion for the success of MLF. The co-culture can be interesting for certain couples. However, a positive interaction was observed with other couples in the case of sequential fermentation. Therefore, this classical strategy has to be maintained.

**Keywords:** *Saccharomyces cerevisiae*, *Oenococcus oeni*, malolactic fermentation, sequential fermentations, co-cultures, membrane bioreactor, inhibitory molecules.

## Table des matières

### Liste des figures

### Liste des tableaux

<b>Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>I- Etude bibliographique.....</b>	<b>4</b>
<b>I-1 Ecologie des levures et des bactéries lactiques.....</b>	<b>4</b>
I-1-1 Ecologie des levures du raisin au vin.....	4
I-1-2 Ecologie des bactéries lactiques du raisin au vin.....	6
<b>I-2. Taxonomie et Morphologie des bactéries lactiques du vin.....</b>	<b>8</b>
<b>I-3 Fermentation alcoolique.....</b>	<b>10</b>
Les étapes biochimiques de la dégradation des sucres.....	10
a- La glycolyse.....	10
b-La fermentation alcoolique.....	13
c-La fermentation glycéropyruvique.....	13
d-Formation d'acide acétique.....	14
<b>I-4 Fermentation malolactique.....</b>	<b>15</b>
I-4-1 But et importance de la FML.....	15
I-4-2 ATPase membranaire d' <i>O. oeni</i> .....	17
I-4-3 Métabolisme des sucres chez <i>O. oeni</i> .....	18
I-4-4 Besoins nutritionnels d' <i>O. oeni</i> .....	20
<b>I-5 Facteurs influençant la FML.....</b>	<b>21</b>
<b>I-5-1 Les activateurs de la FML.....</b>	<b>22</b>

✓ <b>Les pratiques de cave</b> .....	22
a- Débourage.....	22
b- Macération pelliculaire.....	23
c- Elevage sur lies.....	24
✓ <b>Effet du CO<sub>2</sub></b> .....	25
<b>I-5-2 Les inhibiteurs de la FML</b> .....	26
✓ L'éthanol.....	26
✓ La température.....	27
✓ Le pH.....	28
✓ L'anhydride sulfureux.....	29
✓ Les acides gras.....	32
✓ Protéines.....	33
✓ Déficience du milieu en nutriments.....	33
✓ Composés phénoliques.....	34
✓ Pesticides.....	36
✓ Oxygène.....	36
<b>I-5-3 Mécanismes de résistance chez <i>O. oeni</i></b> .....	37
<b>I-5-4 Fabrication de levures <i>S. cerevisiae</i> transgéniques capables de.....</b>	39
<b>réaliser la FML : une solution alternative à la réalisation de la FML</b>	
<b>par <i>O. oeni</i> ?</b>	
I-5-4-1 Dégradation de l'acide malique par les levures.....	39
I-5-4-2 Fabrication de levures <i>S. cerevisiae</i> transgéniques capables.....	40
de réaliser une meilleure FML.	
<b>I-6 Etudes des interactions levures/bactéries</b> .....	42
✓ <b>Interactions directes</b> .....	42
a- Prédation et parasitisme.....	42
b- Inhibition par contact direct entre les cellules.....	42

✓ Interactions indirectes.....	43
a- Mutualisme.....	43
b- Neutralisme.....	43
c-Commensalisme.....	43
d- Compétition.....	43
e- Amensalisme.....	44
e- Quorum sensing.....	44
<b>I-6-1 Différents moyens d'études des interactions levures-bactéries.....</b>	<b>45</b>
<b>I-6-1-1 En milieu gélosé.....</b>	<b>45</b>
<b>I-6-1-2 En milieu liquide.....</b>	<b>48</b>
a- Fermentations séquentielles.....	48
b- Cultures mixtes ou co-cultures.....	48
b-1 Description du Bioréacteur à membrane (BRM).....	48
<b>I-7 Conclusion.....</b>	<b>52</b>
<b>II- Matériel et Méthodes.....</b>	<b>55</b>
<b>II-1 Matériel.....</b>	<b>55</b>
<b>II-1-1 Micro-organismes.....</b>	<b>55</b>
<b>II-1-2 Milieux de culture.....</b>	<b>55</b>
✓ Milieu de conservation et de réactivation des levures.....	55
✓ Milieu de conservation et de réactivation des bactéries.....	55
✓ Milieu synthétique pour la préparation des levains de levures et de bactéries.....	56
✓ Milieux synthétiques pour les cultures.....	57
a- Milieu synthétique jus de raisin.....	57
b- Milieu synthétique vin.....	57
c- Milieu MRS modifié.....	58

<b>II-2 Méthodes.....</b>	<b>59</b>
<b>II-2-1 Cultures de micro-organismes.....</b>	<b>59</b>
<b>II-2-1-1 Cultures pures.....</b>	<b>59</b>
a- Fermentation alcoolique (FA).....	59
b- Fermentation malolactique (FML).....	59
c- Fermentations séquentielles.....	59
<b>II-2-1-2 Cultures mixtes.....</b>	<b>60</b>
<b>II-2-2 Méthodes analytiques.....</b>	<b>61</b>
II-2-2-1 Enumération des cellules.....	61
II-2-2-2 Viabilité des levures.....	62
II-2-2-3 Mesure de la densité optique.....	62
II-2-2-4 Mesure du poids sec.....	63
a- Mesure du poids sec des levures.....	63
b- Mesure du poids sec des bactéries.....	63
II-2-2-5 Dosage du sucre restant dans le milieu par la méthode de DNS.....	63
II-2-2-6 Dosage du SO <sub>2</sub> ou anhydride sulfureux.....	64
II-2-2-7 Dosage du glycérol et de l'éthanol par HPLC.....	65
II-2-2-8 Dosage des acides gras par Chromatographie Gazeuse (GC).....	66
II-2-2-9 Dosage des protéines par la méthode de Lowry.....	66
II-2-2-10 Dosage des mannoprotéines.....	67
<b>II-2-2-11 Caractérisation préliminaire d'un agent protéique.....</b>	<b>68</b>
<b>responsable de l'inhibition de la FML dans les milieux préfermentés</b>	
<b>par certaines souches de levures <i>S. cerevisiae</i></b>	
a- Traitements thermiques et enzymatiques des milieux préfermentés.....	68
par les levures	
b- Méthode des puits (Well plate test).....	69

c-Précipitation différentielle des protéines au sulfate d'ammonium.....	70
d- Ultrafiltration des milieux préfermentés par les levures.....	71
e-Dialyse.....	73
<b>II-2-2-12 Dosages enzymatiques.....</b>	<b>74</b>
a-Dosage enzymatique de l'acide L-malique.....	74
b-Dosage enzymatique de l'acide L-Lactique.....	75
c-Dosage enzymatique de l'acide D-Lactique.....	76
d-Dosage enzymatique de l'azote ammoniacal.....	77
e-Dosage de l'azote alpha-aminé.....	78
f-Dosage enzymatique de l'acide acétique.....	79
g-Dosage enzymatique de l'acide citrique.....	80
<b>II-3 Calculs.....</b>	<b>82</b>
 <b>III- Résultats et Discussion</b>	
<b>Partie I. Cultures pures.....</b>	<b>85</b>
<b>I-1 Cultures pures des différentes souches de <i>S. cerevisiae</i> ..... en fioles d'Erlen-meyer.</b>	<b>85</b>
<b>I-2 Cultures pures des différentes souches de bactéries lactiques..... <i>O. oeni</i>.</b>	<b>93</b>
<b>Annexes de la partie I.....</b>	<b>104</b>
<b>Partie II. Cultures séquentielles.....</b>	<b>127</b>
<b>II-1 Cultures séquentielles réalisées avec <i>O. oeni</i> souche X.....</b>	<b>127</b>
<b>II-2 Cultures séquentielles réalisées avec <i>O. oeni</i> souche Y.....</b>	<b>140</b>
<b>Annexes de la partie II.....</b>	<b>145</b>

<b>Partie III. Caractérisation partielle d'un métabolite levurien inhibiteur.....</b>	<b>162</b>
<b>de nature protéique.</b>	
<b>III-1 Etude faite sur le milieu synthétique jus de raisin préfermenté.....</b>	<b>162</b>
<b>par <i>S. cerevisiae</i> souche D.</b>	
<b>III-2 Etude faite sur le milieu synthétique jus de raisin préfermenté.....</b>	<b>168</b>
<b>par <i>S. cerevisiae</i> souche C.</b>	
<b>Annexes de la partie III.....</b>	<b>175</b>
<b>Partie IV. Etude d'une nouvelle stratégie d'inoculation :.....</b>	<b>190</b>
<b>cultures mixtes, et comparaison avec la stratégie classique</b>	
<b>de cultures séquentielles.</b>	
<b>IV-1. Cultures mixtes réalisées avec le couple <i>S. cerevisiae</i>.....</b>	<b>191</b>
<b>souche D/O. <i>oeni</i> souche X dans le milieu synthétique</b>	
<b>jus de raisin en BRM.</b>	
<b>IV-2. Cultures mixtes réalisées avec le couple <i>S. cerevisiae</i>.....</b>	<b>201</b>
<b>souche C/O. <i>oeni</i> souche X dans le milieu synthétique</b>	
<b>jus de raisin en BRM.</b>	
<b>Annexes de la partie IV.....</b>	<b>210</b>
<b>Conclusion et perspectives.....</b>	<b>231</b>

## Liste des figures:

### Chapitre I. Etude bibliographique

Figure I-1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en bourgeonnement.....	6
Figure I-2. <i>Oenococcus oeni</i> en paires et en chaînettes.....	8
Figure I-3. Schéma de la glycolyse.....	12
Figure I-4. Schéma de la fermentation glycéropyruvique.....	14
Figure I-5. Schéma de la production d'acide acétique.....	14
Figure I-6. Modèle de génération d'ATP par la transformation de..... l'acide malique en acide lactique.	16
Figure I-7. Schéma de la fermentation du glucose par les bactéries..... hétérofermentaires selon la voie des pentoses-phosphates.	19
Figure I-8. Les différentes formes de l'anhydride sulfureux dans le vin.....	30
Figure I-9. Bioréacteur à membrane pour l'étude de cultures mixtes de..... micro-organismes	50
Figure I-10. Temps caractéristiques des réponses biologiques importantes..... en ingénierie de bioréacteurs.	51

### Chapitre II. Matériel et méthodes

Figure II-1. Représentation de la cellule de Thoma et du petit Salumbeni.....	62
Figure II-2. Vue microscopique d'un grand carreau de la cellule de Thoma..... renfermant des levures	62
Figure II. 3. Schéma illustrant les différentes étapes de l'ultrafiltration..... des milieux préfermentés par les levures.	72

### Chapitre III. Résultats et discussion

#### Partie I. Cultures pures.

Fig. I-1 Evolution de la biomasse des différentes souches de <i>S. cerevisiae</i> (a)..... et de la consommation de sucre (b) au cours de la FA.	86
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Fig. I-2 Evolution de la concentration cellulaire des 3 souches d'*O. oeni* (a).....93  
et de leur consommation d'acide malique (b) pendant leur culture pure  
dans le milieu synthétique jus de raisin en fioles d'Erlen-meyer.

Fig. I-3 Evolution de la biomasse d'*O. oeni* souche X (a) et de sa.....97  
consommation d'acide malique (b) au cours de ses cultures pures  
dans les milieux synthétiques jus de raisin et vin en fioles d'Erlen-meyer.

Fig. I-4 Evolution de la biomasse d'*O. oeni* souche X (a) et de sa.....100  
consommation d'acide malique (b) au cours des 3 cultures pures  
réalisées dans le BRM.

## **Partie II. Cultures séquentielles.**

Fig. II-1 FML menées par *O. oeni* souche X dans le milieu préfermenté.....128  
par *S. cerevisiae* souche C dans 4 conditions différentes.

Fig. II-2 Evolution de la biomasse d'*O. oeni* souche X (a) et de sa.....129  
consommation d'acide malique (b) pendant les FML réalisées  
dans le milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche C.

Fig. II-3 Evolution de la biomasse d'*O. oeni* souche X (a) et de sa.....133  
consommation d'acide malique (b) dans le milieu préfermenté  
par *S. cerevisiae* souche C en présence de différents  
compléments nutritionnels.

Fig. II-4 Evolution de la biomasse d'*O. oeni* souche X (a) et de sa .....135  
consommation d'acide malique (b) dans les milieux préfermentés par  
quatre souches de *S. cerevisiae* ainsi que dans les milieux témoins.

Fig. II-5 Evolution de la biomasse d'*O. oeni* souche Y (a) et de sa.....140  
consommation d'acide malique (b) dans les milieux préfermentés par  
les trois souches de *S. cerevisiae* ainsi que dans le milieu témoin.

### **Partie III. Caractérisation partielle d'un métabolite levurien inhibiteur de nature protéique.**

Fig. III-1 Evolution de la biomasse d'*O. oeni* souche X (a) et de sa.....163  
consommation d'acide malique (b) dans le milieu préfermenté par  
*S. cerevisiae* souche D traité à la chaleur et à la pepsine ainsi que  
dans les milieux témoins.

Fig. III-2 Evolution de la biomasse d'*O. oeni* souche X (a) et de sa.....167  
consommation d'acide malique (b) dans les milieux MRS contenant  
les différentes fractions peptidiques du milieu préfermenté par  
*S. cerevisiae* souche D ainsi que dans le milieu MRS témoin.

Fig. III-3 Evolution de la biomasse d'*O. oeni* souche X (a) et de sa.....169  
consommation d'acide malique (b) dans le milieu préfermenté par  
*S. cerevisiae* souche C après traitements enzymatique et thermique  
ainsi que dans les milieux témoins.

Fig. III-4 Evolution de la biomasse d'*O. oeni* souche X (a) et de sa.....172  
consommation d'acide malique (b) dans les milieux MRS contenant  
les différentes fractions peptidiques du milieu préfermenté par  
*S. cerevisiae* souche C ainsi que dans le milieu MRS témoin.

### **Partie IV. Etude d'une nouvelle stratégie d'inoculation : cultures mixtes, et comparaison avec la stratégie classique de cultures séquentielles.**

Fig. IV-1 Evolution de la biomasse d'*O. oeni* souche X (a) et de sa.....191  
consommation d'acide malique (b) au cours des cultures mixtes  
avec *S. cerevisiae* souche D dans le BRM sous air et sous azote.

Fig. IV-2 Evolution de la biomasse de *S. cerevisiae* souche D (a) et de.....193  
sa consommation de sucre (b) au cours de la culture mixte avec  
*O. oeni* souche X dans le BRM sous air et sous azote.

Fig. IV-3 Evolution de la biomasse de *S. cerevisiae* souche D (a) et de.....195  
sa consommation de sucre (b) pendant sa culture pure et sa culture  
mixte avec *O. oeni* souche X dans le BRM sous azote.

- Fig. IV-4 Evolution de la biomasse d'*O. oeni* souche X (a) et de sa.....197  
consommation d'acide malique (b) au cours de la culture mixte  
avec *S. cerevisiae* souche D et la culture séquentielle réalisée dans  
le milieu préfermenté par cette même souche de levure.
- Fig. IV-5 Evolution de la biomasse de *S. cerevisiae* souche C (a) et de.....202  
sa consommation de sucre (b) au cours des cultures mixtes en  
présence d'*O. oeni* souche X avec et sans séparation des deux  
micro- organismes dans les deux réservoirs du BRM.
- Fig. IV-6 Evolution de la biomasse d'*O. oeni* souche X (a) et de sa.....203  
consommation d'acide malique (b) au cours des cultures mixtes  
en présence de *S. cerevisiae* souche C avec et sans séparation des  
deux micro-organismes dans les deux réservoirs du BRM.
- Fig. IV-7 Evolution de la biomasse de *S. cerevisiae* souche C (a) et de.....206  
sa consommation de sucre (b) au cours de sa culture mixte avec  
*O. oeni* souche X et pendant sa culture pure dans le BRM sous azote.
- Fig. IV-8 Evolution de la biomasse d'*O. oeni* souche X (a) et de sa.....207  
consommation d'acide malique (b) au cours de la culture mixte avec  
*S. cerevisiae* souche C et au cours de la culture séquentielle dans le  
milieu préfermenté par cette même souche de levure.

## Liste des tableaux

### Chapitre I. Etude bibliographique

Tableau I-1. Facteurs influençant la croissance et la survie des bactéries.....	22
Tableau I-2. Caractéristiques du module de filtration du BRM.....	49

### Chapitre III. Résultats et discussion

#### Partie I. Cultures pures

Tableau I-1. Paramètres cinétiques de la FA menée par les cinq.....	86
souches de <i>S. cerevisiae</i> .	
Tableau I-2. Profil biochimique des milieux préfermentés par les cinq.....	89
souches de <i>S. cerevisiae</i> .	
Tableau I-3. Paramètres cinétiques de la FML menée par les trois.....	94
souches d' <i>O. oeni</i> dans le milieu synthétique jus de raisin en fioles d'Erlen-meyer.	
Tableau I-4. Profil biochimique des milieux synthétiques jus de raisin.....	95
fermentés par les trois souches d' <i>O. oeni</i> .	
Tableau I-5. Paramètres cinétiques des FML menées par <i>O. oeni</i> .....	98
souche X dans les milieux synthétiques jus de raisin et vin en fioles d'Erlen-meyer.	
Tableau I-6. Paramètres cinétiques des FML menées par <i>O. oeni</i> souche.....	100
X dans le BRM sous air, azote et CO <sub>2</sub> .	
Tableau I-7. Profil biochimique des milieux synthétiques jus de raisin.....	102
fermentés par <i>O. oeni</i> souche X dans le BRM sous air, azote et CO <sub>2</sub> .	

#### Partie II. Cultures séquentielles.

Tableau II-1. Paramètres cinétiques des FML menées par <i>O. oeni</i> souche.....	129
X dans le milieu préfermenté par <i>S. cerevisiae</i> souche C suivant les 4 conditions testées.	

Tableau II-2. Paramètres cinétiques des FML menées par *O. oeni* souche.....133  
X dans le milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche C en  
présence de 200 mg/L d'Optired<sup>®</sup>, d'Optimalo<sup>®</sup> ou d'Extrait de levure.

Tableau II-3. Paramètres cinétiques des FML menées par *O. oeni* souche.....136  
X dans les milieux préfermentés par *S. cerevisiae* souches A, B,  
C et D ainsi que dans les milieux témoins.

Tableau II-4. Paramètres cinétiques des FML menées par *O. oeni* souche.....141  
Y dans les milieux préfermentés par *S. cerevisiae* souches B, C  
et D ainsi que dans le milieu témoin.

### **Partie III. Caractérisation partielle d'un métabolite levurien inhibiteur de nature protéique.**

Tableau III-1. Paramètres cinétiques des FML menées par *O. oeni* souche.....163  
X dans le milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche D traité  
à la chaleur et à la pepsine et dans les milieux témoins.

Tableau III-2. Paramètres cinétiques des FML menées par *O. oeni* souche.....167  
X dans les milieux MRS contenant les différentes fractions  
peptidiques du milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche D  
ainsi que dans le milieu témoin.

Tableau III-3. Paramètres cinétiques des FML menées par *O. oeni* souche.....169  
X dans le milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche C  
après traitement à la pepsine et autoclavage ainsi que dans  
les milieux témoins.

Tableau III-4. Paramètres cinétiques des FML menées par *O. oeni* souche.....172  
X dans les milieux MRS contenant les différentes fractions  
peptidiques du milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche C  
ainsi que dans le milieu témoin.

**Partie IV. Etude d'une nouvelle stratégie d'inoculation : cultures mixtes, et comparaison avec la stratégie classique de cultures séquentielles.**

Tableau IV-1. Paramètres cinétiques des FML menées par <i>O. oeni</i> souche.....	192
X pendant les cultures mixtes avec <i>S. cerevisiae</i> souche D dans le BRM sous air et sous azote.	
Tableau IV-2. Paramètres cinétiques des FA menées par <i>S. cerevisiae</i> .....	193
souche D pendant les cultures mixtes avec <i>O. oeni</i> souche X dans le BRM sous air et sous azote.	
Tableau IV-3. Quelques paramètres biochimiques des milieux fermentés.....	196
à la fin de la culture mixte de <i>S. cerevisiae</i> souche D/ <i>O. oeni</i> souche X et de la culture pure de <i>S. cerevisiae</i> souche D dans le BRM sous azote.	
Tableau IV-4. Paramètres cinétiques de la FML menée par <i>O. oeni</i> .....	197
souche X pendant ses cultures mixte et séquentielle avec <i>S. cerevisiae</i> souche D et pendant sa culture pure dans le BRM sous azote (témoin).	
Tableau IV-5. Composition du milieu à la fin de la culture mixte de.....	200
<i>S. cerevisiae</i> souche D/ <i>O. oeni</i> souche X et à la fin des cultures pures de ces souches dans le BRM sous azote, en sucre et en acides L-malique, L-Lactique, D-Lactique et acétique.	
Tableau IV-6. Caractéristiques biochimiques des milieux fermentés à.....	204
la fin des deux cultures mixtes de <i>S. cerevisiae</i> souche C/ <i>O. oeni</i> souche X.	
Tableau IV-7. Caractéristiques biochimiques des milieux fermentés à .....	206
la fin de la culture mixte de <i>S. cerevisiae</i> souche C/ <i>O. oeni</i> souche X et de la culture pure de <i>S. cerevisiae</i> souche C dans le BRM sous azote.	

Tableau IV-8. Paramètres cinétiques de la FML menée par <i>O. oeni</i> .....	208
souche X pendant ses cultures mixte et séquentielle	
avec <i>S. cerevisiae</i> souche C et pendant sa culture pure	
dans le BRM sous azote (témoin).	

## *Liste des abréviations*



## Liste des abréviations :

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

ATP : adénosine triphosphate

°C : degré Celsius

Da : Dalton

D.O : densité optique

FA : fermentation alcoolique

FML : fermentation malolactique

g : accélération de la pesanteur

g : gramme

h : heure

Ln : logarithme népérien

M : 1 mole par litre

min : minutes

mg : milligramme

mL : millilitre

µm : micromètre

nm : nanomètre

MRS : *Man Rogosa Sharpe*

NAD : nicotinamide adénine diphosphate

*O. oeni* : *Oenococcus oeni*

pH : potentiel hydrogène

% : pourcentage

® : marque déposée

rpm : révolution par minute

*S. cerevisiae* : *Saccharomyces cerevisiae*

Tris : trihydroxyméthylaminométhane

v/v : volume par volume

YEPD : yeast extract peptone dextrose



# *Introduction*



## Introduction

La vinification consiste en une biotransformation du jus de raisin en vin et fait intervenir des phénomènes physiques, biochimiques et biologiques complexes ainsi que plusieurs types de micro-organismes, chacun ayant sa spécificité et son rôle particulier. Elle comprend essentiellement deux étapes biologiques ; la fermentation alcoolique (FA) suivie dans certains cas par la fermentation malolactique (FML). La FA consiste en la transformation par les levures, principalement *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), des sucres du moût (glucose et fructose) en éthanol et en dioxyde de carbone. Puis dans les vins rouges et dans certains vins blancs secs de garde et/ou très acides, une deuxième étape biologique, la FML, peut avoir lieu à la fin de la FA si les conditions sont favorables. La FML consiste en une décarboxylation enzymatique de l'acide L-malique en acide L-lactique par les bactéries lactiques, principalement *Oenococcus oeni* (*O. oeni*). Ceci se traduit par une diminution de l'acidité du vin qui conduit à un net assouplissement gustatif.

Cependant, la FML ne se résume pas à une simple diminution de l'acidité, car *O. oeni* participe également à la complexité du vin. En effet, outre l'acide malique, d'autres substrats (glucides, acides organiques, composés azotés...) sont métabolisés au cours de la FML. Par exemple, l'acide citrique est métabolisé en acétate et oxaloacétate. L'oxaloacétate est ensuite transformé en pyruvate qui donne de l'acétate, du lactate, du diacétyle, de l'acétoïne et du 2,3-butanediol. Ainsi le métabolisme des bactéries lactiques conduit à la synthèse de produits secondaires qui ont un impact sur les qualités organoleptiques du vin. La FML joue également un rôle dans la stabilité microbiologique du vin. Toutes ces caractéristiques soulignent l'importance de cette étape dans le procédé de vinification.

Généralement, la FML est déclenchée spontanément à la fin de la FA par les bactéries indigènes du moût, mais le moment de son déclenchement, sa durée et son accomplissement restent aléatoires et ne sont pas toujours garantis. Ceci est dû à l'intervention de plusieurs facteurs inhibiteurs de la FML allant du raisin lui-même (composés phénoliques) aux conditions physico-chimiques contraignantes du milieu à la fin de la FA (faible pH, température, déficience en nutriments, molécules inhibitrices relarguées par les levures comme l'éthanol, le SO<sub>2</sub>, les acides gras saturés à chaîne moyenne, les protéines, etc...) en passant par les pratiques de vinification (pratiques de cave, sulfitage, débourage, élevage sur lies, etc...).

Par ailleurs, les connaissances acquises sur la physiologie et le métabolisme d'*O. oeni* ont permis de développer des levains bactériens de façon à contrôler la population et la nature des micro-organismes conduisant la FML. Parmi les critères de sélection de ces bactéries, on trouve la tolérance à l'acidité et à l'éthanol, la résistance aux phages, la non-production d'amines biogènes et de défauts olfactifs, une bonne croissance bactérienne, une cinétique rapide et régulière de

dégradation de l'acide L-malique dans le vin, etc...Mais malgré la mise sur le marché de souches commerciales sélectionnées adaptées aux contraintes déjà citées, et malgré les connaissances sur les facteurs qui affectent la croissance bactérienne et la consommation de l'acide malique, il arrive de façon occasionnelle et tout à fait fortuite que la FML ne se déclenche pas ou qu'elle ne soit pas complètement achevée. Ceci peut être dû à un échec de l'ensemencement souvent lié à une mauvaise procédure de préparation ou d'inoculation du levain. Mais d'autres raisons existent aussi, notamment les interactions entre les bactéries lactiques et les autres micro-organismes du vin.

Plus particulièrement, les interactions entre les souches d'*O. oeni* et les souches de *S. cerevisiae* responsables de la FA et qui constituent le facteur principal pouvant influencer le déroulement de la FML, ont suscité l'attention de différents chercheurs. Différents types d'interactions ont ainsi été établis : absence d'interaction, inhibition et/ou stimulation des bactéries par les levures.

Pour leur évaluation, il existe des techniques microbiologiques classiques sur milieux solides, basées sur celle des antibiogrammes, permettant une mise en évidence qualitative de ces interactions. Mais les résultats de ces techniques ne sont pas tout le temps extrapolables en conditions réelles de vinification. De plus, ces méthodes ne nous permettent pas de quantifier l'interaction d'où la nécessité de passer en milieux liquides synthétiques ou naturels. A ce niveau, l'évolution de la biomasse bactérienne et levurienne peut être suivie et mesurée et les molécules responsables des interactions peuvent être identifiées et dosées. Cependant, la compréhension de ces interactions et l'identification des molécules qui en sont responsables ainsi que leur mode d'action ne sont pas encore toutes maîtrisées.

Ce travail a pour objectif d'apporter une contribution à l'étude des interactions entre les levures *S. cerevisiae* et les bactéries lactiques *O. oeni* en étudiant l'effet de quatre souches œnologiques de levures sur la croissance de deux souches de bactéries lactiques et sur leur consommation d'acide malique. Dans un premier temps, des cultures séquentielles seront réalisées. Ces cultures simulent le procédé de vinification tel qu'il se déroule naturellement. Puis, des cultures mixtes seront menées dans un bioréacteur à membrane afin de tester une nouvelle stratégie de co-inoculation. Des milieux synthétiques dont la composition simule celle du jus de raisin ou du vin seront utilisés pour toutes ces études. La présence de certaines molécules inhibitrices synthétisées par les levures, notamment les molécules de nature protéique, piste peu exploitée jusqu'à présent, sera investiguée. Notre travail sera ainsi divisé en quatre chapitres.

Dans le premier chapitre, après avoir rappelé la biochimie des fermentations alcoolique et malolactique et l'écologie des principaux acteurs de la vinification, nous allons exposer les principaux activateurs et inhibiteurs de la FML. Nous terminerons avec une synthèse sur les différents types d'interactions rencontrés ainsi que les travaux permettant de les évaluer. Nous

décrivons alors un nouveau bioréacteur à membrane et son application permettant la réalisation de la culture mixte de deux souches différentes qui vont rester séparées physiquement grâce à une membrane à fibres creuses.

Dans le deuxième chapitre, le matériel et les méthodes mis en œuvre pour les expérimentations réalisées sont présentés.

Le troisième chapitre montre les résultats obtenus lors de ce travail et associe également les discussions. Il est divisé en quatre parties. La première partie nous montre les résultats des cultures pures de levures et de bactéries dans les milieux synthétiques jus de raisin et vin permettant ainsi d'établir le profil cinétique et biochimique de chaque souche. La deuxième partie porte sur l'étude des interactions levures-bactéries pendant les cultures séquentielles. La troisième partie porte sur l'identification de peptides inhibiteurs de la FML synthétisés par certaines souches de levure et qui va contribuer à une meilleure compréhension de cette inhibition. La quatrième partie porte sur l'étude des interactions levures-bactéries mais cette fois en cultures mixtes dans un bioréacteur à membrane en milieu synthétique jus de raisin.

Enfin, dans le quatrième chapitre, les conclusions générales seront données ainsi que les perspectives de ces travaux.



# *Chapitre I. Etude bibliographique*



## I- Etude bibliographique

La transformation du jus de raisin en vin fait intervenir des phénomènes biochimiques complexes et plusieurs types de micro-organismes, chacun ayant sa spécificité et son rôle particulier. Le procédé de vinification implique une première étape biologique, la fermentation alcoolique, qui consiste en la transformation par les levures, des sucres du moût en éthanol. Dans certains cas, une deuxième étape biologique a lieu, la fermentation malolactique, pendant laquelle les bactéries lactiques transforment l'acide malique du moût en acide lactique. Dans ce chapitre, nous allons exposer l'écologie des principaux acteurs de la vinification, faire un rappel sur la biochimie des fermentations alcoolique et malolactique, détailler les facteurs influençant la réalisation de la fermentation malolactique et les différents types d'interaction rencontrés entre les levures et les bactéries lactiques lors de la vinification ainsi que les différents moyens d'évaluation de ces interactions.

### I-1 Ecologie des levures et des bactéries lactiques

#### I-1-1 Ecologie des levures du raisin au vin

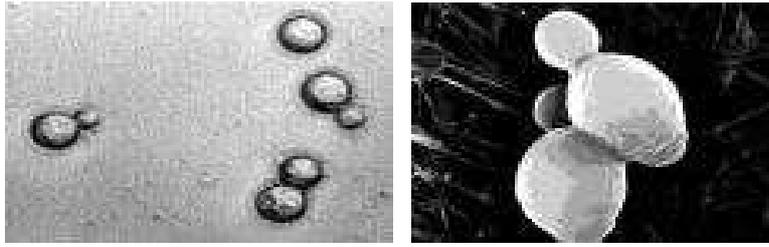
La levure de production du vin est par excellence *Saccharomyces cerevisiae* (cf figure I.1) et plus rarement *Saccharomyces bayanus* (Dubourdiou et Frezier, 1990, Masneuf, 1996). *Saccharomyces cerevisiae* est sans doute l'espèce la plus importante pour l'humanité à cause de ses multiples utilisations autant dans la fabrication de plusieurs produits comme le vin, la bière ou le pain mais aussi pour son utilité en tant que modèle pour des études fondamentales en biochimie, biologie moléculaire et génétique. De très nombreux travaux sont consacrés à la description et à l'écologie des levures du vin, concernant la répartition et la succession des espèces rencontrées sur le raisin, puis dans le vin, au cours de sa fermentation et de sa conservation (Fleet *et al.* 1984, Moore *et al.* 1988, Mora *et al.* 1990, Romano et Suzzi, 1993, Martini *et al.* 1996, Jolly et Pretorius, 2000). Ils montrent bien que *Saccharomyces cerevisiae* est l'agent principal de la fermentation alcoolique et qu'un certain nombre d'autres levures non-*Saccharomyces* y participent également.

Les levures sont présentes partout dans la nature quand les conditions sont favorables à leur présence, leur survie et leur développement : sur les sols, à la surface des végétaux etc. Leur dissémination est assurée par le vent, les insectes et l'homme à travers ses interventions sur l'environnement comme le travail des sols, les vendanges etc. Le nombre d'espèces présentes de façon significative sur le raisin est limité. Les espèces ayant un métabolisme oxydatif appartenant au genre *Rhodotorula* et les espèces à faible pouvoir fermentaire (*Hanseniaspora uvarum* et sa

forme asporogène *Kloeckera apiculata*, levures apiculées) ainsi que *Candida stellata* sont les plus représentées. Les autres espèces rencontrées sur le raisin, dans le moût et le vin se trouvent à des proportions généralement faibles : *Metschnikowia pulcherrima*, *Candida famata*, *Candida apicola*, *Pichia membranefaciens*, *Pichia guillermondii*, *Hansenula anomala*, *Hanseniaspora occidentalis*, *Dekkera* sp., *Kluyveromyces* sp., *Saccharomyces* sp., *Schizosaccharomyces* sp., *Torulopsis* sp., *Torulasporea delbrueckii*, *Zygosaccharomyces fermentati*, *Zygosaccharomyces balli*. Dans son étude taxonomique, Barnett *et al.* (1990) et Barnett (1992) fournissent une liste presque complète des levures rencontrées sur les raisins et les vins.

Les levures du genre *Saccharomyces* se trouvent sur le raisin à des pourcentages extrêmement faibles, environ 1 à 3 % de la population totale. Un certain nombre de travaux montrent qu'on peut trouver *S. cerevisiae* dans les chais de vinification, sur les murs, les sols et le matériel ou la cuverie utilisés pour les vendanges et la vinification à des concentrations plus élevées que sur le raisin (Poulard *et al.* 1985). En effet, au cours de la récolte, en fonction du matériel et des techniques utilisées, on observe une multiplication des levures avant l'arrivée de la récolte à la cave. Pendant le pressurage, le nombre de levures à caractère fermentaire augmente alors que celui des levures peu fermentaires et oxydatives diminue et, par conséquent, les levures du genre *Saccharomyces* deviennent alors majoritaires.

Pendant la fermentation alcoolique, on peut observer un changement important de la microflore. Au début, la microflore des cuves ressemble à celle du raisin. Les espèces ayant un métabolisme strictement oxydatif ou peu fermentaire sont parfois responsables du déclenchement de la fermentation mais diminuent fortement et disparaissent totalement dans la plupart des cas, surtout quand l'éthanol dépasse les 4 à 5 % (v/v), à cause de leur faible tolérance ainsi que de la croissance rapide de *S. cerevisiae*, plus résistante à l'éthanol. Les conditions acides et osmotiques du jus de raisin, les conditions anaérobies, l'éthanol et l'emploi du SO<sub>2</sub> limitent la croissance de la plupart des levures, des moisissures et des bactéries de la flore indigène du raisin autres que *S. cerevisiae*. Toutefois, selon des études quantitatives (Fleet *et al.* 1984, Moore *et al.* 1988, Mora *et al.* 1990), il semble que les non-*Saccharomyces* restent présentes pendant un certain temps dans le moût en fermentation à des populations de 10<sup>6</sup> à 10<sup>7</sup> cellules/mL et leur contribution à la fermentation n'est pas tout le temps négligeable (Fleet, 1990, Fleet et Heard, 1992 et Lema *et al.* 1996). Ces levures non-*Saccharomyces* interviennent soit directement en apportant une contribution au profil aromatique et gustatif, soit indirectement, en rivalisant pour les éléments nutritifs essentiels et en affectant ainsi la performance de la levure *S. cerevisiae* (Heard et Fleet, 1985, 1986, Jolly et Pretorius, 2000). Ces espèces pourraient contribuer considérablement à la production de composés tels que l'acide acétique, le glycérol et plusieurs esters.



**Figure I-1. *Saccharomyces cerevisiae* en bourgeonnement**

### **I-1-2 Ecologie des bactéries lactiques du raisin au vin**

Comme les levures, les bactéries lactiques font aussi partie de la flore microbienne du raisin, du moût et du vin. Le pH acide, la concentration en éthanol et la composition des vins finis exercent des pressions sélectives vis-à-vis des bactéries. Seul un petit nombre d'espèces parvient à se développer dans les moûts et les vins. Les espèces le plus souvent rencontrées en œnologie appartiennent aux genres *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Lactobacillus*. La présence de ces bactéries lactiques sur les raisins est faible, soit environ 100 cellules/gramme de baie (Lafon-Lafourcade *et al.* 1983). Le niveau de population dépend fortement des conditions climatiques pendant les derniers jours de maturation, de la maturité et de l'état sanitaire du raisin. Les populations sont plus élevées sur des raisins matures ou présentant un mauvais état sanitaire. Lorsque la maturation se termine par une période chaude et peu pluvieuse, des bactéries sont présentes en plus grand nombre sur les raisins. Elles sont plus rares après une période de pluie. Néanmoins, cette flore initiale est toujours faible et complétée par des bactéries recueillies naturellement sur le matériel vinicole au cours des différentes étapes qui précèdent la mise en cuve. Bien qu'on puisse trouver dans les vins les bactéries indigènes du raisin, les bactéries sont également originaires de parties d'équipement de la cave, comme dans le cas des levures. Très rapidement, à l'occasion des diverses opérations qui suivent la cueillette et vont jusqu'à la mise en cuve, le moût estensemencé, probablement par le matériel avec lequel il entre en contact. Ainsi, au fur et à mesure de la période de récolte, les bactéries comme les levures colonisent le chai. Il n'est pas encore clair laquelle des deux voies d'ensemencement naturel est la plus importante.

Tout au long de la vinification, la microflore lactique évolue, non seulement en nombre mais aussi en variétés d'espèces. Les bactéries isolées sur les raisins avant la récolte appartiennent principalement aux espèces *Lactobacillus plantarum*, *L. hilgardii* et *L. casei* (Carre, 1982). L'espèce *Oenococcus oeni* anciennement appelé *Leuconostoc oenos* (Dicks *et al.* 1995) qui devient plus tard la plus importante, se trouve rarement sur les feuilles ou les raisins et seulement à de très faibles concentrations ; elle est en effet peu présente au début de la vinification. Les Lactobacilles et les Pédiocoques se trouvent plus fréquemment sur les raisins qu'*Oenococcus oeni*. De toutes ces

espèces, cette dernière est considérée comme la plus tolérante aux conditions physico-chimiques contraignantes du vin et est donc responsable de la fermentation malolactique dans la plupart des cas.

Le nombre total de bactéries lactiques atteint  $10^3$  à  $10^4$  cellules/mL après pressurage (Costello *et al.* 1983). Les moûts de raisin juste après leur arrivée dans la cuve contiennent une microflore très variée appartenant généralement aux espèces : *Lactobacillus plantarum*, *L. casei*, *L. hilgardii*, *L. brevis*, *Pediococcus damnosus*, *P. pentosaceus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Oenococcus oeni*. Mais dans le cas d'un mauvais état sanitaire ou quand les conditions de transport et/ou la propreté des équipements de la cave ne sont pas optimales, il est possible d'avoir jusqu'à  $10^6$  cellules/mL, soit autant qu'une population de levures en début de fermentation alcoolique, d'où les risques de compétition. Par ailleurs le pH des moûts de raisin très murs est généralement plus élevé. Ce facteur est absolument déterminant pour le niveau de la population bactérienne et pour son évolution.

Dans l'élaboration des vins qui nécessitent une fermentation malolactique, la microflore bactérienne totale passe par plusieurs phases. Pendant les premiers jours de la fermentation alcoolique, les bactéries et les levures se multiplient. Les levures mieux adaptées au moût de raisin, se développent très rapidement à des populations élevées. Très souvent une première croissance des bactéries lactiques peut être observée en même temps que la croissance des levures mais elle reste limitée à  $10^4$ - $10^5$  cellules/mL (Lafon-Lafourcade *et al.* 1983). Cette croissance dépend des conditions physico-chimiques du milieu et elle est d'autant plus importante que le pH est haut et que la concentration de  $SO_2$  est faible (Henick-Kling et Park, 1994). La croissance des bactéries lactiques au début de la fermentation alcoolique est transitoire. Pendant la phase la plus active de la fermentation alcoolique et jusqu'à l'épuisement des sucres, les bactéries régressent rapidement jusqu'à  $10^2$ - $10^3$  cellules/mL ou encore plus bas à cause de la compétition avec les levures et des conditions du milieu. Au cours de la fermentation alcoolique, une sélection naturelle des différentes espèces de bactéries lactiques s'opère progressivement et à la fin de la FA seules les espèces les plus résistantes au milieu alcoolisé persistent. Ainsi les différentes espèces disparaissent au profit d'*O. oeni* (Lonvaud-Funel, 1992). A la fin de la fermentation alcoolique il restera  $10^2$  à  $10^3$  cellules/mL d'*O. oeni*. C'est cette espèce qui se multipliera par la suite et constituera la microflore responsable de la FML. Il est possible que des représentants d'autres espèces subsistent à des populations résiduelles très faibles et après la FA certaines peuvent même se multiplier si le vin est mal protégé ce qui pourra l'altérer.

Concernant la transformation de l'acide malique, cette dernière est déclenchée dès que le niveau de la population devient suffisant pour la démarrer (en général  $10^6$  cellules/mL). Elle peut s'étendre sur plusieurs jours ou plusieurs semaines selon les cas. Elle peut s'achever pendant la phase stationnaire

ou continuer au début de la phase de déclin. Si les conditions sont favorables, elle peut être achevée avant la fin de la croissance.

Finalement, à la fin de la FML, il est primordial de sulfiter le vin pour éliminer toute population bactérienne viable.

## I-2. Taxonomie et Morphologie des bactéries lactiques du vin

Les bactéries lactiques appartiennent au groupe des micro-organismes Gram positifs et sont donc colorées en violet par le test de Gram qui est relatif à la constitution de la paroi cellulaire. Les *Leuconostoc* et *Oenococcus* (cf figure I-2) ont la forme de coques. Ce sont de petites cellules (taille entre 0,5 et 1  $\mu\text{m}$ ) arrondies ou légèrement allongées formant des paires ou des chaînettes. Les *Pediococcus* sont aussi des coques mais se développent très souvent en tétrades. Les *Lactobacillus*, des bacilles, ont la forme de petits bâtonnets allongés et se développent en paires ou en chaînettes.



**Figure I-2. *Oenococcus oeni* en paires et en chaînettes**

Selon la diversité des produits du métabolisme des sucres, les bactéries lactiques sont distinguées en deux groupes :

- celles qui produisent une quantité importante d'acide lactique (> 85 %) à partir du glucose sont appelées homofermentaires comme les espèces appartenant au genre *Pediococcus* et l'espèce *Lactobacillus mali*. Ces bactéries dégradent le glucose en pyruvate suivant la voie classique de la glycolyse (cf figure I-3). Ce dernier est ensuite réduit en acide D et/ou L-Lactique suivant les espèces par les lactates déshydrogénases L et/ou D. Cette étape permet la réoxydation des 2 molécules de NADH, H<sup>+</sup> obtenues pendant la glycolyse en NAD<sup>+</sup>.

- celles qui en plus de l'acide lactique, produisent de l'acide acétique, de l'éthanol et du CO<sub>2</sub> et sont appelées hétérofermentaires. On distingue :

- a- les espèces hétérofermentaires strictes comme celles appartenant au genre *Leuconostoc* et certaines espèces du genre *Lactobacillus* (*L. brevis*, *L. hilgardii* etc.). Elles ne possèdent pas l'aldolase de la glycolyse et donc ne peuvent fermenter les sucres que suivant la voie hétérofermentaire des pentoses-phosphates (cf figure I-7).

b- les espèces hétérofermentaires facultatives comme *O. oeni*, *Lactobacillus casei* et *Lactobacillus plantarum* qui possèdent les enzymes des deux voies (glycolyse et pentoses-phosphates) et qui adoptent l'une des deux voies suivant les conditions du milieu.

Au cours de la vinification, les levures interviennent généralement avant les bactéries. Dans le cas contraire, si *O. oeni* induit la FML en même temps que la FA (pH haut, faible sulfitage, fermentation languissante), elle peut fermenter les sucres suivant la voie hétérofermentaire et entraîner ainsi une augmentation de l'acidité volatile (piqûre lactique). Certains auteurs (Lafon-Lafourcade et Ribéreau-Gayon, 1984) ont constaté que l'inoculation d'*O. oeni* en début de fermentation peut conduire à l'inhibition des levures et à une forte production d'acide acétique. Par contre, d'autres auteurs ont pu effectuer avec succès une fermentation alcoolique et malolactique simultanées sans production excessive d'acide acétique (Blackburn, 1984, Beelman et Kunkee, 1985). Le succès d'une telle opération dépend de la compatibilité des souches de levure et de bactérie utilisées (Cannon et Pilone, 1993)

Comme déjà citée, l'espèce la plus importante en œnologie est *O. oeni*. Sa description peut être résumée de la façon suivante :

- C'est une espèce acidophile qui se développe dans les moûts et les vins.
- Elle est mésophile et sa température optimale de croissance se situe entre 20 et 30°C et à 21°C dans le cas où on a 14 % (v/v) d'éthanol. Sa croissance n'est pas totalement inhibée en présence de 10 % (v/v) d'éthanol.
- Elle a la forme d'une cellule arrondie ou légèrement allongée, formant des paires ou des chaînettes (diamètre entre 0,5 et 0,7 µm et longueur entre 0,7 et 1,2 µm).
- Elle n'est ni sporulante ni mobile.
- Elle est chimiorganotrophe et nécessite donc un sucre fermentescible et un milieu riche.
- Elle est capable de convertir l'acide L-malique en acide L-lactique.
- Elle préfère le fructose au glucose et souvent fermente le tréhalose.
- La fermentation du glucose conduit à la production d'acide D-Lactique, de CO<sub>2</sub>, d'acide acétique et d'éthanol.
- Elle a un comportement variable en ce qui concerne la fermentation des pentoses ; dans le vin les pentoses comme l'arabinose et le xylose sont fermentés avant le glucose.
- C'est une espèce anaérobie facultative.
- Certaines souches hydrolysent l'arginine et d'autres fermentent le citrate en présence de sucres fermentescibles, mais ce caractère est perdu lors de cultures successives.

### **I-3 Fermentation alcoolique**

#### **Les étapes biochimiques de la dégradation des sucres**

Le moût de raisin contient en général entre 160 et 220 g/L de sucre dont les étapes biochimiques de dégradation aboutissant à la fermentation alcoolique sont détaillées dans ce qui suit :

##### **a- La glycolyse**

La glycolyse (cf figure I-3) se fait en aérobiose comme en anaérobiose et c'est donc le point de départ du métabolisme des sucres que ce soit par fermentation ou par respiration. La première étape est la phosphorylation du glucose grâce à la glucokinase en glucose-6-phosphate qui sera par la suite isomérisé en fructose-6-phosphate par l'intermédiaire de la fructose isomérase. Le fructose-6-phosphate est par la suite phosphorylé pour donner le fructose-1,6-bisphosphate grâce à la phosphofructokinase. Il y a donc jusqu'à présent consommation de deux molécules d'ATP. Ensuite le fructose-1,6-bisphosphate se dissocie en deux molécules de triose qui se trouvent en équilibre entre elles, la dihydroxyacétone-phosphate (96,5 %) et le glycéraldéhyde-3-phosphate (3,5 %). Cette étape est assurée par une aldolase. Tout au long de la glycolyse, le dihydroxyacétone-phosphate est converti en glycéraldéhyde-3-phosphate grâce à la triose phosphate isomérase. Le glycéraldéhyde-3-phosphate sera converti en acide-1,3-bisphosphoglycérique par la phosphoglycéraldéhyde déshydrogénase. A ce niveau, il y a réduction d'une molécule de  $\text{NAD}^+$  en  $\text{NADH}$ ,  $\text{H}^+$  et formation de l'acide 3-phosphoglycérique ainsi que d'une molécule d'ATP par intervention de la phosphoglycérate kinase. Puis il y a formation de l'acide 2-phosphoglycérique grâce à la phosphoglycérate mutase. Ensuite l'énolase par élimination d'une molécule d'eau, nous donne l'acide phosphoénolpyruvique qui comporte une liaison riche en énergie qui permet par réaction avec une molécule d'ADP et en présence de la pyruvate kinase la formation d'une molécule d'ATP et de l'acide pyruvique.

En parallèle à la dégradation du glucose, le fructose présent dans le moût de raisin subit une phosphorylation pour donner le fructose-6-phosphate qui va rejoindre la voie de la glycolyse.

La glycolyse amène à la formation de 4 molécules d'ATP, 2 molécules étant consommées pour la phosphorylation des sucres, il y a donc un gain de 2 molécules d'ATP par molécule de sucre métabolisé. De plus on a la formation de deux molécules de  $\text{NADH}$ ,  $\text{H}^+$  qui doivent subir une réoxydation. En aérobiose, la réoxydation du coenzyme s'opère par un transfert d'électrons catalysé

par les complexes enzymatiques de la chaîne respiratoire localisée au niveau de la membrane interne des mitochondries. En anaérobiose, cette réoxydation s'effectue au cours de la réduction du pyruvate ou de l'un de ses produits de transformation.

En aérobiose (respiration), l'acide pyruvique est oxydé en eau et en  $\text{CO}_2$  ou en précurseurs pour les réactions d'anabolisme grâce à l'activation du cycle de Krebs. En anaérobiose, le pyruvate ne peut pas être oxydé à cause du manque d'oxygène et se comporte donc comme accepteur des deux atomes d'hydrogène provenant du  $\text{NADH}_2$ . Si le pyruvate est directement réduit en acide lactique on parlera alors de fermentation homolactique et si la réduction est précédée d'une décarboxylation en éthanal (acétaldéhyde) on aura alors une fermentation alcoolique.

Toutefois, si les deux atomes d'hydrogène du  $\text{NADH}_2$  sont utilisés autrement, le pyruvate ne sera pas réduit et pourra être à l'origine d'un grand nombre de produits secondaires.

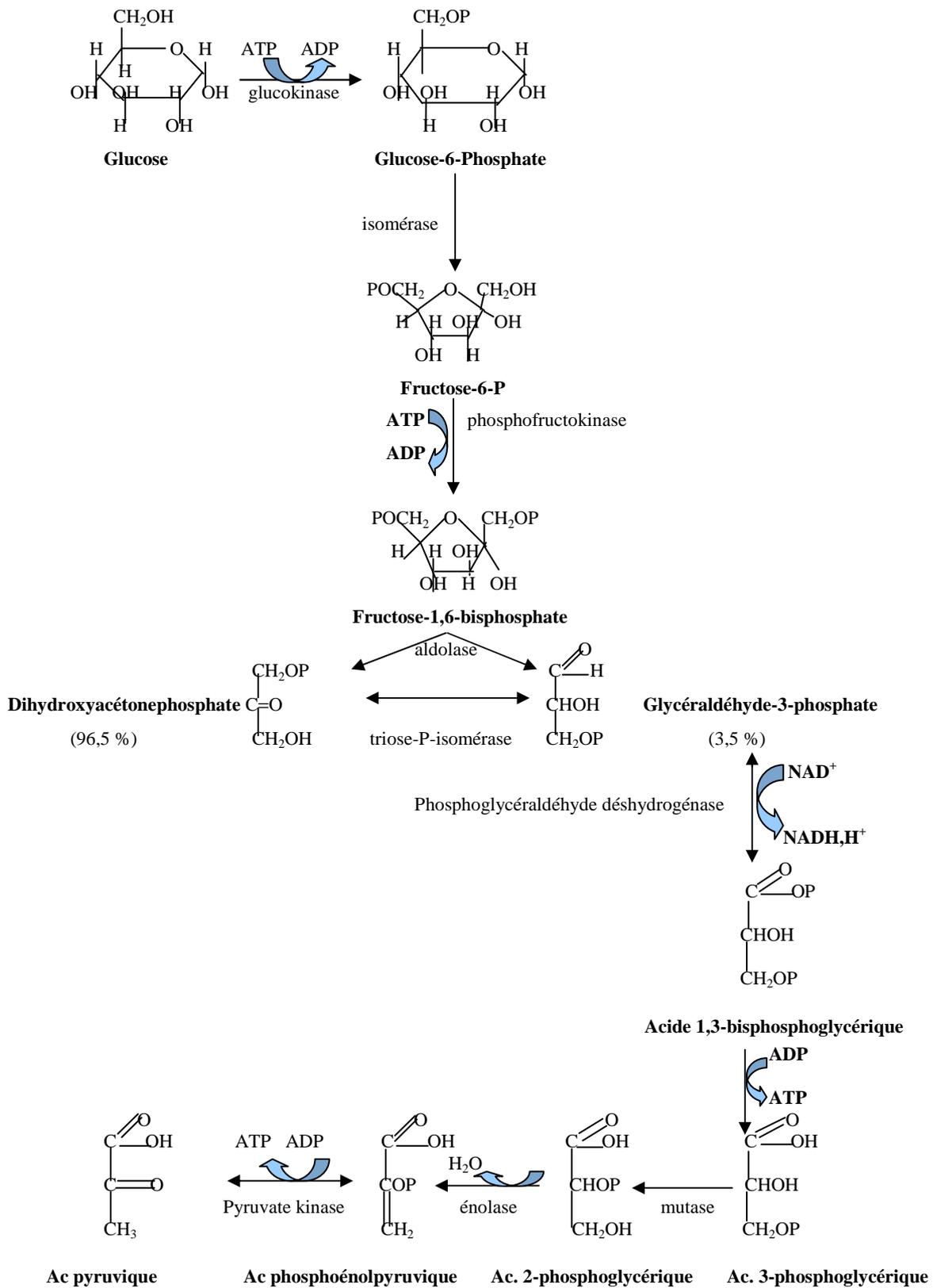
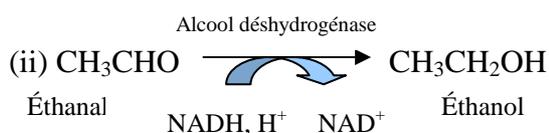
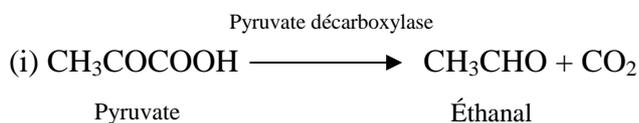


Figure I-3. Schéma de la glycolyse

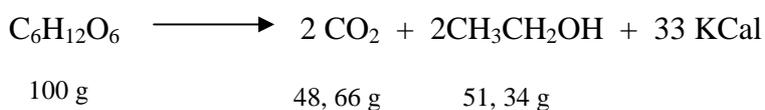
## b- La fermentation alcoolique

Dans le cas de la fermentation alcoolique, l'acide pyruvique produit à la fin de la glycolyse est décarboxylé en éthanal (acétaldéhyde) qui est réduit en éthanol grâce au NADH, H<sup>+</sup> formé au cours de l'oxydation du glyceraldéhyde-3-phosphate. Ces deux réactions sont couplées et constituent un mécanisme d'oxydoréduction.



La réaction (i) est assurée par la pyruvate décarboxylase alors que la réaction (ii) est assurée par l'alcool déshydrogénase.

La réaction suivante de Gay-Lussac résume ainsi la transformation du sucre en éthanol :



Le pyruvate est à l'origine d'une série de produits secondaires et donc la diversité des produits de fermentation vient de la diversité des réactions de transformation du pyruvate. Ces substances produites par des voies métaboliques différentes joueront un rôle très important sur la qualité du vin produit (glycérol, acétaldéhyde, acides organiques, alcools supérieurs, esters...). Parmi ces produits, nous allons présenter la voie de production du glycérol et de l'acide acétique qui ont été dosés au cours de nos expériences.

## c- La fermentation glycéropyruvique (figure I-4)

Dans des milieux fortement sulfités, l'acétaldéhyde combiné au sulfite ne peut pas être réduit en éthanol et la dégradation des sucres passe par la fermentation glycéropyruvique. Egalement, au début de la fermentation du moût de raisin, lorsque l'inoculum est constitué par des levures développées en présence d'oxygène, la pyruvate décarboxylase et l'alcool déshydrogénase sont faiblement exprimées. Par conséquent, l'accumulation de l'éthanal est limitée. L'éthanal n'est pas présent dans le milieu et le NADH<sub>2</sub> formé ne peut pas se réoxyder grâce à lui. Pour que la glycolyse

se poursuive, il faut que le  $\text{NADH}_2$  se réoxyde d'une façon différente. En fait c'est le dihydroxyacétone-phosphate qui permet cette régénération. Il va prendre l'hydrogène du  $\text{NADH}_2$  et devient glycérphosphate puis glycérol et l'acide phosphorique généré est repris par l'ADP pour former de l'ATP. Dans cette voie il y a donc compétition entre les deux accepteurs d'hydrogène, l'éthanal et le dihydroxyacétone-phosphate. Le premier est plus facilement réduit ce qui conduit à une prédominance de l'éthanol. Généralement 8 % des sucres suivent la fermentation glycéropyruvique et 92 % la fermentation alcoolique.

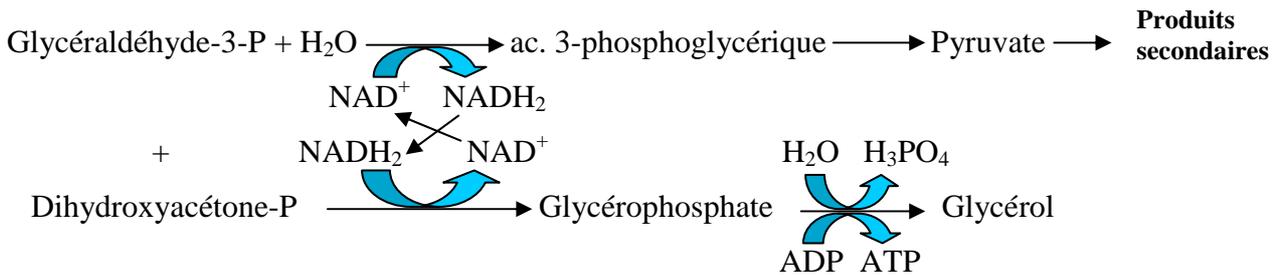


Figure I-4. Schéma de la fermentation glycéropyruvique

#### d- Formation d'acide acétique (figure I-5)

L'acide pyruvique peut conduire à la formation de l'acide acétique selon des voies différentes. La première est l'hydrolyse de l'acétyl-CoA issu de la décarboxylation oxydative de l'acide pyruvique par le complexe de la pyruvate déshydrogénase, mais cette réaction qui se déroule dans les mitochondries est limitée en anaérobiose. La deuxième est l'oxydation de l'acétaldéhyde par l'aldéhyde déshydrogénase dont le cofacteur est le  $\text{NADP}^+$  et qui est très active pendant la fermentation alcoolique. Cette voie sert à former de l'acétyl Co-A grâce à l'acétyl CoA synthétase, lorsque la pyruvate déshydrogénase est réprimée.

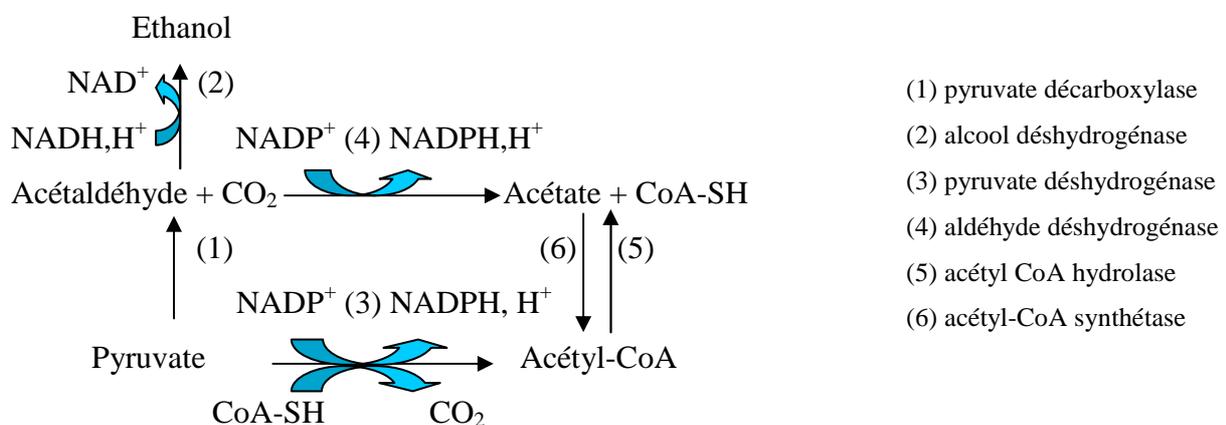


Figure I-5. Schéma de la production d'acide acétique

## I-4 Fermentation malolactique

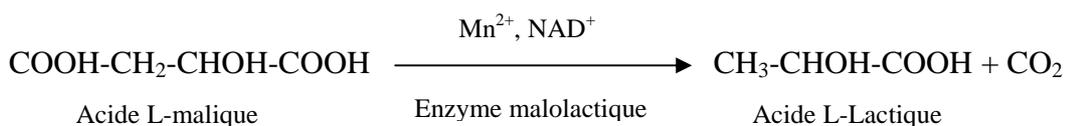
### I-4-1 But et importance de la FML

La fermentation malolactique qui consiste en une décarboxylation enzymatique de l'acide L-malique en acide L-lactique est une réaction importante réalisée par les bactéries lactiques durant la vinification de la plupart des vins rouges et de certains types de vin blanc comme le champagne et les vins blancs secs de certains cépages acides. Elle assure :

- une diminution de l'acidité afin de produire un vin plus souple et moins agressif gustativement.
- une stabilité microbiologique
- la production d'un caractère organoleptique plus complexe par formation de certaines molécules aromatiques ex : lactate d'éthyle, diacétyl, acétoïne, 2,3-butanediol.

La stabilité microbiologique n'est bien évidemment pas absolue car certains micro-organismes peuvent se développer même après la FML. Bien que l'acide malique soit transformé en acide lactique plus stable et que des nutriments aient été consommés, il reste encore des substances nutritives pour supporter une croissance de bactéries ou de levures de contamination comme les bactéries acétiques et les levures appartenant au genre *Brettanomyces*.

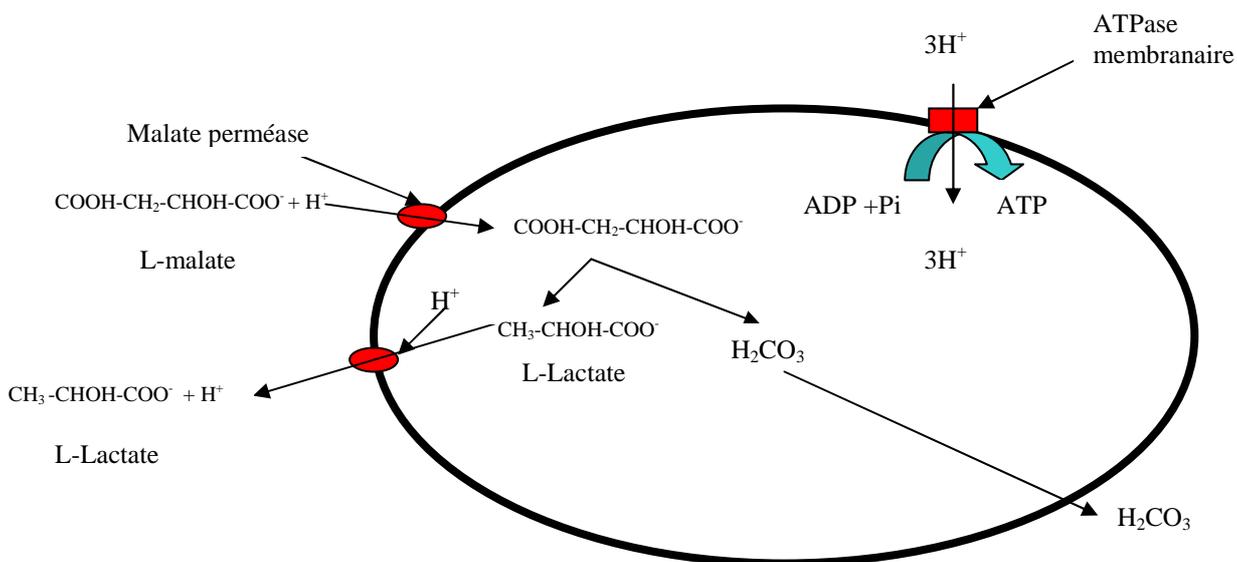
Pendant la FML, les bactéries lactiques utilisent l'enzyme malolactique pour transformer l'acide L-malique en acide L-lactique. La réaction est catalysée en présence d'ions manganèse ( $Mn^{2+}$ ) et de  $NAD^+$  comme cofacteurs. En effet, l'enzyme est constitué de deux ou quatre sous-unités de poids moléculaire équivalent (60000 Da). Le  $NAD^+$  pourrait être impliqué dans l'association des deux sous-unités, rendant active la conformation de l'enzyme (Strasser de Saad, 1983). La dégradation de l'acide malique ne commence que lorsque la population de bactéries lactiques atteint la valeur de  $10^6$  cellules/mL, suggérant que l'enzyme malolactique n'est pas exprimé en début de phase de croissance (Wibowo *et al.* 1985). Le transport de l'acide L-malique dans la cellule se fait à l'aide d'un transporteur membranaire, la malate perméase, car à  $pH = 3,5$ , la forme prédominante de l'acide malique est la forme ionique ( $pK_A=3,4$ ). 43% uniquement se trouvent sous la forme moléculaire, non-dissociée, capable d'entrer dans la cellule par simple diffusion (Bony *et al.* 1997).



Les bactéries sont capables de se développer dans une gamme de pH assez large. Elles doivent maintenir un pH intracellulaire ( $pH_i$ ) ainsi qu'un gradient électrochimique ( $\Delta p$ ) convenable. Ces deux systèmes, liés à la membrane font partie de ce qu'on appelle la force protomotrice. La

membrane joue un rôle très important ; d'un côté elle s'oppose à la libre diffusion de constituants entre le milieu extracellulaire et le cytoplasme assurant le rôle d'une barrière semi-perméable et d'un autre côté c'est le lieu d'échange d'électrons et de protons. La capacité des bactéries à tolérer des pH faibles dépend apparemment de leur capacité à maintenir un pH intracellulaire ( $\text{pH}_i$ ) convenable. Le pH du vin est à la limite basse de la gamme tolérable par les bactéries lactiques. La croissance s'arrête quand le  $\text{pH}_i$  tombe au-dessous d'une valeur limite. Cette valeur varie beaucoup avec les différentes espèces et souches de bactéries lactiques. Le  $\text{pH}_i$  limite ne dépend pas seulement du pH externe du milieu mais aussi de l'acide organique impliqué (Mc Donald *et al.* 1990) et du pH et de la composition du milieu de la préculture. *O. oeni* est capable de maintenir un  $\text{pH}_i$  plus haut que d'autres bactéries lactiques comme par exemple *L. plantarum* à des pH externes bas (3,5) (Henick-Kling, 1986). Elle est également capable de maintenir un  $\text{pH}_i$  et un  $\Delta p$  plus hauts à pH externe bas (3,5) qu'à pH externe haut (5,5). Ceci peut être la raison pour laquelle *O. oeni* se développe mieux que les Pédicoques et les Lactobacilles à pH bas.

Il est difficile de comprendre l'avantage physiologique de la FML. Pendant longtemps le seul avantage constaté était l'augmentation du pH du milieu ce qui favorise la croissance. Pilonne et Kunkee (1976) ont montré que pendant la FML par *O. oeni* la vitesse de croissance à pH bas était augmentée indépendamment du changement du pH du milieu. Sur la base d'études du pH intracellulaire ( $\text{pH}_i$ ) et du gradient électrochimique  $\Delta p$ , Henick-Kling (1986) a proposé que la FML présente un avantage énergétique à cause d'un  $\text{pH}_i$  et  $\Delta p$  augmentés. Il a également montré que pendant la FML il y a production d'ATP lié au gradient électrochimique ( $\Delta p$ ) à travers l'ATPase de la membrane cellulaire (figure I-6).



**Figure I-6. Modèle de génération d'ATP par la transformation de l'acide malique en acide lactique (Henick-Kling *et al.* 1991).**

Le même mécanisme est utilisé par toutes les bactéries qui possèdent l'enzyme malolactique (Cox et Henick-Kling, 1990). L'entrée du malate dans la cellule qui ensuite est décarboxylé en lactate et en CO<sub>2</sub> augmente le pH interne ce qui impose un influx de protons du milieu extérieur vers la cellule. L'entrée du malate et la sortie du lactate aident à la création d'une force protomotrice permettant la synthèse d'ATP par l'ATPase membranaire (Poolman, 1993). La synthèse de chaque molécule d'ATP nécessite l'entrée de 3 ions H<sup>+</sup>. Notons que la sortie du L-lactate et des ions H<sup>+</sup> se fait par un symport. Ce système ne fournit pas de carbone pour la croissance, il faut donc que des sucres soient utilisés comme source de carbone. Pour les bactéries lactiques du vin, l'acide malique est apparemment préféré comme source d'énergie à pH bas et au début de la croissance (Drichi-Cachon, 1995). Contrairement à l'inhibition du catabolisme du sucre due très probablement à une diminution de l'activité de la phosphofructokinase (Krebs *et al.* 1983), l'utilisation du malate est maximale à pH bas (<4,5). De plus la quantité d'ATP produite à cause de l'utilisation du malate est deux fois plus grande à pH=3,5 qu'à pH=5,5 qui est le pH optimal du catabolisme du sucre et de la croissance (Cox et Henick-Kling, 1989).

#### I-4-2 ATPase membranaire d'*O. oeni*

Guzzo *et al.* (2000) et Carreté *et al.* (2002) ont proposé l'existence chez *O. oeni* de deux types d'ATPase membranaire ; une H<sup>+</sup>-F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase et une K<sup>+</sup>-ATPase qu'on peut distinguer par leur différente sensibilité aux inhibiteurs. En effet, la H<sup>+</sup>-F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase est sensible au DCCD (*N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide) et est responsable de 80 % de l'activité ATPasique alors que la K<sup>+</sup>-ATPase est sensible au vanadate et est responsable de 20% de l'activité enzymatique (Guzzo *et al.* 2000).

Les H<sup>+</sup>-ATPases bactériennes décrites ont une masse moléculaire de 300000 à 500000 Da. Elles sont constituées de deux parties appelées F<sub>0</sub> et F<sub>1</sub> d'où leur nom de F<sub>0</sub>, F<sub>1</sub>-ATPases. La partie F<sub>0</sub> est une protéine intrinsèque de trois sous-unités a, b et c. Elle traverse la membrane créant ainsi un canal à protons. La partie F<sub>1</sub> est une protéine périphérique constituée de cinq sous-unités α<sub>3</sub>β<sub>3</sub>γδé. Elle porte l'activité catalytique de synthèse et d'hydrolyse de l'ATP (Abrams et Smith, 1974).

La H<sup>+</sup>-ATPase joue un rôle essentiel dans la régulation et le maintien du pH intracellulaire. Le rôle crucial de cette protéine dans la tolérance d'*O. oeni* à l'acidité a été proposé par Tourdot-Maréchal *et al.* (1999) ainsi que Guzzo *et al.* (2002) qui ont mis en évidence cette propriété en montrant qu'un mutant d'*O. oeni* déficient en H<sup>+</sup>-ATPase était incapable de survivre dans un milieu acide. L'extrusion des ions H<sup>+</sup> de la cellule par hydrolyse de l'ATP grâce à la H<sup>+</sup>-ATPase est donc vitale pour maintenir la force protomotrice et pour régler le pH intracellulaire dans un milieu acide comme le vin. Cependant, d'autres ATPases couplées à un transport cationique comme la K<sup>+</sup>-

ATPase, pourraient participer aussi à ce mécanisme homéostatique (Kroll et Booth, 1983). Galland *et al.* (2003) ont également montré que des mutants d'*O. oeni* déficients en H<sup>+</sup>-ATPase étaient incapables de consommer l'acide malique même à des pH élevés (5,3) à cause d'une absence d'expression du système malolactique (gènes codant pour l'enzyme malolactique et la malate perméase). Il semble que la régulation de l'expression de l'opéron malolactique chez *O. oeni* implique des facteurs régulateurs dépendant de la présence d'ATP.

Carreté *et al.* (2002) ont montré aussi que l'activité de l'ATPase est corrélée à la croissance cellulaire puisqu'elle augmente considérablement durant la phase exponentielle de croissance pour atteindre une valeur maximale à la fin de cette phase puis elle diminue pendant la phase stationnaire. Ils ont aussi montré que l'ion Mg<sup>2+</sup> est un cofacteur important de l'activité enzymatique de cette protéine puisque son absence la réduit de 85%. Notons que le DCCD inhibe la H<sup>+</sup>-ATPase en la privant des ions Mg<sup>2+</sup>.

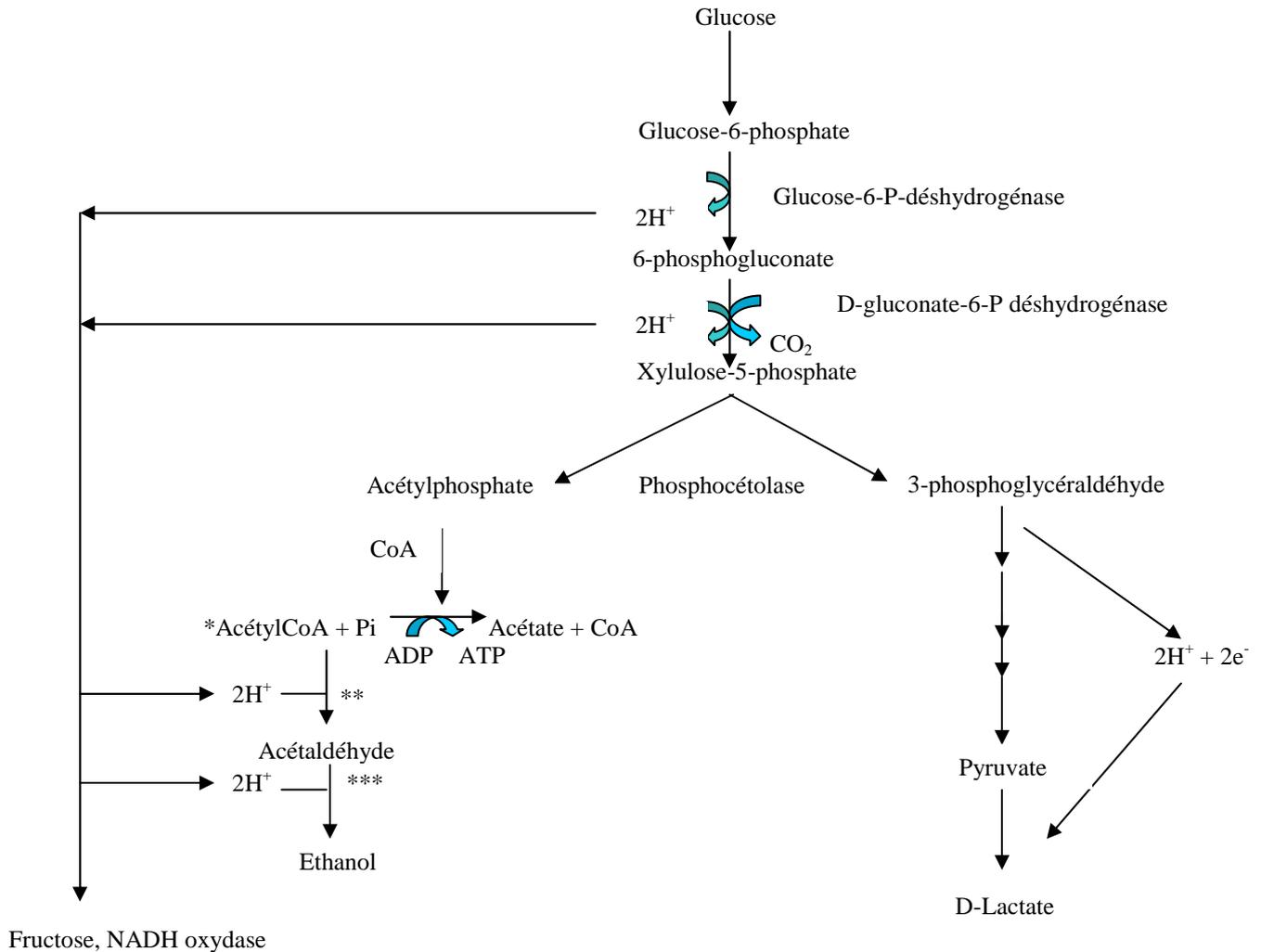
#### **I-4-3 Métabolisme des sucres chez *O. oeni***

*O. oeni* est une bactérie hétérofermentaire facultative qui peut cataboliser les hexoses suivant la voie classique de la glycolyse ou bien suivant la voie hétérofermentaire des pentoses-phosphates suivant les conditions du milieu. Dans le premier cas le métabolisme des hexoses entraîne la formation de D-Lactate et dans le deuxième cas, on obtient en plus du D-lactate (produit majoritaire), de l'éthanol, de l'acétate et du CO<sub>2</sub> (cf figure I-7). Par ailleurs, les pentoses sont toujours catabolisés suivant la voie des pentoses-phosphates.

Généralement *O. oeni* se développe lentement sur glucose, mais plus vite sur glucose et malate ou glucose et fructose (Krieger *et al.* 1992). L'hétérofermentation du glucose par la voie des pentoses-phosphates entraîne après décarboxylation du sucre, la formation intermédiaire d'un pentose phosphate (xylulose-5-P) qui est scindé par la phosphocétolase. On aboutit d'une part au glycéraldéhyde-3-phosphate, conduisant au pyruvate et au lactate, et d'autre part à l'acétyl phosphate, conduisant à l'éthanol via l'acétaldéhyde déshydrogénase et l'éthanol déshydrogénase. En présence d'un accepteur des coenzymes réduits (oxygène ou fructose), la liaison ester phosphorique de l'acétyl phosphate est préservée et celui-ci est transformé en acétate et ATP par l'acétate kinase (cf figure I-7). La réduction du fructose en mannitol ou de l'oxygène en eau régénère les molécules de coenzyme nécessaires pour l'oxydation du glucose.

Pendant la FML, les bactéries lactiques ont besoin d'une source de carbone pour la croissance et de l'énergie pour la maintenance cellulaire. Selon Radler (1963), les bactéries lactiques utilisent 0,3 à 2 g/L de sucre pour leur croissance et la FML dans le vin et produisent 40 à 110 mg/L de biomasse. Selon ses calculs, la production de 40 mg/L de biomasse nécessite le métabolisme de 0,72 g/L de

glucose. Vu les petites quantités nécessaires pour la croissance des bactéries lactiques, les sucres ne sont pas un facteur limitant. Par contre, leur consommation peut être à l'origine d'une augmentation de l'acide acétique toujours redoutée en œnologie.



\* : acétate kinase

\*\* : acétaldéhyde DH

\*\*\* : éthanol DH

**Figure I-7. Schéma de la fermentation du glucose par les bactéries hétérofermentaires selon la voie des pentoses-phosphates (Cavin *et al.* 1998)**

#### I-4-4 Besoins nutritionnels d'*O. oeni*

Les sources d'azote les plus importantes pour la croissance des bactéries lactiques sont les acides aminés libres et les petits peptides. Plusieurs acides aminés sont nécessaires à la croissance, la plupart sont soit essentiels soit des stimulateurs (Weiller et Radler 1972). Les demandes en acides aminés dépendent des différentes souches d'*O. oeni*. D'une manière générale, il a été montré que l'acide glutamique est un acide aminé essentiel pour différentes souches d'*O. oeni* car ces bactéries lactiques étaient incapables de le synthétiser (Remize *et al.* 2006, Morishita *et al.* 1981, Loubière *et al.* 1996, Hebert *et al.* 2000). Par contre l'absence de la proline, la glycine et l'alanine affectent faiblement la croissance (Garvie, 1967 et Fourcassie *et al.* 1992). La valine, la leucine, le tryptophane, l'isoleucine, l'histidine, la lysine et l'arginine ne sont pas des acides aminés essentiels mais leur présence améliore considérablement la croissance (Remize *et al.* 2006). D'un point de vue quantitatif, les besoins en acides aminés d'*O. oeni* sont faibles. Remize *et al.* (2006) ont montré que de très faibles quantités d'azote provenant d'acides aminés essentiels aussi faibles que 0,7 mg d'azote/L dans le cas de la tyrosine étaient suffisantes pour assurer une bonne croissance cellulaire. Les acides aminés à chaîne hydrophobe diffusent passivement dans la cellule alors que les molécules polaires sont transportées par 3 types de transport membranaire (Konings *et al.* 1994).

En plus des acides aminés libres, des oligopeptides de 0,5 à 10 KDa peuvent aussi être consommés par *O. oeni* et stimuler sa croissance. Ces peptides sont transportés dans la cellule où ils sont par la suite hydrolysés (Lemarque *et al.* 2004, Remize *et al.* 2006).

Les bactéries ont également besoin pour leur croissance d'un certain nombre de substances comme les bases puriques et pyrimidiques, les vitamines, les acides gras ou les esters d'acides gras et les cations ( $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$ ) comme cofacteurs enzymatiques. Les *Leuconostoc* et *O. oeni* ont besoin d'acide nicotinique, de thiamine, de biotine et de l'acide pantothénique et de son dérivé 4'-*O*-( $\beta$ -D-glucopyranosyl)-D-*R*-pantothénique (Garvie 1986). Plus spécialement, *O. oeni* a besoin de la guanine, de l'adénine, de la xanthine et de l'uracil.

Le phosphore est également important car il joue un rôle essentiel dans la constitution des acides nucléiques, des phospholipides et dans le stockage d'énergie sous forme d'ATP.

## I-5 Facteurs influençant la FML

En vinification en rouge et pour certains types de vins blancs la FML est nécessaire. La réussite de la FML constitue un facteur principal déterminant la qualité du vin et le coût de sa production. Les pratiques traditionnelles reposent sur la croissance naturelle de la microflore malolactique ce qui entraîne une induction spontanée de la FML après la fermentation alcoolique (FA). Cependant les conditions physico-chimiques stressantes du vin après la FA comme le faible pH, la concentration élevée en éthanol, la présence d'anhydride sulfureux et le déficit en nutriments constituent un obstacle à la croissance de ces bactéries et à la réalisation de la FML. Pour toutes ces raisons, on utilise actuellement des souches malolactiques sélectionnées pour supporter ces conditions difficiles mais ceci ne garantit pas toujours le succès de la FML et parfois la contamination du vin par des micro-organismes nocifs comme les bactéries acétiques ou les levures du genre *Brettanomyces* peut se produire. En effet, quand la FML est désirée, les vins ne sont pas protégés à la fin de la FA par du SO<sub>2</sub> et donc un retard de la FML ou son échec favorisent le développement de micro-organismes indésirables.

On s'intéresse beaucoup actuellement à l'étude des interactions entre les souches de levures utilisées pour réaliser la FA et les souches de bactéries responsables de la FML. Ces interactions sont dues à des métabolites levuriens et peuvent se traduire soit par une inhibition, soit par une stimulation ou bien par une neutralité. En effet le type et l'importance de l'interaction dépendent de plusieurs facteurs incluant la nature du couple levure/bactérie impliqué, la prise et le relargage des nutriments dans le milieu par la levure et la capacité de la levure à produire des métabolites qui peuvent être soit stimulants soit toxiques pour la bactérie. La complexité de ces interactions réside (i) dans l'existence de certaines souches de levure qui exercent en même temps des réactions stimulatrices et inhibitrices envers la même bactérie, (ii) la composition du moût et les pratiques de vinification qui ont aussi une influence sur la nature de l'interaction, (iii) la présence de certaines bactéries inhibitrices pour les levures et (iiii) la co-existence de plusieurs populations microbiennes dans le milieu. Les principaux facteurs influençant la croissance et la survie des bactéries sont regroupés dans le tableau I-1 :

**Tableau I-1. Facteurs influençant la croissance et la survie des bactéries**

Facteurs physico-chimiques	<ul style="list-style-type: none"> <li>- pH</li> <li>- Température °C</li> <li>- Facteurs associés à la vinification (pratique de cave, sulfitage, macération, débourbage, élevage sur lies, etc.....)</li> </ul>
Composition du vin	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ethanol</li> <li>- Acides gras</li> <li>- Sucres et polyols</li> <li>- Acides organiques</li> <li>- Composés phénoliques</li> <li>- Composés azotés</li> <li>- Facteurs de croissance : les vitamines et les oligoéléments.</li> <li>- Gaz (O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>)</li> <li>- Fongicides, pesticides</li> </ul>
Facteurs biologiques	Interactions avec : <ul style="list-style-type: none"> <li>- les levures</li> <li>- les bactéries</li> <li>- les bactériophages</li> </ul>

**I-5-1 Les activateurs de la FML**✓ **Les pratiques de cave****a- Débourbage****a-1 Définition**

Les moûts issus de raisins pressés pour la vinification en jus clair des vins blancs, rosés et claires, sont chargés de bourbes constituées de résidus de traitements phytosanitaires, de débris solides de pulpe, de particules terreuses, de levures, de bactéries et de colloïdes plus ou moins floclés. Le débouillage est l'opération qui consiste à éliminer ces bourbes par sédimentation naturelle ou par centrifugation avant l'encuvage et le début de la fermentation.

**a-2 Incidence du débouillage sur la FML**

Le moût débouillé est appauvri en lipides et en polysides neutres (colloïdes) (Olivier *et al.* 1987, Alexandre *et al.* 1994). Ces modifications de la composition du moût affectent la cinétique fermentaire des levures. Généralement, la population levurienne est plus faible dans un moût

débourbé que dans un moût non débourbé et la fermentation alcoolique plus longue (Edwards *et al.* 1990). Ceci peut être dû à la formation dans les moûts débourbés d'acides gras à chaîne moyenne toxiques pour les levures (Edwards *et al.* 1990, Alexandre *et al.* 1994). Par conséquent, la concentration en composés inhibiteurs des bactéries, synthétisés par les levures sera aussi plus faible ce qui va favoriser la FML.

De plus, la libération de colloïdes par les levures au cours de la FA, et plus précisément de glucanes et de mannoprotéines d'origine pariétale, est d'autant plus importante que le débourbage du moût est plus poussé (Guilloux-Benatier *et al.* 1995). Or la richesse en colloïdes d'un vin influence positivement le déroulement de la FML (Guilloux-Benatier et Feuillat, 1993). Les macromolécules de levure stimulent la croissance d'*O. oeni*. En fait la phase de latence est raccourcie et la biomasse bactérienne finale formée est plus importante.

Les macromolécules de levure agirait sur la FML de deux façons :

- 1- détoxification du milieu par adsorption des acides gras inhibiteurs des bactéries lactiques.
- 2- rôle nutritionnel car *O. oeni* possède le matériel enzymatique nécessaire à la dégradation des macromolécules ( $\beta$ -glucosidase,  $\alpha$ -glucosidase, N-acétyl-glucosaminidase, glucanases et aminopeptidases). Les produits d'hydrolyse vont enrichir le milieu en nutriments.

Par contre les travaux de Liu et Gallander (1982) sont en contradiction avec ceux cités ci-dessus. Ils montrent que la FML, après inoculation à la fin de la FA, est plus rapide dans un vin issu d'un moût non débourbé. La plus grande production de SO<sub>2</sub> par les levures dans le moût débourbé expliquerait la différence de cinétique fermentaire des bactéries.

## **b-Macération pelliculaire**

### **b-1 Définition**

La macération pelliculaire est une technique utilisée en vinification en blanc avec des raisins sains et surtout les années de bonne maturité. On favorise la dissolution dans le moût des substances odorantes contenues dans la pellicule et sous-exploitées par pressurage immédiat. Après léger foulage des raisins sains, bien mûrs, sans débris végétaux (éraflés) et un léger sulfitage, on laisse macérer plusieurs heures avant pressurage. Habituellement, la macération est conduite à température ambiante pendant 10 à 24 h souvent une nuit. Le refroidissement par apport de neige ou de glace carbonique assure en même temps une protection contre l'oxydation.

## **b-2 Incidence de la macération pelliculaire sur la FML**

Le contact entre jus et pellicule modifie la composition future du moût. Après macération pelliculaire, le moût a un pH plus élevé, une acidité plus faible liée à une extraction de potassium plus importante. Le jus est également enrichi en acides aminés, en colloïdes et également en lipides (Sapis, 1995). Les modifications apportées entraînent une meilleure FA due surtout à une très forte viabilité des levures en fin de FA. La production de macromolécules par les levures est également augmentée. Tout ceci favorise la croissance bactérienne et donc la FML (Guilloux *et al.* 1998).

## **c-Elevage sur lies**

### **c-1 Définition**

L'élevage des vins sur lies de levures est une méthode traditionnelle appliquée à certains vins blancs dont les grands vins de Bourgogne, Muscadet et Champagne. Il tend aujourd'hui à se développer vers d'autres régions de production, et d'autres types de vins (rosés et rouges). Traditionnellement pratiqué en barrique, l'élevage sur lies peut également être réalisé en foudre ou en cuve. Le bâtonnage est une technique associée à l'élevage sur lies. Il permet d'en optimiser les effets. Il consiste à remettre périodiquement les lies en suspension dans la masse du vin, par une agitation mécanique. L'élevage sur lies permet de protéger le vin de l'oxydation grâce au pouvoir réducteur des lies. D'un point de vue organoleptique, l'élevage sur lies apporterait plus de complexité aromatique et plus de gras au vin. Ces différentes propriétés sont liées à la libération par les levures de composés azotés, de lipides, de vitamines, de glucanes et de mannoprotéines au cours du phénomène d'autolyse. Ce phénomène se caractérise par l'hydrolyse de biopolymères après la mort de la cellule (Fornairon-Bonnefond *et al.* 2001).

### **c-2 Incidence de l'élevage sur lies**

Le vieillissement sur lies de levures favorise la FML. Une des causes est l'enrichissement du milieu notamment en différentes fractions azotées (Sato *et al.* 1997, Alexandre *et al.* 2001). Cet enrichissement est dépendant de la capacité autolytique des levures. Certaines levures de part leur activité protéasique ont la capacité d'enrichir le milieu plus que d'autres (Martinez-Rodriguez *et al.* 2001). La levure excrète principalement des acides aminés et des peptides. L'enrichissement en azote d'un vin élevé sur ses lies peut être supérieur à 100 mg/L.

Une autre caractéristique de l'autolyse est l'enrichissement du milieu en glucanes et mannoprotéines (Charpentier et Feuillat, 1993). Là encore la nature de la souche conditionne la quantité de macromolécules libérées (Rosi *et al.* 1998) et il existe une corrélation positive entre la teneur en macromolécules du milieu et la FML comme déjà expliqué dans le paragraphe a-2.

En plus il a été montré qu'*O. oeni* est capable d'hydrolyser les parois de levure (Guilloux-Benatier *et al.* 2000). La bactérie sécrète des glucanases (Grimaldi *et al.* 2000) et des protéases (Farias et Manca de Nadra, 2000). La production de ces dernières protéases apparaît stimulée en conditions de stress et de limitations nutritionnelles (Farias *et al.* 1996, Rollan *et al.* 1998).

Constitutifs de la membrane cellulaire des levures, les lipides sont libérés rapidement au cours de l'autolyse. Des acides gras libres, des mono, di et triglycérides, des stérols libres ou estérifiés ont été caractérisés dans les produits de l'autolyse. Les acides nucléiques de la levure (acide ribonucléique ou ARN, et acide désoxyribonucléique ou ADN) sont hydrolysés après la mort de la cellule. Libérés dans le vin, ils l'enrichissent en nucléotides. Toutes ces molécules vont stimuler la FML.

Récemment, Patynowski *et al.* (2002) ont montré que, suivant la souche de levure utilisée, l'élevage sur lies peut conduire à une stimulation de la FML ou à son inhibition. Ce dernier point rapporté pour la première fois dans la littérature montre que l'autolyse des levures peut enrichir le milieu en facteurs de croissance stimulant la FML mais aussi en composés toxiques inhibant la FML.

Compte-tenu des propriétés liées à l'autolyse, un certain nombre d'adjuvants œnologiques mimant les lies de levures ont été développés. Parmi ces adjuvants, les autolysats de levures sont utilisés afin d'activer les FA. Ils favorisent la croissance et la viabilité de *S. cerevisiae* mais aussi d'*O. oeni*. Les écorces de levures sont le plus souvent utilisées pour détoxifier le milieu. En effet, elles ont la capacité d'adsorber les acides gras à chaîne moyenne comme l'acide décanoïque (Edwards et Beelman, 1987), la FA et la FML s'en trouvent alors facilitées.

#### ✓ Effet du CO<sub>2</sub>

La plupart des chercheurs constatent une influence favorable du CO<sub>2</sub> sur la croissance des bactéries lactiques (Mayer, 1974). D'après eux, il va contribuer à la production d'oxaloacétate par carboxylation du pyruvate (voie anaplérotique). Cela pourrait à la fois aider à maintenir un équilibre redox favorable et favoriser la synthèse d'acides aminés. Dans d'autres études, le CO<sub>2</sub> n'est pas un facteur stimulant ce qui fait que l'influence du CO<sub>2</sub> reste controversée (van der Westhuizen *et al.* 1981).

## I-5-2 Les inhibiteurs de la FML

Certains paramètres qui contrôlent la croissance bactérienne dans le vin sont connus depuis longtemps. Il s'agit du pH, de la température, de la teneur en anhydride sulfureux, du titre alcoométrique, de la présence de certaines molécules levuriennes inhibitrices et la composition en nutriments. La température et le SO<sub>2</sub> peuvent être en partie maîtrisés. La présence d'*O. oeni* comme souche prédominante en fin de fermentation alcoolique et pendant la fermentation malolactique est le résultat de la pression sélective de ces facteurs. L'effet du degré alcoolique est plus faible que celui du pH, lui même beaucoup plus faible que celui de la température.

Parmi les facteurs inhibiteurs déjà cités, certains seront détaillés dans ce qui suit :

### ✓ L'éthanol

L'action de l'éthanol est un facteur qu'on ne peut pas contrôler. L'éthanol produit par les levures durant la FA affecte plutôt la croissance des bactéries que la FML. En fait, d'après Capucho et San Romão (1994), 8 % d'éthanol (v/v) peuvent fortement inhiber la croissance des bactéries par contre l'acide malique continue à être dégradé à un taux de 90 %. Cette remarque rejoint l'hypothèse de Manca de Nadra et Strasser de Saad (1987, 1990) qui montrent qu'il n'y a pas de corrélation directe entre l'activité malolactique et la croissance bactérienne. De plus, l'effet inhibiteur de l'éthanol sur la croissance semble être accentué en présence de SO<sub>2</sub> alors que le SO<sub>2</sub> seul est peu actif. La tolérance à l'éthanol dépend de la température, du pH et de la composition azotée du milieu (Britz et Tracey, 1990). Ingram *et al.* (1984) et Rosa *et al.* (1992) expliquent que l'inhibition par l'éthanol est due à l'incorporation de cette petite molécule polaire à l'interface lipido-aqueuse de la membrane plasmique ce qui va augmenter la polarité de cette zone laissant passer d'autres molécules polaires, la barrière semi-perméable que constituait ainsi la membrane est rompue. En effet ceci peut entraîner une augmentation de l'entrée des ions H<sup>+</sup> dans la cellule et une perte simultanée de certains composés du matériel intracellulaire (Da Silveira *et al.* 2002). De plus l'éthanol va affecter les interactions hydrophobes entre les chaînes hydrocarbonées des phospholipides membranaires et entre les protéines intrinsèques. Le positionnement des protéines membranaires sera affectée et par conséquent leur activité, entre autres l'activité enzymatique de l'ATPase membranaire.

L'inhibition par l'éthanol de la croissance d'*O. oeni* peut paraître surprenante puisque dans les vins la croissance des bactéries commence généralement à la fin de la FA lorsqu'ils contiennent 10 à 12 % d'éthanol. Il a été montré par plusieurs auteurs qu'*O. oeni* a besoin d'une phase d'adaptation à

l'éthanol pour croître dans les conditions de vinification. Il est d'ailleurs recommandé lors de l'emploi d'un levain malolactique, de préparer celui-ci en le mélangeant avec le vin à traiter pour habituer les bactéries au milieu (Peynaud 1984, Gerbeaux, 1998). En effet, les cellules d'*O. oeni* adaptées à l'éthanol sont capables de répondre à l'effet fluidisant de ce dernier en augmentant l'ordre des lipides au niveau de l'interface lipido-aqueuse et en diminuant la perméabilité. Il a été montré que les bactéries possèdent un mécanisme d'adaptation qui permet de compenser l'effet de l'accumulation de substances toxiques amphiphiles dans leur membrane (Weber *et al.* 1996). Ces mécanismes impliquent la synthèse de protéines de stress (small heat shock proteins) comme la protéine Lo18 (Jobin *et al.* 1997, Mantis *et al.* 1992, Coucheney *et al.* 2005). Tsvetkova *et al.* (2002) et Coucheney *et al.* (2005) ont montré que ces protéines interagissent avec la bicouche lipidique et la stabilise. Un autre mécanisme impliquant des protéines et des composés cytoplasmiques indépendants des protéines de stress participent également à cette stabilisation. En effet l'éthanol va induire une augmentation de l'affinité de ces molécules cytoplasmiques à la membrane en augmentant leur hydrophobicité ce qui va leur permettre d'intervenir à ce niveau (Graca Da Silveira *et al.* 2003). Notons que récemment des levains de bactéries lactiques à ensemencement direct ont été mis au point.

### ✓ La température

La température et l'éthanol influencent la durée de la phase de latence et la vitesse de croissance et agissent de façon synergique. La température est l'un des paramètres que l'on parvient à maîtriser le mieux. A de faibles concentrations en éthanol, entre 0 et 4 % (v/v), l'optimum de croissance se situe à 30°C pour les souches sélectionnées. Les températures élevées diminuent la tolérance des bactéries à l'éthanol. En fait à des concentrations en éthanol élevées, une température supérieure à 25°C peut complètement inhiber la croissance. La température optimale pour la FML en présence d'éthanol entre 10 et 14 % (v/v) est de l'ordre de 20 à 25 °C (Asmundson et Kelly, 1990). L'optimum de température pour la dégradation de l'acide malique est entre 30 et 35°C alors que l'optimum pour la croissance se situe entre 20 et 25°C. Pour obtenir une bonne dégradation du malate et une bonne croissance, il est conseillé de maintenir la température des vins à une valeur proche de 20°C. La température a un effet sur la membrane cellulaire d'*O. oeni* proche de celui provoqué par l'éthanol. Des températures élevées vont perturber l'agencement des molécules lipidiques et entraîner une dénaturation des protéines membranaires comme l'ATPase membranaire. Un choc thermique va induire comme pour l'éthanol la synthèse de protéines de stress comme la Lo18 qui va jouer un rôle dans le maintien de l'intégrité membranaire des cellules. Coucheney *et al.* (2002) ont montré que la protéine Lo18 a un effet rigidifiant et qu'elle agit directement sur les

phospholipides membranaires. Cette rigidification peut être expliquée par l'intervention sur l'isomérisation cis-trans des acides gras insaturés. Une configuration trans stabilise les chaînes d'acides gras et les dispose d'une manière parallèle et ordonnée (Chu-Ky *et al.* 2005).

Des températures inférieures à 20°C ralentissent ou empêchent le processus. Le froid n'élimine pas les bactéries viables mais empêche leur croissance et leur activité métabolique et retarde donc considérablement la FML. En effet le froid entraîne une rigidification de la membrane en augmentant la configuration trans au niveau des insaturations des acides gras (Chu-Ky *et al.* 2005). De ce fait les échanges membranaires deviennent difficiles. Le plus souvent, la diminution de la température du vin en cours de la fermentation malolactique même jusqu'à 15°C, n'arrête pas la dégradation de l'acide malique. Il importe en réalité que le niveau de population nécessaire ait été préalablement atteint (Asmundson et Kelly, 1990).

La température joue également un rôle en ce qui concerne la sensibilité des bactéries vis-à-vis du SO<sub>2</sub> (Lafon-Lafourcade, 1981).

### ✓ Le pH

Le pH est un facteur primordial qui exerce une pression sélective en faveur des bactéries les plus résistantes aux pH bas comme *O. oeni*. A des pH supérieurs à 3,5 on trouve souvent des populations bactériennes plus importantes et plus diverses. Tout au long de l'élaboration du vin, le pH agit à plusieurs niveaux : il participe à la sélection des espèces selon leur acido-résistance, il oriente leur métabolisme et détermine surtout leur vitesse de multiplication. Généralement, dans les vins à pH élevé (supérieur à 3,5), les *Lactobacilles* et les *Pédiocoques* sont les plus abondants alors que les vins plus acides favorisent la présence d'*O. oeni*. Le pH optimum de croissance est, en milieu de laboratoire, de l'ordre de 4,8. Au-dessous de cette valeur, la croissance est d'autant plus lente que le pH est plus faible. Dans le vin, le pH limite est de l'ordre de 3. Mais cette limite dépend des autres caractéristiques du milieu, comme par exemple du titre alcoométrique du vin. Si les autres facteurs sont favorables, alors la limite est abaissée et inversement. La phase de latence est prolongée et la croissance est ralentie lorsque le pH est faible. Au contraire, si le pH est très favorable, la phase de latence passe inaperçue. Comme déjà cité dans le paragraphe I-4-2, la H<sup>+</sup>-ATPase membranaire joue un rôle très important dans le maintien du pH intracellulaire dans un milieu acide comme le vin. Fortier *et al.* (2003) ont montré que l'activité enzymatique de la H<sup>+</sup>-ATPase augmente à de faibles pH. Elle est 1,6 fois plus élevée à pH 3,5 qu'à pH 5,5. Cette augmentation est corrélée à une augmentation de l'expression du gène *atp* codant pour cet enzyme. Plus le pH est faible et plus l'induction de ce gène est importante et plus l'activité ATPasique est élevée.

Le pH joue indirectement un autre rôle en agissant sur l'équilibre de dissociation de l'anhydride sulfureux (cf anhydride sulfureux). Bien qu'un pH bas inhibe l'utilisation des sucres et la croissance d'*O. oeni*, la vitesse de dégradation de l'acide malique est plus élevée. Le pH de la préculture joue un rôle important (Henick-Kling, 1990). Les levains produits à de faibles pH (3,5) dégradent plus rapidement l'acide malique que ceux produits à pH élevé (5,5). Le pH influence l'activité spécifique de l'enzyme malolactique qui est optimale à pH compris entre 3-3,2 pour les souches d'*O. oeni*.

### ✓ L'anhydride sulfureux

Toutes les vendanges doivent être sulfitées à des doses comprises entre 50 et 100 mg/L de SO<sub>2</sub> (30 à 50 mg/L pour la vinification en rouge et 60 à 100 mg/L pour la vinification en blanc). Le sulfitage, outre ses effets antimicrobiens et antioxydants, favorise l'extraction et la stabilisation des composés phénoliques et aromatiques par son effet sur la perméabilité des membranes. Le non-sulfitage n'a pas de justification sérieuse même avec de la vendange très saine mais jamais exempte de bactéries et des oxydases du raisin. De plus, le non-sulfitage favorise la formation de SO<sub>2</sub> endogène par les levures. Les propriétés anti-oxydasiques inhibent l'oxydation enzymatique des composés phénoliques de la vendange, catalysée par la tyrosinase des raisins sains et la laccase des raisins pourris. Ces transformations préfermentaires sont néfastes à la qualité du futur vin. Depuis la cueillette jusqu'à la fermentation alcoolique, il est donc nécessaire de les stopper par l'apport de SO<sub>2</sub> qui bloque l'action de ces oxydases.

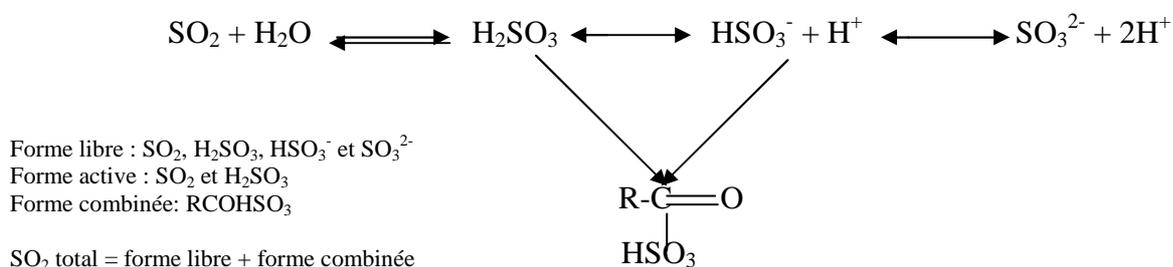
Le SO<sub>2</sub> est un antiseptique très actif sur les bactéries lactiques et se trouve sous différentes formes dans le vin : libre (moléculaire et ionique) et combinée (cf figure I-8). Son action bactéricide se manifeste qu'il soit sous sa forme libre ou combinée mais la forme la plus toxique ou active du SO<sub>2</sub> est le SO<sub>2</sub> moléculaire dont la concentration dépend de celle du SO<sub>2</sub> libre et du pH. Le pH régule l'équilibre entre la forme moléculaire et la forme ionique comme le montrent les réactions suivantes :

- $\text{SO}_2 (\text{g}) + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{SO}_3 (\text{aq})$  (Equilibre de solubilisation du dioxyde de soufre gazeux)
- $\text{H}_2\text{SO}_3 (\text{aq}) + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HSO}_3^- + \text{H}_3\text{O}^+ \quad \text{pK}_{\text{A1}}$  (1<sup>er</sup> équilibre acido-basique entre l'acide sulfureux, appelé dioxyde de soufre moléculaire, et de son ion bisulfite)
- $\text{HSO}_3^- + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{SO}_3^{2-} + \text{H}_3\text{O}^+ \quad \text{pK}_{\text{A2}}$  (2<sup>nd</sup> équilibre acido-basique entre l'ion bisulfite et l'ion sulfite).

Les constantes  $pK_{A1}$  et  $pK_{A2}$  sont les constantes de dissociation acido-basique de l'acide sulfureux. Les valeurs varient selon les paramètres physico-chimiques du milieu : température, titre alcoométrique volumique (TAV)... Elles sont respectivement de 1,9 et 7,2 à 20°C et pour un TAV de 12 % (v/v). Donc dans les gammes de pH œnologiques (entre 3,3 et 4), l'équilibre majoritaire concerne l'acide sulfureux et l'ion bisulfite avec prédominance de l'ion bisulfite.

Les formes moléculaires et ioniques du dioxyde de soufre ne sont pas nécessairement libres dans le vin, car elles peuvent se combiner avec toutes les fonctions carbonylées et les anthocyanes présents. On parle de  $SO_2$  libre et de  $SO_2$  combiné. En définitive seule la partie moléculaire du  $SO_2$  libre est véritablement active sur les micro-organismes.

Bilan:



**Figure I-8. Les différentes formes de l'anhydride sulfureux dans le vin**

Le  $SO_2$  actif est calculé à l'aide de la formule mathématique suivante ([www.itv-midipyrenees.com](http://www.itv-midipyrenees.com)):

$$SO_2 \text{ actif (mg/L)} = SO_2 \text{ libre (mg/L)} / (10^{(pH-pK_{A1})} + 1)$$

La forme active du  $SO_2$  diffuse librement dans la cellule et se retrouve sous forme de  $HSO_3^-$  au pH<sub>i</sub> qui est autour de 6,5 ce qui s'accompagne d'une accumulation de sulfite chargé ( $SO_3^{2-}$ ) qui réagit avec les constituants cellulaires et conduit à la mort cellulaire (Gunnison, 1981). Dans la cellule, le sulfite réagit avec les protéines, les acides nucléiques et certains co-facteurs et peut inhiber les enzymes ce qui explique la mort cellulaire (Romano et Suzzi, 1992). Carreté *et al.* (2002) ont montré que le  $SO_2$  est capable de réduire considérablement l'activité spécifique de la  $H^+$ -ATPase, de 63 % dans leurs conditions (40 mg/L de  $SO_2$ , pH=5, 27°C) et par conséquent réduire la viabilité cellulaire et l'activité malolactique. Delfini et Morsiani (1992) ont trouvé qu'une concentration de  $SO_2$  moléculaire supérieure à 0,5 mg/L est capable d'inhiber complètement la croissance cellulaire de 10 souches de *Leuconostoc* et de 4 souches de *Lactobacillus*. De plus, une population de *Leuconostoc* de  $2 \times 10^6$  cellules/mL était morte 22 h après addition de 0,84 mg/L de  $SO_2$  moléculaire. Bien qu'il y ait une grande variation concernant la sensibilité des bactéries lactiques au  $SO_2$ , il semble que les *Lactobacilles* et les *Pédiocoques* soient plus tolérants qu'*O. oeni* aux hautes

concentrations de SO<sub>2</sub> (Davis *et al.* 1988). Cela nous conduit à la conclusion que les vins à hautes concentrations de SO<sub>2</sub> ont plus de chance que des bactéries indésirables (Lactobacilles et Pédicocques) soient responsables de leur FML (Davis *et al.* 1986). Il faut aussi noter que les bactériophages qui attaquent *O. oeni* sont inhibés par des concentrations de SO<sub>2</sub> total de l'ordre de 50 à 100 mg/L (Davis *et al.* 1985a).

Le SO<sub>2</sub> est ajouté à la vendange et dès ce moment il intervient sur la flore lactique. Les levures étant moins sensibles, son addition les favorisent par rapport aux bactéries. Au cours de la FA, il se combine à certains constituants du vin. En fin de FA, le SO<sub>2</sub> n'existe plus que sous sa forme combinée qui est moins active. L'inhibition des bactéries dépend du pouvoir de combinaison du vin qui va déterminer la proportion de SO<sub>2</sub> libre et du pH qui va déterminer la proportion du SO<sub>2</sub> moléculaire. Pour la même quantité de SO<sub>2</sub> total chaque vin aura une quantité de SO<sub>2</sub> moléculaire différente. L'effet antimicrobien du SO<sub>2</sub> combiné est lié au fait que le catabolisme des substances liées au SO<sub>2</sub> (acétaldéhydes et d'autres composés carbonylés) par les bactéries libère une partie du SO<sub>2</sub> combiné et le rend plus actif (Somers et Wescombe, 1987). Naturellement, tout sulfitage même faible doit être proscrit après la FA si l'on souhaite une croissance bactérienne. Finalement, à la fin de la dégradation totale de l'acide malique, le sulfitage doit être pratiqué afin d'éliminer les populations de bactéries lactiques encore viables (Liu et Gallander, 1983 et Wibowo *et al.* 1988).

Une concentration de SO<sub>2</sub> libre supérieure à 15 mg/L à pH= 3,5 tue *O. oeni* (Guzzo *et al.* 1998). Le SO<sub>2</sub> combiné à des concentrations supérieures à 30 mg/L prolonge la phase de latence et limite la population maximale dans le vin. A plus de 50 mg/L de SO<sub>2</sub> combiné ou de 100 à 150 mg/L de SO<sub>2</sub> total la croissance peut être complètement inhibée (Wibowo *et al.* 1985). L'activité malolactique est sensible au SO<sub>2</sub>. A 20 mg/L de SO<sub>2</sub> combiné l'activité malolactique est réduite de 13 %, à 50 mg/L l'inhibition est de 50 % et à 110 mg/L elle est totale (Lafon-Lafourcade, 1970).

Les levures peuvent également produire des sulfites pendant la FA. Habituellement 10 à 30 mg/L de sulfite (SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) sont produits au maximum (Dittrich, 1987). La plupart des souches de *S. cerevisiae* en produisent moins de 10 mg/L (Suzzi *et al.* 1985). Néanmoins, il existe des souches qui produisent jusqu'à 100 mg/L (Henick-Kling et Park, 1994). La production de sulfite varie en fonction de la présence de nutriments (Gyllang *et al.* 1989), du pH, de la température (Eschenbruch et Bonish, 1976) et du degré de clarification (Liu et Gallander 1982). Il se lie à l'acétaldéhyde et à d'autres substances.

Un pH bas et une quantité élevée d'éthanol agissent de façon synergique avec le SO<sub>2</sub>.

## ✓ Les acides gras

Les acides gras saturés à chaîne moyenne comme l'acide décanoïque peuvent inhiber les levures et les bactéries en même temps (Edwards *et al.* 1990, Lonvaud-Funel *et al.* 1988). En fait, ils inhibent la croissance des bactéries lactiques et leur capacité à cataboliser l'acide malique mais ceci dépend bien sûr du type et de la quantité d'acide présent (Lafon-Lafourcade *et al.* 1983, Capucho et San Romao, 1994). Edwards et Beelman (1987) ont montré que l'addition de 5 à 10 mg/L d'acide décanoïque au jus de raisin inhibe la croissance bactérienne et la FML alors que 30 mg/L sont létales. Curieusement, Capucho et San Romão (1994) ont trouvé que les acides décanoïque et dodécanoïque à des concentrations inférieures à 12,5 et 2,5 mg/L respectivement, sont stimulateurs de la FML et de la croissance bactérienne alors que des concentrations plus élevées deviennent inhibitrices. De plus l'addition combinée des acides hexanoïque, octanoïque et décanoïque entraîne une plus forte inhibition que si chacun était ajouté tout seul (Lonvaud-Funel *et al.* 1988). Ces mêmes auteurs ont montré que l'addition de 23  $\mu\text{M}$  de l'acide décanoïque (4 mg/L), ou bien de 2,5  $\mu\text{M}$  de l'acide dodécanoïque (0,5 mg/L) ou bien de 2,3  $\mu\text{M}$  de l'acide palmitoléique (0,58 mg/L) entraînent une inhibition de la FML. L'inhibition de la vitesse de croissance et de l'activité malolactique par ces acides gras dépend de leur concentration mais aussi du pH du milieu. Par exemple, l'inhibition de l'activité malolactique d'*O. oeni* par l'acide décanoïque est plus importante à pH= 3 qu'à pH= 6 (Capucho et San Romao, 1994). En effet étant donné que le  $\text{pK}_A$  de l'acide décanoïque est de 4,9, la forme prédominante à pH=3 sera la forme non-dissociée considérée comme étant la forme toxique ou active. Cette forme est capable de diffuser dans la cellule et une fois à l'intérieur ( $\text{pH}_i= 6,5$ ), elle subit une déprotonation ce qui entraîne une acidification intracellulaire et une dissipation du gradient transmembranaire de protons (Capucho et San Romao, 1994). De plus Carreté *et al.* (2002) ont démontré que l'inhibition de la FML par les acides gras comme l'acide décanoïque et l'acide dodécanoïque, agit en synergie avec l'éthanol, probablement à cause de l'intervention de toutes ces molécules au niveau de la membrane. De plus, ils ont montré que l'acide décanoïque agit en synergie avec les faibles pH et/ou l'éthanol pour inhiber l'ATPase membranaire d'*O. oeni* dont l'activité est associée à la FML (Olsen *et al.* 1991, Tourdot-Maréchal *et al.* 1999). En effet, ceci peut être expliqué par la capacité de cet acide de se solubiliser dans la partie hydrophobe de la membrane ce qui va modifier sa composition et sa perméabilité et entraîner une augmentation de l'entrée de protons dans la cellule et la perte d'acides aminés intracellulaires (Stevens and Hofemye, 1993). De plus la position, la structure et la fonction des protéines membranaires vont se retrouver affectées comme celles de la  $\text{H}^+$ -ATPase.

## ✓ Protéines

Des métabolites levuriens antibactériens de nature protéique ont été mis en évidence pour la première fois par Dick *et al.* (1992). Ces auteurs ont pu isoler deux protéines cationiques synthétisées par la souche R107 de *S. cerevisiae*. L'une d'elles possède les caractéristiques du lysozyme et l'autre celle d'une petite protéine à haut pI. Récemment, Comitini *et al.* (2005), ont exploré à nouveau cette piste et ont pu identifier la présence d'un composé de nature protéique synthétisé par *S. cerevisiae* souche F63 qui s'est révélé fortement inhibiteur vis à vis de la croissance et de la FML menée par *O. oeni* souche CHR. Ce composé a été partiellement caractérisé. Il présente un poids moléculaire supérieur à 10 KDa et son effet inhibiteur dépend de sa dose. Il semble aussi agir sur un récepteur spécifique de la membrane cellulaire d'*O. oeni* puisque l'augmentation de sa concentration réduit la croissance bactérienne avec une cinétique de saturation typique de ce genre d'inhibiteurs.

Osborne et Edwards (2007) ont aussi mis en évidence la présence d'un autre composé antibactérien de nature protéique qui inhibe *O. oeni* souche Viniflora oenos. Ce composé synthétisé par *S. cerevisiae* souche RUBY.ferm présente un poids moléculaire de 5,9 KDa. Il semble que ce peptide agit de façon synergique avec des concentrations élevées de SO<sub>2</sub> alors que quand le SO<sub>2</sub> est présent à de faibles concentrations, la présence du peptide n'est plus suffisante pour entraîner une inhibition bactérienne (Osborne et Edwards, 2006, 2007). D'après eux, ce peptide agirait comme les bactériocines en formant un canal ou un pore au niveau de la membrane ce qui va faciliter l'entrée du SO<sub>2</sub> dans la cellule d'où l'effet inhibiteur visible quand ces deux facteurs sont associés.

D'après ces travaux, il semble qu'il existe différents types de protéines/peptides antibactériens synthétisés par *S. cerevisiae* et dépendant de la souche de levure en question.

## ✓ Déficience du milieu en nutriments

En dehors de la production de métabolites levuriens antibactériens, l'inhibition des bactéries lactiques peut aussi résulter de l'épuisement du milieu en nutriments par les levures au cours de la FA (Fornachon, 1968, Beelman *et al.* 1982, Nygaard et Prahl, 1996). En effet, à la fin de la FA, le vin peut être déficient en certains nutriments comme les vitamines et les acides aminés qui sont essentiels pour la croissance et le métabolisme des bactéries lactiques exigeantes d'un point de vue nutritionnel (cf paragraphe I-4-4). Beelman *et al.* (1982) ont montré que pendant la culture pure dans un milieu synthétique, les levures consomment certains acides aminés comme l'arginine, de façon que les concentrations restantes ne soient pas suffisantes pour assurer une bonne croissance bactérienne d'où l'inhibition de la FML.

## ✓ Composés phénoliques

Les composés phénoliques du vin proviennent de la pellicule des raisins, des pépins, de la rafle et du bois utilisé pendant le stockage du vin (Ribéreau-Gayon *et al.* 2000). On les divise en deux groupes (Macheix *et al.* 1990):

- 1- Les non-flavonoïdes qui comprennent les acides phénoliques, les aldéhydes et les alcools. La plupart des non-flavonoïdes présentent une structure simple et possèdent un ou plusieurs groupes hydroxyle et méthoxyle directement liés au noyau benzène.
- 2- Les flavonoïdes qui comprennent les anthocyanes, les flavonols et les flavanols et qui possèdent l'anneau C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> dans leur structure.

Les tanins sont définis comme étant des polymères présentant une structure complexe capable de réaliser des interactions stables avec les protéines et d'autres polymères des plantes comme les polysaccharides. Selon leur unité structurale de base, les tanins sont divisés en :

- tanins hydrolysables avec l'acide gallique, l'acide ellagique (acides phénoliques) ou ses dérivés comme monomères. Ce sont les tanins provenant du bois.
- tanins catéchiques ou condensés avec les catéchines et épicatechines (flavanols) en tant que monomères. Ce sont les tanins du raisin et sont aussi appelés pro-cyanidines.

L'influence des composés phénoliques sur les bactéries lactiques n'est pas très élucidée. Alors que certains peuvent stimuler la croissance et l'activité bactérienne, d'autres peuvent les inhiber.

Reguant *et al.* (2000) et Alberto *et al.* (2001) ont montré que la catéchine stimule la croissance et la FML d'*O. oeni* et de *Lactobacillus hilgardii*. Vivas *et al.* (2000) ont par contre montré que les pro-cyanidines (à base de catéchine et épicatechine) affectent négativement la viabilité d'*O. oeni*. Certains acides phénoliques influencent négativement la croissance et la viabilité des bactéries lactiques (Campos *et al.* 2003). Les aldéhydes phénoliques exercent un effet toxique sur les micro-organismes mais il existe peu de connaissances sur leur action sur les bactéries du vin (Gill et Holley, 2004).

Figueiredo *et al.* (2007) ont testé différents aldéhydes phénoliques (les cinnamaldéhydes : coniféraldéhyde et sinapaldéhyde et les benzaldéhydes : vanilline, syringaldéhyde, p-hydroxybenzaldéhyde, 3,4-dihydroxybenzaldéhyde et 3,4,5-trihydroxybenzaldéhyde) et ont trouvé que la plupart avait un effet inhibiteur. Les cinnamaldéhydes, en particulier le sinapaldéhyde, étaient les plus inhibiteurs de la croissance bactérienne. La nature peu-polaire des cinnamaldéhydes semble leur conférer une plus grande affinité au contenu lipidique des cellules membranaires (O'Connor et Rubino, 1991).

Concernant les benzaldéhydes, l'effet inhibiteur était moins marqué et le nombre de groupes hydroxyle des dérivés benzaldéhydes était lié à leur pouvoir inhibiteur. Ainsi, les 3,4-dihydroxybenzaldehyde et 3,4,5-trihydroxybenzaldehyde avaient un effet inhibiteur plus important que le p-hydroxybenzaldehyde. Ces molécules agissent sur la surface externe des cellules en se combinant aux groupes SH des protéines (Ramos-Nino *et al.* 1998). La vanilline n'a montré aucun effet inhibiteur.

Notons enfin que pour ces aldéhydes phénoliques, les concentrations normalement trouvées dans le vin (1-2 mg/L) ne sont pas inhibitrices et qu'il faut des concentrations supérieures comme celles utilisées par Figueiredo *et al.* (2007) pour avoir les effets inhibiteurs décrits.

Parmi les flavonols, le kaempférol et la quercétine inhibent fortement *O. oeni*. La quercétine inhibe la réplication de l'ADN et agit sur la membrane cellulaire (Cuhsnie et Lambert, 2005).

Par contre, les flavanols (catéchine et épicatechine) n'inhibent pas la croissance d'*O. oeni* aux concentrations retrouvées habituellement dans le vin (10-200 mg/L) (Goldberg *et al.* 1998). De plus, la catéchine stimule la croissance bactérienne d'*O. oeni* et cette stimulation augmente avec la concentration (Reguant *et al.* 2000).

Alors que les catéchines et épicatechines n'inhibent pas la croissance d'*O. oeni*, les tanins, composés flavonoïques majoritaires dans les vins rouges, et qui sont constitués à partir de ces monomères, sont très toxiques même à de très faibles concentrations inférieures à celles retrouvées habituellement dans le vin (0,5 g/L) (Figueiredo *et al.* 2007). Les tanins peuvent se lier aux phospholipides et protéines membranaires perturbant ainsi la fonction de la membrane (Jackson, 2000) et peuvent établir des liaisons hydrogènes avec les peptidoglycanes de la paroi cellulaire des bactéries Gram-positives (Field et Lettinga, 1992). Plus la molécule de tanin est grande et plus son effet inhibiteur est important.

Reguant *et al.* (2000) ont montré que l'acide gallique stimule *O. oeni* et ceci est associé avec la consommation de cet acide par la bactérie. Ce résultat a été aussi constaté par Vivas *et al.* (1995) qui ont par contre clairement démontré l'effet inhibiteur de l'acide vanillique, de pro-cyanidines de pépins et des ellagitanins de bois de chêne. Reguant *et al.* (2000) travaillant sur des milieux modèles ont trouvé que parmi les acides hydroxycinnamiques qu'ils ont testé, l'acide p-coumarique avait un effet inhibiteur important à une concentration de 100 mg/L sur la croissance bactérienne et la FML. Campos *et al.* (2003) ont montré que les acides hydroxycinnamiques sont des molécules peu-polaires ce qui facilite leur transport à travers la membrane cellulaire d'*O. oeni* et explique leur effet inhibiteur. De plus leurs  $pK_A$  se situent entre 5 et 7 et donc à un faible pH comme celui du vin la forme non-dissociée toxique est la forme prédominante.

Dans certains cas une souche de bactérie peut s'avérer intéressante pour la FML des vins blancs mais sensible aux polyphénols et donc difficilement utilisable pour une vinification en rouge (Gerbaux, 1998).

Finalement il semble que l'inhibition ou la stimulation de la croissance bactérienne et de la FML varie pour un même composé phénolique et au sein d'une même espèce de bactérie lactique suivant la souche en question et les conditions du milieu (pH, concentration...).

### ✓ Pesticides

Dans le cas où des pesticides ont été utilisés peu de temps avant les vendanges, il y a des risques de les retrouver dans les vins. Bordons *et al.* (1998) ont montré que pour certains pesticides ( $\text{Cu}^{++}$ , dichlofluanide) les concentrations souvent retrouvées dans les vins sont de l'ordre des quantités minimales nécessaires pour l'inhibition d'*O. oeni*. Un milligramme par litre de  $\text{Cu}^{++}$  n'affecte pas la FML mais 5 mg/L la retardent de 12 jours. L'inhibition par le cuivre peut être due à sa compétition avec le  $\text{Mg}^{++}$ , cofacteur important de l'activité enzymatique de la  $\text{H}^+$ -ATPase membranaire, ce qui va entraîner une inhibition de l'activité enzymatique de cette dernière (Carreté *et al.* 2002). Ces derniers montrent que 20 mg/L de  $\text{Cu}^{++}$  réduisent l'activité spécifique de la  $\text{H}^+$ -ATPase de 23,5 %. Le dichlofluanide à 2 mg/L peut avoir un effet significatif. La sensibilité varie avec la souche et certains *Lactobacillus* semblent être plus résistants.

### ✓ Oxygène

Les bactéries lactiques sont des micro-organismes strictement fermentaires. Elles ne respirent pas et n'ont pas besoin de stérols ni d'acides gras insaturés pour leur croissance. Les différentes espèces et souches peuvent avoir des comportements différents vis-à-vis de l'oxygène. On distingue :

- les aérotolérantes : ce sont celles qui tolèrent l'oxygène mais qui sont incapables de l'utiliser.
- les anaérobies facultatives : elles se développent mieux en l'absence d'oxygène mais pour elles l'oxygène n'est pas toxique. C'est le cas d'*O. oeni* en général.
- les microaérophiles : elles ont une meilleure croissance en présence de faibles quantités d'oxygène (Ribéreau-Gayon *et al.* 1975). Selon une hypothèse, l'oxygène, en agissant avec les flavoprotéines, contribue au maintien d'un équilibre redox favorable.

### I-5-3 Mécanismes de résistance chez *O. oeni*

Plusieurs mécanismes régulateurs répondant aux différents stress sont connus chez les bactéries Gram-positives (Sanders *et al.* 1999). Les différences entre les souches d'*O. oeni* concernant leur capacité à réussir la FML peut être reliée à leur résistance aux différents stress du milieu. La préexposition de ces cellules à un agent de stress dans des conditions non-létales améliore leur résistance lors d'une exposition ultérieure à des formes plus extrêmes de ce même genre de stress ou bien d'autres stress. Les bactéries acquièrent ainsi une résistance aux différentes conditions stressantes du milieu. Par exemple, un prétraitement d'*O. oeni* à un pH acide lui confère ultérieurement une meilleure tolérance au SO<sub>2</sub> (Guzzo *et al.* 1998). Plus la souche d'*O. oeni* utilisée en vinification est capable de s'adapter rapidement aux conditions du milieu et plus on a des chances de réussir la FML d'où l'importance de comprendre les différents mécanismes de résistance chez ces bactéries lactiques.

Parmi ces mécanismes on parle souvent de « heat-shock proteins ». En effet, tous les organismes vivants, de la bactérie à l'homme, répondent aux variations de température en induisant la synthèse d'un groupe de protéines appelées 'heat-shock' protéines : HSP. Les températures induisant la synthèse des HSP sont souvent très proches des températures que l'organisme concerné doit affronter dans son environnement naturel : pour les bactéries thermophiles assurant des croissances à 50°C, les HSP sont induites à partir de 60 °C, pour les poissons vivant dans l'Arctique, les protéines sont induites à 5-10 °C. Les HSP sont aussi inductibles par d'autres stress, tels que l'éthanol, les métaux lourds, les agents oxydatifs, l'acidité, les sulfites...C'est pourquoi elles sont appelées plus généralement des protéines de stress. Presque toutes sont présentes dans les cellules non choquées ou elles jouent souvent un rôle essentiel dans les conditions physiologiques normales. Elles sont surexprimées lors de chocs physico-chimiques modérés, pas nécessairement létaux, de façon à protéger la cellule de chocs éventuels plus sévères (Lindquist et Craig, 1988). On distingue plusieurs familles de HSP en fonction de leur poids moléculaire. La synthèse de protéines heat shock est induite chez *O. oeni* dans un milieu stressant comme le vin. La survie d'*O. oeni* dans le vin et sa capacité de réaliser la FML sont améliorées par prétraitement des cellules à une température de 42°C (Guzzo *et al.* 1997). Plusieurs de ces protéines jouent le rôle de molécules chaperonnes ou de protéases qui peuvent participer à la réparation ou à la dégradation des protéines dénaturées de la cellule (Craig *et al.* 1993).

Guzzo *et al.* (2000) ont étudié l'expression de 3 gènes de résistance chez *O. oeni* : le gène *hsp 18* qui code pour une petite protéine de choc thermique appelée Lo18, le gène *clpX* qui code pour un composé de régulation ATPasique de la protéase ClpP et le gène *trxA* qui code pour une

thioredoxine. Ils ont constaté que le gène *hsp 18* ne s'exprime que lorsque les cellules sont exposées à un stress comme lors d'un choc thermique à 42°C dans leur cas. Par contre, les gènes *trxA* et *clpX* s'expriment faiblement pendant les conditions physiologiques normales mais leur expression se trouve augmentée suite à un stress comme le choc thermique. L'expression de ces 3 gènes est réglée au niveau de la transcription et varie en fonction de la phase de croissance. En effet le gène *clpX* est hautement exprimé pendant la phase exponentielle de croissance et son expression diminue progressivement pendant la phase stationnaire pour disparaître à la fin de cette phase. Contrairement à *clpX*, le gène *hsp18* s'exprime uniquement pendant la phase stationnaire et le gène *trxA* s'exprime d'une façon identique et à des taux élevés pendant toutes les phases de croissance.

D'autres mécanismes de résistance ont été identifiés chez les bactéries lactiques comme les transporteurs de substances toxiques « multidrug resistance transporters ou MDR », qui pour la plupart utilisent la force protomotrice plutôt que l'ATP comme force conductrice et travaillent en tant qu'antiports H<sup>+</sup>/substance toxique (ex : le transporteur Lmrp de *Lactococcus lactis*, Bolhuis *et al.* 1995). Les transporteurs bactériens MDR ATP-dépendants déjà connus sont les LmrA de *Lactococcus lactis* qui présentent une homologie structurale et fonctionnelle avec les MDR 1 P-glycoprotéine chez les hommes (van Veen *et al.* 1996) et les HorA de *Lactobacillus brevis* (Sakamoto *et al.* 2001). Bourdineaud *et al.* (2004) ont exploité la présence d'un tel mécanisme de résistance chez *O. oeni* et ont pu identifier la présence d'un transporteur OmrA du type MDR ATP-dépendant. Ils ont montré que ce transporteur confère à *O. oeni* une résistance à différentes conditions toxiques comme le vin, les chocs thermiques et osmotiques etc... En plus de leur rôle important dans l'élimination des substances toxiques en dehors de la cellule, les transporteurs MDR facilitent la survie d'*O. oeni* durant les conditions stressantes en maintenant l'organisation des phospholipides membranaires et par conséquent en préservant la semi-perméabilité membranaire. Notons que les substrats de ces transporteurs présentent une seule caractéristique commune qui est le fait d'être amphiphile comme par exemple l'éthanol.

Un mécanisme impliquant le gène *ftsH* qui code l'expression d'une protéine ancrée à la membrane ATP-dépendante a été aussi décrit par Bourdineaud *et al.* (2003). Il s'agit d'une métalloprotéase qui en plus de son activité de protéase participe à l'assemblage des protéines dans la membrane et à la translocation des protéines exportées. Son expression est induite suite à un choc thermique ou osmotique et confère une meilleure protection des cellules à la toxicité du vin.

## I-5-4 Fabrication de levures *S. cerevisiae* transgéniques capables de réaliser la FML : une solution alternative à la réalisation de la FML par *O. oeni* ?

### I-5-4-1 Dégradation de l'acide malique par les levures

Alors que la FML est menée par les bactéries lactiques notamment l'espèce *O. oeni* qui convertit l'acide L-malique en acide L-lactique et CO<sub>2</sub>, la fermentation maloéthanolique (FME) est menée par certaines espèces de levure comme les levures appartenant à l'espèce *Schizosaccharomyces pombe* et les levures appartenant au genre *Saccharomyces*. Chez les levures, l'acide malique consommé est transformé en pyruvate grâce à un enzyme intracellulaire connu sous le nom d'enzyme malique. Le pyruvate est par la suite réduit en éthanol. Alors que les levures *Saccharomyces* sont les moins efficaces dans la dégradation de l'acide malique, les souches de *SHz. pombe* sont capables de dégrader des concentrations assez élevées (Taillandier et Strehaiano, 1991). Néanmoins, il existe des différences remarquables entre les différentes espèces de *Saccharomyces* concernant leur capacité à dégrader l'acide malique (entre 0 et 3 g/L). Le métabolisme de l'acide malique chez *Saccharomyces* est lié à la température optimale de croissance des différentes espèces. Les espèces cryotolérantes (ex : *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces pastorianus*) synthétisent de l'acide malique alors que les espèces thermotolérantes (ex : *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces paradoxus*) peuvent dégrader l'acide malique jusqu'à 48 % (Rainieri *et al.* 1998a, b). La capacité d'une levure à dégrader l'acide malique extracellulaire dépend de l'efficacité du transport de cet acide ainsi que de l'efficacité de l'enzyme malique intracellulaire (Volschenk *et al.* 1997). A un pH de 3,5 et avec un pK<sub>A</sub> de 3,4, 43 % de l'acide malique se trouvent sous forme non-dissociée capable de diffuser passivement à travers la membrane cellulaire. Etant donné que *S. cerevisiae* ne peut assimiler l'acide malique que par diffusion passive de ce dernier et que son enzyme malique présente une faible affinité à ce substrat (K<sub>m</sub>= 50 mM) (Osothsilp, 1987), l'acide malique extracellulaire n'est pas efficacement consommé par cette levure. La faible dégradation de l'acide malique par *S. cerevisiae* pendant les conditions fermentaires est due aussi à la localisation mitochondriale de l'enzyme malique et le fait que les mitochondries sont dysfonctionnelles et présentes en nombre réduit pendant les conditions de vinification. Par contre, *SHz. pombe* est capable de mieux dégrader l'acide malique en présence d'une source de carbone assimilable car elle possède un système de transport de l'acide malique (la malate perméase) et un enzyme malique cytoplasmique présentant une grande affinité pour le substrat (K<sub>m</sub>= 3,2 mM) (Osothsilp et Subden, 1986). Les enzymes maliques catalysent la décarboxylation oxydative du L-malate en pyruvate et CO<sub>2</sub> en présence des co-facteurs NAD(P)<sup>+</sup> et Mn<sup>2+</sup> ou Mg<sup>2+</sup>. L'enzyme malique mitochondrial de *S. cerevisiae* NADP-dépendante joue un rôle dans l'approvisionnement intramitochondrial en NADPH

et pyruvate pendant les conditions anaérobies (Boles *et al.* 1998) alors que l'enzyme malique de *SHz. pombe* NAD<sup>+</sup>-dépendante joue un rôle dans l'approvisionnement cytosolique en NADH, H<sup>+</sup> (Groenewald et Viljoen-Bloom, 2001). Le pyruvate dans ce cas est réduit en éthanol. Notons aussi que chez les levures, le malate peut être dégradé par la fumarase et la malate déshydrogénase.

La FA complète par *SHz. pombe* produit des arômes indésirables (Taillandier *et al.* 1995). De plus cette levure est sensible à la température et à l'éthanol (Taillandier *et al.* 1988) d'où le rôle préférentiel de *S. cerevisiae* dans la réalisation de la FA. Il serait donc intéressant d'améliorer les capacités de cette dernière à dégrader l'acide malique grâce à la génétique en utilisant certaines propriétés de *SHz. pombe* et d'*O. oeni*.

#### **I-5-4-2 Fabrication de levures *S. cerevisiae* transgéniques capables de réaliser une meilleure FML.**

Comme déjà expliqué dans la partie I-5-2, la FML menée par les bactéries lactiques, est très souvent inhibée à cause de l'action combinée de différents facteurs inhibiteurs du vin ce qui mène le plus souvent à une altération de la qualité sensorielle du vin et de sa stabilité microbiologique quand cette étape désirable n'est pas bien contrôlée. Une solution alternative à ce problème serait l'emploi d'une seule souche de levure fabriquée de façon à pouvoir réaliser simultanément la FA et la FML. Bony *et al.* (1997) ont fabriqué une levure *S. cerevisiae* contenant le gène *mleS* de *Lactococcus lactis* codant pour l'enzyme malolactique et le gène *mae1* de *SHz. pombe* codant pour la malate perméase. La co-expression de ces deux gènes a été absolument nécessaire pour complètement dégrader le malate présent dans le milieu. Par contre, la présence du gène *mae1* et l'absence du gène *mleS* a entraîné la dégradation d'uniquement 45 % de l'acide malique extracellulaire ce qui souligne la plus grande affinité de l'enzyme malolactique au malate ( $K_m = 12$  mM) comparée à celle de l'enzyme malique ( $K_m = 50$  mM). De plus pendant la présence de ces deux gènes, 92 % du malate ont été dégradés via l'enzyme malolactique confirmant encore une fois que la compétition pour le malate est en faveur de l'enzyme malolactique. D'autre part, le transport du malate dans la cellule, étape limitante dans la dégradation de l'acide malique extracellulaire, était très influencé par le nombre de copies du gène *mae1*. En effet, les cellules exprimant plusieurs copies de ce gène, ont montré une plus grande vitesse d'assimilation de l'acide malique que celles contenant une seule copie et par conséquent une dégradation rapide et complète de l'acide malique. Par contre, la même cinétique de dégradation de l'acide malique était observée quelque soit le nombre de copies du gène *mleS* suggérant que cet enzyme n'est pas limitant dans ce processus et qu'une faible quantité est suffisante pour dégrader complètement l'acide malique.

Les souches de *S. cerevisiae* capables de réaliser la FML sont d'un grand intérêt dans la vinification. L'élimination de l'acide malique qui est l'un des acides organiques principaux du jus de raisin est essentielle pour la désacidification et la stabilisation du vin. L'utilisation de souches de levures malolactiques peut contrôler la réalisation de cette étape et assurer une FML rapide et complète puisqu'elle aura lieu simultanément avec la FA dans un milieu non contraignant. Bony *et al.* (1997), ont trouvé dans leurs conditions expérimentales que le malate était complètement dégradé alors que 75 % du sucre du milieu n'étaient pas encore consommés. Malgré les avantages de cette solution alternative, des contraintes existent dans la construction de souches commerciales de levures génétiquement stables après intégration des gènes *mleS* et *mae1*. En plus du problème d'autorisation de commercialisation de telles souches, il est important de préserver les caractéristiques technologiques de la souche en question (Barre *et al.* 1993). Par exemple Bony *et al.* (1997) ont montré qu'une expression élevée du gène *mleS* entraîne une diminution du contenu intracellulaire en malate. Malgré que les cinétiques de croissance et de fermentation n'aient pas changé, ils ne pouvaient pas exclure l'hypothèse que cela n'affecterait pas la synthèse d'autres produits présentant un intérêt organoleptique. Il faudra alors faire attention à ce point et régler l'expression du gène *mleS*. Enfin, cette stratégie pourrait priver le vin de certaines caractéristiques organoleptiques apportées par les bactéries lactiques au cours de la FML (Davis *et al.* 1985b, Henick-Kling, 1993). La comparaison des profils organoleptiques des FML bactériennes et levuriennes devrait trancher sur ce point.

Plus récemment, Husnik *et al.* (2006) ont construit une souche industrielle de *S. cerevisiae* ML01, génétiquement stable, en intégrant le gène de la malate perméase de *SHz. pombe* et le gène de l'enzyme malolactique d'*O. oeni*. Cette souche était capable de complètement décarboxyler 5,5 g/L d'acide malique du moût Chardonnay pendant la FA. Leurs analyses phénotypiques, génotypiques et protéomiques ont montré que cette souche était identique à la souche parentale. De plus elle répond au statut GRAS « Generally Regarded As Safe » de la FDA (Food and Drug Administration) et constitue la première souche de levure génétiquement modifiée qui a été commercialisée. Parmi les avantages de la substitution des bactéries lactiques par cette souche, on note l'absence de formation d'amines biogènes toxiques par les bactéries lactiques au cours de la vinification (Santos, 1996, Soufleros *et al.* 1998).

## I-6 Etudes des interactions levures/bactéries

Lorsque deux populations différentes de micro-organismes partagent le même environnement, des interactions peuvent s'établir entre elles. Ces phénomènes sont relativement fréquents en œnologie en raison de la non-stérilité des milieux de fermentation. Il existe deux types d'interaction : directe et indirecte. Les interactions directes impliquent un contact physique entre deux micro-organismes et comprennent la prédation, le parasitisme, la symbiose et l'inhibition par contact direct entre les cellules ou « cell-cell contact mechanism ». Les interactions indirectes sont dues à des métabolites extracellulaires et comprennent le neutralisme, le mutualisme, le commensalisme, l'amensalisme, la compétition et le « quorum sensing » (Bailey et Ollis, 1986, Verachtert *et al.* 1990, Nissen *et al.* 2003, Kleerebezem *et al.* 1997).

### ✓ Interactions directes

#### a- Prédation et parasitisme

Dans ce type de relation, l'une des espèces vit totalement au dépend de l'autre. La victime devient un substrat et est totalement digérée dans le cas de la prédation ou bien une partie de ses tissus est consommée comme dans le cas du parasitisme. Ainsi les bactéries peuvent être parasitées par des virus (bactériophages), comme le phage P58 chez *O. oeni* (Arendt *et al.* 1991).

#### b- Inhibition par contact direct entre les cellules ou « cell-cell contact mechanism »

Dans ce type d'interaction, une population de micro-organismes est inhibée par une autre et ceci par contact direct entre les cellules des deux populations lors de leur culture mixte. L'inhibition dans ce cas ne résulte ni d'une limitation en nutriments ni de la présence de métabolites extracellulaires inhibiteurs mais plutôt d'un contact direct avec les cellules de la population inhibitrice qui doit présenter une concentration élevée de cellules viables. Nissen *et al.* (2003) ont par exemple montré l'inhibition de la croissance de levures non-*Saccharomyces* comme *Kluyveromyces thermotolerans* et *Torulaspora delbrueckii* par des cellules viables de *Saccharomyces cerevisiae* à une concentration de  $5 \times 10^7$  cellules/mL pendant leur culture mixte. Ce phénomène peut être à l'origine de l'arrêt de croissance de ces levures avant *Saccharomyces cerevisiae* pendant la vinification.

## ✓ Interactions indirectes

### a- Mutualisme

On distingue deux phénomènes : le mutualisme (symbiose) et le synergisme (proto-coopération) durant lesquels chaque micro-organisme est stimulé par la présence de l'autre. Dans le mutualisme, la présence de chaque micro-organisme est indispensable pour la survie de l'autre alors que dans la proto-coopération l'interaction n'est pas nécessaire à la survie des populations mais la présence des deux micro-organismes ensemble entraîne une amélioration de leur développement.

### b- Neutralisme

Aucun changement dans la croissance des populations n'a lieu ; la présence d'une population n'affecte pas l'autre. Ceci définit en fait l'absence d'interaction. Ce type de relation n'est possible que si aucun des substrats n'est limitant ou si les espèces ont des besoins nutritionnels totalement différents.

### c- Commensalisme

Une des populations profite de la présence de l'autre. Cela peut avoir lieu si une des populations produit une substance nécessaire pour la croissance de l'autre ou si elle consomme une substance inhibitrice de la croissance de l'autre.

### d- Compétition

Dans le cas de la compétition, les deux populations se développent sur le même substrat et consomment toutes les deux un ou plusieurs nutriments communs nécessaires à leur croissance ce qui aura un effet négatif sur leur vitesse de croissance et celle dont la vitesse de croissance est la plus affectée sera la plus désavantagée. On peut citer l'exemple de la compétition entre les levures et les bactéries lactiques au début de la FA au niveau de laquelle la croissance des bactéries s'arrête rapidement aux dépens du développement des levures. Cependant cet arrêt de croissance peut être un avantage lorsque l'espèce concernée reste viable dans l'attente de nouvelles conditions favorables après la mort de son concurrent. En vinification, les bactéries lactiques, principalement *O. oeni*, se développent après la FA, lorsque *S. cerevisiae* entre en phase de déclin et relargue des facteurs de croissance (Guilloux-Benatier *et al.* 1985, King et Beelman, 1986, Lonvaud-Funel *et al.* 1988).

### e- Amensalisme

Une des populations produit une substance ayant un effet négatif sur la croissance de l'autre. Cette situation est semblable à la compétition par interférence, exceptée que dans l'amensalisme une des populations n'est pas affectée par l'interaction. Le cas typique d'amensalisme chez les levures est la toxine « killer » produite par certaines souches de *S. cerevisiae* et qui entraîne la mort des souches sensibles (Carrau *et al.* 1993, Ramon-Portugal *et al.* 1994). On peut aussi citer l'exemple de la production d'éthanol par *Saccharomyces* qui est la principale hypothèse expliquant la domination de cette levure lors de la fermentation suite à une sélection des différentes espèces présentes en début de fermentation directement liée à leur tolérance à l'éthanol (Meers, 1973). L'inhibition des bactéries lactiques par des métabolites levuriens (éthanol, SO<sub>2</sub>, acides gras, protéines, etc...) est aussi un exemple d'amensalisme.

### f- Quorum sensing

Chez les bactéries Gram positives et Gram négatives, la capacité d'une population bactérienne entière d'exprimer un phénotype spécifique en réponse à de petites molécules signales solubles et dont l'expression dépend de la densité cellulaire (ex : lactones homosérines, phéromones) est définie comme étant le phénomène de « quorum sensing » (Fuqua *et al.* 1996, Kleerebezem *et al.* 1997). Chez les levures, des phénomènes ressemblant au « quorum sensing » ont été décrits, comme par exemple la croissance coordonnée de colonies géantes de différentes espèces de levures sur gélose avec l'ammoniaque comme molécule signal (Palková *et al.* 1997), la stimulation de la méiose et de la sporulation chez *S. cerevisiae* avec le bicarbonate comme molécule signal et bien d'autres exemples (Hayashi *et al.* 1998).

Dans les conditions œnologiques, les bactéries lactiques et les levures peuvent se développer en cultures mixtes ou séquentielles et différents types d'interactions peuvent avoir lieu. Parfois différentes interactions surviennent en même temps pendant les cultures mixtes ce qui rend difficile la compréhension de l'évolution de telles cultures. Dans le but de mieux contrôler la FML, une meilleure compréhension des interactions existant entre la levure *S. cerevisiae* et la bactérie lactique *O. oeni* est nécessaire. Ces interactions étudiées en milieux de laboratoire sont dépendantes des souches choisies, de la composition des milieux de culture, des conditions de culture (milieu liquide ou gélosé, température, pH, agitation, aération...) et des stratégies d'inoculation (cultures séquentielles, cultures mixtes).

## I-6-1 Différents moyens d'études des interactions levures-bactéries.

### I-6-1-1 En milieu gélosé

L'une des méthodes les plus connues et les plus anciennes dans l'étude des interactions levures-bactéries est celle inspirée de la technique des antibiogrammes et qui a été tout d'abord développée par Lemaesquier (1987). Elle consiste à épandre une couche uniforme de bactéries dans la masse de la gélose d'une boîte de Pétri puis d'ensemencer la levure.

Les cultures d'entretien des bactéries sont faites sur bouillon MRST c'est-à-dire du bouillon MRS (de Man, Rogosa, Sharpe) qui répond à tous les besoins de croissance des bactéries lactiques (cf partie II-1-2 du chapitre II) et dans lequel on ajoute de l'acide thioglycolique. Ce produit a pour effet de baisser le potentiel redox du bouillon MRS et de le priver en oxygène étant donné que les bactéries lactiques comme *O. oeni* poussent mieux en l'absence d'oxygène. Dans un tube contenant 5 mL d'agar à 0,7 % (7 g/L) maintenu en surfusion à 40°C, on introduit 0,1 mL de culture de bactéries. L'ensemble est immédiatement versé sur une boîte de gélose MRST. Cet ensemencement étant assez dense, après incubation, les colonies apparaissent très petites et très serrées. Cette façon de faire permet donc d'observer un voile homogène sur toute la surface de la boîte de Pétri après une incubation de minimum 5 jours en aérobie et à 25°C.

Les levures sont cultivées en bouillon YM à l'extrait de levure et de Malt. Ensuite pour ensemencer les levures sur la gélose, on se sert d'un inoculateur circulaire avec lequel on dépose la levure, en deux endroits de la boîte ce qui donnera après incubation, deux anneaux de levures. Cette disposition présente l'avantage de déterminer une zone intérieure fermée, si bien qu'une éventuelle substance diffusée par les levures va se trouver accumulée à cet endroit alors qu'à l'extérieur, elle pourra diffuser librement. On obtient ainsi une sorte d'effet de concentration à l'intérieur des anneaux de levures. L'observation de la zone de contact entre levures et bactéries nous permet de déduire s'il y a interaction ou non. Si cette zone de contact est plus limpide, plus transparente que le fond bactérien, il s'agit alors d'une inhibition. Si au contraire, elle est plus trouble, c'est une stimulation et s'il n'y a pas de différence avec le reste de la boîte, on peut conclure qu'il n'y a pas d'interaction.

En testant différentes souches de levures et de bactéries ensemble, Lemaesquier (1987) a pu mettre en évidence 4 types de comportement :

- absence d'interaction : présence d'un trouble bactérien homogène sur toute la surface de la boîte.
- inhibition stricte des bactéries par les levures : Dans ce cas, il n'y a pas de formation de colonies bactériennes dans la partie centrale des anneaux et dans l'espace situé entre les deux anneaux.

On note que la substance inhibitrice doit être en assez forte concentration pour montrer un effet puisque ce phénomène ne s'observe qu'entre les anneaux et en leur centre.

- Stimulation plus inhibition des bactéries : Dans ce cas, on observe en plus de l'inhibition au centre et entre les deux anneaux, une prolifération des colonies bactériennes au-dessus et en dessous de l'espace situé entre les deux anneaux de levure ainsi que sur leur pourtour. L'observation à la loupe binoculaire révèle qu'à cet endroit la densité des colonies bactériennes est beaucoup plus grande que sur le reste de la boîte. La conclusion est qu'une autre substance ou catégorie de substances, qui elles, stimulent la croissance bactérienne sont diffusées par les levures.
- Stimulation stricte des bactéries par les levures : Ce cas a déjà été étudié dans la littérature et l'explication est que la levure peut relarguer dans le milieu des substances utiles à la bactérie et peut ainsi activer sa croissance.

Notons qu'une même souche de bactérie peut présenter les quatre types de comportement en fonction de la souche levurienne testée.

Malgré le fait que cette méthode soit simple et rapide, plusieurs paramètres opératoires peuvent varier et des questions peuvent se poser concernant différents points :

- inoculer les levures sur la gélose ou plutôt tester le surnageant de la culture levurienne ?
- ensemer la souche bactérienne à la surface de la gélose ou bien dans la gélose et à quelle concentration initiale ?
- quel doit être la composition du milieu utilisé pour les précultures ?
- quel doit être la composition du milieu gélosé ?
- comment fixer les conditions d'incubation : pH, température, durée d'incubation, etc... ?
- comment quantifier l'interaction ?

Pour toutes ces raisons cette méthode reste difficile à standardiser. Toutefois, d'autres auteurs ont essayé de l'améliorer (Gilis *et al.* 1996, Taillandier *et al.* 2002). Ces derniers ont essayé de l'optimiser en choisissant les milieux YEPD et MRS pour les précultures de levure et de bactéries respectivement. Le milieu MRS a été complété par 8 g/L d'acide malique. Le milieu MRS agar formant la gélose a été aussi complété avec de l'acide malique et son pH ajusté à 4,5. La concentration initiale de bactéries a été ajustée à  $10^7$  cellules/mL dans l'agar et 2 souches de levure ont été testées par boîte. L'incubation se faisait pendant 8 jours à 28°C.

Arnink *et al.* (2005) ont utilisé une autre méthode sur boîte de Pétri inspirée des antibiogrammes, qui consiste en une modification de la méthode de Kirby-Bauer reposant sur le principe des disques de diffusion (Bauer *et al.* 1996). Cette méthode est basée sur la susceptibilité des bactéries vis-à-vis

d'une substance donnée. En effet, des disques de papier filtre imprégnés de cette substance sont placés sur la gélose et la substance va diffuser de façon radiale dans l'agar et probablement affecter la croissance bactérienne. Dans le cas d'une inhibition une zone claire va se former autour du disque et dans le cas d'une stimulation une zone dense se formera. Le diamètre de ces zones constituera l'unité de mesure de ce test. Dans leur cas, les disques ont été imprégnés par les milieux préfermentés par les levures *S. cerevisiae* et déposés sur des géloses contenant les bactéries lactiques *O. oeni*.

Malgré tous les efforts d'optimisation, ces techniques restent semi-quantitatives puisqu'elles nous permettent d'évaluer uniquement la croissance des bactéries en présence d'une souche donnée de levure mais ne nous permet pas de suivre la consommation d'acide malique. Etant donné que ces deux phénomènes sont très souvent non corrélés (Capucho et San Romao, 1994), l'observation d'une inhibition de la croissance bactérienne sur boîte de Pétri ne signifie pas nécessairement une inhibition de la démalication et vice versa. De plus les résultats obtenus avec ces méthodes sont difficilement extrapolables en milieux liquides (Taillandier *et al.* 2002, Arnink *et al.* 2005) à cause des raisons suivantes :

- la composition du milieu gélosé est très différente de celle des milieux naturels (jus de raisin et vin) et entraîne par la suite une croissance et un métabolisme différents que ce soit pour les levures ou pour les bactéries.
- Les molécules inhibitrices produites par les levures diffusent différemment dans la gélose suivant leur taille et leur nature chimique ce qui donne des résultats différents de ceux obtenus en milieu liquide.
- Ces méthodes ne nous permettent pas d'identifier dans le cas d'une inhibition ou d'une stimulation la nature de la substance responsable de cette interaction ou bien la concentration à laquelle elle présente un effet.

Comme alternative à ces méthodes de diffusion sur gélose, l'emploi de milieux liquides présentant une composition chimique simulant les milieux naturels jus de raisin et vin sera adopté dans notre étude.

## **I-6-1-2 En milieu liquide**

### **a- Fermentations séquentielles**

Ces fermentations simulent le procédé de vinification naturel ; en d'autres termes la FML démarre quand la FA est achevée. Il s'agit donc d'inoculer le milieu préfermenté par la levure avec une souche d'*O. oeni* dans le but d'étudier l'effet de cette levure sur la bactérie en termes de croissance et de consommation d'acide malique. Notons qu'en fin de FA, le milieu présente plusieurs contraintes (concentration d'éthanol élevée, SO<sub>2</sub>, manque de nutriments, acides gras, protéines, etc ...) qui peuvent être évaluées à l'aide de différents tests et dosages.

### **b- Cultures mixtes ou co-cultures**

Au laboratoire de Génie chimique, les fermentations mixtes ou co-cultures, sont réalisées dans un bioréacteur à membrane qui repose sur le principe suivant: deux micro-organismes différents sont confinés dans deux compartiments séparés par une membrane à fibres creuses mais évoluent dans le même milieu de culture grâce à une circulation alternative de ce milieu d'un compartiment à l'autre. De cette manière, les souches se développent isolées l'une de l'autre, mais toutes les interactions indirectes ayant lieu par l'intermédiaire de métabolites extracellulaires, se produisent comme si les souches étaient quasiment dans le même réservoir. Ainsi un prélèvement distinct de chaque souche devient possible et l'analyse de chaque population participant à l'interaction sera identique à celle d'une culture pure qui est relativement simple.

Cette méthode n'a pas été utilisée jusqu'à ce jour pour des co-cultures levures/bactéries. Cependant, elle peut être envisagée pour simuler une co-inoculation du moût de raisin. En effet, la présence des bactéries dès le début du procédé de vinification peut minimiser l'effet des contraintes et favoriser donc leur croissance et surtout la consommation d'acide malique. Cette nouvelle stratégie, si elle s'avérait efficace, permettrait aussi de simplifier le travail de l'œnologue en réalisant une seule opération d'inoculation du moût de raisin.

#### **b-1 Description du Bioréacteur à membrane (BRM)**

Ce bioréacteur (cf figure I-9), a été conçu et développé au laboratoire de Génie Chimique (L.G.C) (Salgado, 1999, Albasi *et al.* 1998, Albasi *et al.* 2001). Il est constitué de deux réservoirs dont l'un d'eux renferme une membrane de filtration à fibres creuses. La circulation du milieu au travers de cette membrane est assurée par une surpression (0,4 à 0,7 bar) et contrôlée par des sondes à niveau.

Un gaz comprimé est introduit alternativement dans l'espace tête d'un réservoir alors que le deuxième reste ouvert à l'atmosphère. Il en résulte une différence de pression transmembranaire qui induit un déplacement du milieu d'un compartiment vers l'autre.

L'entrée et la sortie des gaz dans chaque compartiment sont contrôlées par un couple d'électrovannes: une contrôlant l'entrée et qui est normalement fermée et l'autre contrôlant la sortie et qui est normalement ouverte. Un dispositif permet de basculer la mise sous tension entre les deux couples de vannes en fonction du niveau de liquide dans les deux réservoirs. Le niveau maximum est fixé pour chacun des réservoirs par deux sondes de niveau en acier inoxydable: lorsque les deux sondes sont en contact avec le liquide, le système de contrôle fait basculer la mise sous tension des vannes. Les vannes qui étaient ouvertes se ferment et celles qui étaient fermées s'ouvrent. Le réservoir qui était à pression atmosphérique passe en surpression et vice versa.

La stérilité du gaz entrant est assurée par filtration sur des membranes hydrophobes en Téflon, de seuil de coupure de 0,2  $\mu\text{m}$ .

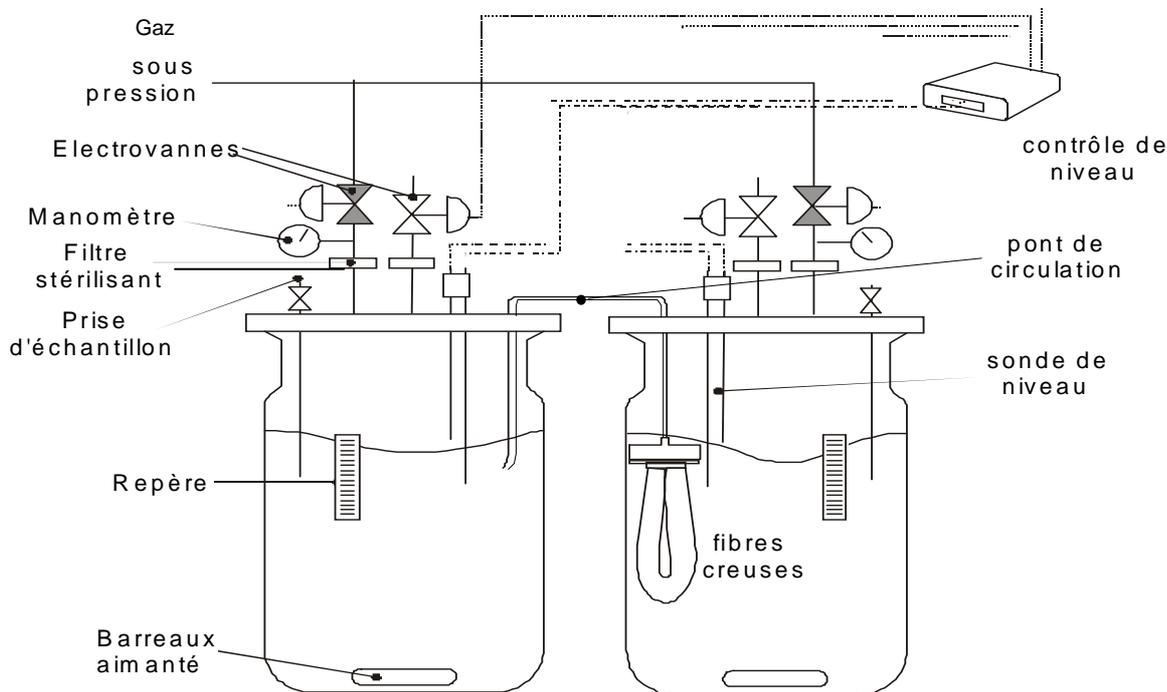
Le module de filtration à fibres creuses est fourni par la société Polymem SA (Fourquevaux, France). Les fibres en polysulfone sont en forme de U et maintenues ensemble à la base par une résine Epoxy. La base du module est confinée dans un réceptacle métallique et la partie filtrante est en immersion dans le milieu de culture. Les caractéristiques du module de filtration sont présentées dans le tableau I-2:

**Tableau I-2. Caractéristiques du module de filtration du BRM**

Diamètre nominal des pores	0,1 $\mu\text{m}$
Diamètre interne des fibres	0,25 mm
Diamètre externe des fibres	0,43 mm
Nombre de fibres	1314
Longueur utile des fibres	0,09 m
Surface interne	0,107 $\text{m}^2$
Surface externe	0,156 $\text{m}^2$

L'homogénéité du milieu à l'intérieur de chaque réservoir du BRM est assurée par une agitation magnétique à l'aide de barreaux aimantés. La connexion entre les deux compartiments est réalisée

par une tuyauterie métallique. Le volume mort de cet espace intercompartmental est inférieur à 5 mL (soit 0,1 % du volume réactionnel total).



**Figure I-9. Bioréacteur à membrane pour l'étude de cultures mixtes de micro-organismes**

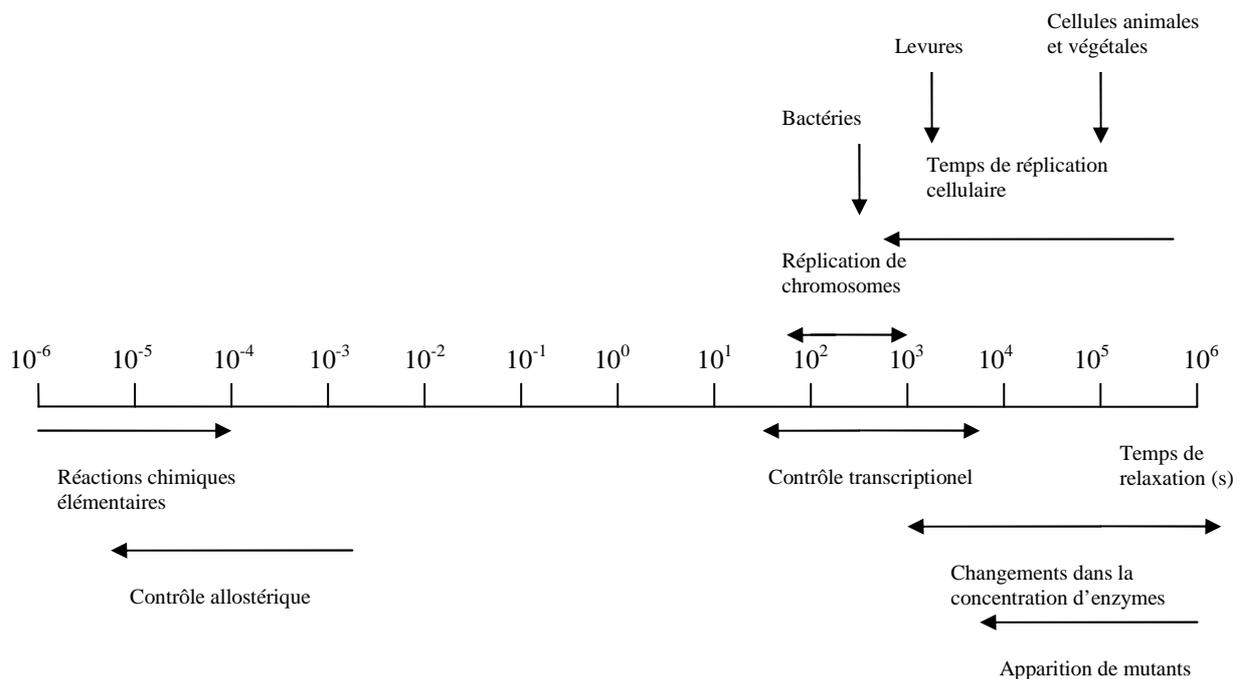
## b-2 Conditions de travail

Afin que ce réacteur puisse être utilisé dans l'étude des cultures mixtes, il doit remplir certaines conditions :

1- L'homogénéité du milieu doit être telle que les micro-organismes qui se trouvent dans chaque compartiment soient soumis au même environnement. Ce qui compte pour l'étude quantitative des interactions, c'est l'influence des écarts de concentrations des différents solutés entre les deux compartiments sur la dynamique de la réaction. Cette influence est conditionnée par les temps de réponse des micro-organismes qui dépendent des temps de relaxation des mécanismes par lesquels ils répondent aux changements dans leur environnement. De cette façon, on doit travailler strictement avec des temps de mélange inférieurs aux temps de relaxation des différents mécanismes. Ainsi, l'écart de concentrations entre les réservoirs serait supprimé avant que le micro-organisme ne modifie son métabolisme et on pourrait ignorer le changement. Pourtant cela peut s'avérer très difficile vu les temps de relaxation de certains mécanismes (cf figure I-10). Il faut alors mélanger assez rapidement pour que les différences soient faibles et qu'elles n'affectent pas le

déroulement de la fermentation. Les bactéries lactiques que nous utilisons (*O. oeni*) ont des temps de relaxation beaucoup plus grands que ceux affichés sur la figure I-10.

Les travaux de Salgado Manjarrez (1999) montrent que si l'on fixe le volume d'échange entre 100 et 200 mL et le volume dans chaque pot entre 1,5 et 1,7 L, et pour une surface d'échange de 1000 cm<sup>2</sup>, le temps de mélange sera inférieur à 10 minutes. Ce temps défini comme étant le temps nécessaire à obtenir une différence de concentration entre les deux réservoirs inférieure à 5 %, est ainsi largement inférieure au temps de réplication cellulaire des micro-organismes dans nos conditions expérimentales.



**Figure I-10. Temps caractéristiques des réponses biologiques importantes en ingénierie de bioréacteurs (Bailey et Ollis, 1986)**

2- Le volume de liquide dans chaque réservoir doit être le même. Cela est aussi nécessaire pour soumettre les deux souches au même environnement car si le mélange est correct les teneurs de solutés seront très proches dans les deux réservoirs. Pour que les souches soient soumises à un environnement similaire, leurs concentrations respectives devront avoir un même volume de référence.

3-La membrane doit être inerte vis-à-vis des solutés du milieu et des micro-organismes. En plus, la quantité de cellules adsorbées ou piégées dans la membrane devra être négligeable par rapport à la

population totale. Cela est indispensable pour que la détermination quantitative de leur concentration soit correcte.

### **b-3 Validation**

Salgado (1999) a utilisé le réacteur pour étudier des cultures mixtes entre *S. cerevisiae* et *Klueveromyces marxianus* et entre une souche *S. cerevisiae* killer et une souche *S. cerevisiae* sensible (cas d'amensalisme). Les expériences de mélange avec fermentation ont démontré que le système est capable de maintenir à des valeurs faibles les différences de concentration des différents solutés (substrats et produits) entre les deux réservoirs. Concernant la protéine « killer » produite par *S. cerevisiae* K1, c'est une protéine globulaire de 16 KDa et sa taille est inférieure à la taille minimale des pores de la membrane utilisée (0,1  $\mu\text{m}$ ) (Ramon-Portugal, 1995). Ainsi, une rétention importante ne semble pas envisageable. Salgado (1999) a d'ailleurs vérifié son passage à travers la membrane et la conservation de son activité et il a constaté une évolution comparable de l'activité killer dans les deux réservoirs. Cela nous laisse espérer que d'autres types de protéines importantes dans les phénomènes d'interaction pourraient se comporter de la même façon (exemple dans notre cas: protéine synthétisée par *S. cerevisiae* et inhibant *O. oeni*).

### **I-7 Conclusion**

La fermentation malolactique est une étape secondaire de la vinification qui a souvent lieu à la fin de la fermentation alcoolique. Elle constitue une étape importante dans la vinification de la plupart des vins rouges et de certains types de vin blanc comme le champagne et les vins blancs secs de certains cépages acides car elle assure une diminution de l'acidité et une stabilité microbiologique du vin fini et elle améliore ses caractéristiques organoleptiques. Plusieurs facteurs allant du raisin au vin en passant par les pratiques de vinification et les souches de levure et de bactérie conduisant les fermentations alcoolique et malolactique contrôlent sa réalisation. Certains sont favorables à sa réussite comme le débourageage, la macération pelliculaire et l'élevage sur lies alors que d'autres peuvent exercer une action inhibitrice suivant leurs valeurs et leurs concentrations. Parmi eux on peut citer la température, le pH, le sulfitage, les composés phénoliques et les pesticides en plus de certaines molécules relarguées dans le milieu par les levures au cours de la fermentation alcoolique comme l'éthanol, le  $\text{SO}_2$  endogène, les acides gras, les protéines, etc..., ainsi que la carence du milieu à la fin de la fermentation alcoolique en nutriments.

Alors que certains de ces facteurs peuvent être en partie maîtrisés par l'œnologue notamment les pratiques de vinification, la température, le sulfitage et l'emploi de pesticides, d'autres dépendent

des souches de levure responsables de la fermentation alcoolique qui vont déterminer la composition et les conditions physico-chimiques du vin à la fin de cette fermentation. Ils dépendent aussi des exigences nutritionnelles des bactéries et de leur capacité à résister aux conditions inhibitrices du milieu préfermenté par la levure.

Bien qu'actuellement les moûts soient ensemencés par des souches sélectionnées de levure et de bactérie, la FML n'est pas toujours réussie. Il est donc très important de pouvoir comprendre les interactions qui existent entre ces deux micro-organismes (inhibition, stimulation ou neutralité) et de pouvoir les quantifier. Pour cela, il existe des tests simples et rapides en milieux gélosés mais leurs résultats ne sont pas quantifiables ni tout le temps extrapolables d'où la nécessité de travailler avec des milieux synthétiques liquides qui simulent les milieux naturels (jus de raisin et vin).

Dans ce travail, différents couples *Saccharomyces cerevisiae/Oenococcus oeni* seront étudiés en testant différentes souches de levures et de bactéries ensemble. Les interactions existant entre ces différentes souches seront quantifiées en appliquant deux stratégies d'inoculation : les cultures séquentielles et les cultures mixtes.

Les cultures séquentielles simulent le procédé de vinification naturel : en d'autres termes la FML est démarrée après achèvement de la FA. Au cours de cette stratégie traditionnelle, un milieu synthétique jus de raisin est tout d'abord fermenté par une souche de *S. cerevisiae*. Ensuite, le milieu préfermenté par cette souche, sera inoculé par une souche d'*O. oeni* et la croissance cellulaire de cette dernière ainsi que sa consommation de l'acide malique seront suivies. L'effet de la levure sur la bactérie (inhibition, stimulation ou neutralité) sera évalué par comparaison à un témoin de cette bactérie (culture pure réalisée dans un milieu synthétique jus de raisin et/ou vin non fermenté par la levure). Ceci va nous permettre de quantifier l'interaction. Notons que certains paramètres du milieu à la fin de la FA seront mesurés à l'aide de différents tests et dosages comme les concentrations d'éthanol, de SO<sub>2</sub>, d'acides gras et d'azote assimilable. La présence de protéines inhibitrices, piste peu exploitée jusqu'à présent, sera également étudiée.

Une alternative à la culture séquentielle et qui est la culture mixte ou co-culture est également proposée dans ce travail. Les cultures mixtes sont réalisées dans un bioréacteur à membrane dans lequel les bactéries et les levures sont inoculées simultanément dès le départ dans un milieu synthétique jus de raisin. Ces deux micro-organismes sont confinés dans deux compartiments séparés par une membrane à fibres creuses mais évoluent dans le même milieu de culture grâce à une circulation alternative de ce milieu d'un compartiment à l'autre. Ceci souligne l'intérêt de cet outil dans l'étude des cultures mixtes par rapport aux cultures mixtes classiques au niveau desquelles les micro-organismes sont mélangés et qui nécessitent donc des méthodes longues et lourdes pour estimer l'évolution de la biomasse de chaque souche.

Cette méthode n'a pas été utilisée jusqu'à ce jour pour des co-cultures levures/bactéries. Cependant, elle peut être envisagée pour simuler une co-inoculation du moût de raisin. En effet, la présence des bactéries dès le début du procédé de vinification peut minimiser l'effet des contraintes rencontrées au cours des cultures séquentielles traditionnelles et favoriser donc leur croissance et surtout la consommation d'acide malique. Cette nouvelle stratégie, si elle s'avérait efficace, permettrait aussi de simplifier le travail de l'œnologue en réalisant une seule opération d'inoculation du moût de raisin.



## ***Chapitre II. Matériel et Méthodes***



## II- Matériel et Méthodes

### II-1 Matériel

#### II-1-1 Micro-organismes

5 souches de *Saccharomyces cerevisiae* (A, B, C, D et E) et 3 souches d'*Oenococcus oeni* (X, Y et Z) ont été utilisées dans ce travail. Toutes les souches sont des souches œnologiques produites et commercialisées par la société Lallemand Inc. (Blagnac, France).

#### II-1-2 Milieux de culture

Tous les sels minéraux ainsi que le glucose et le fructose utilisés dans la préparation des milieux de culture ont été fournis par Sigma-Aldrich, Inc. (Saint Louis, Etats-Unis). L'extrait de levure a été fourni par Oxoid (Hampshire-Angleterre) et la peptone par Biokar (Beauvais-France).

##### ✓ Milieu de conservation et de réactivation des levures

Les souches de levure sont conservées sur un milieu YEPD agar à 4°C dont la composition est la suivante:

Glucose	20 g/L
Extrait de levure	10 g/L
Peptone	20 g/L
Agar	20 g/L

Ce même milieu dépourvu d'agar est utilisé pour la réactivation des souches de levures et servira de pré-levain. Avant inoculation des levures, ce milieu est autoclavé à 120°C pendant 20 minutes.

##### ✓ Milieu de conservation et de réactivation des bactéries

Le milieu MRS (de Man, Rogosa, Sharpe, Biokar, Beauvais-France) est utilisé pour la réactivation des bactéries. Ces dernières sont conservées au congélateur à – 20°C dans du MRS contenant du glycérol à 20% (v/v) et ceci dans des cryotubes en Nalgène (Nalge Nunc International, New York-Etats-Unis). Le milieu MRS est fourni sous forme de poudre dont la composition est la suivante:

Polypeptone	10 g/L
Extrait de viande	10 g/L
Extrait de levure	5 g/L
Glucose	20 g/L
Tween 80	1,08 g/L
Dipotassium phosphate	2 g/L
Acétate de sodium	5 g/L
Citrate d'ammonium	2 g/L
Sulfate de magnésium	0,2 g/L
Sulfate de manganèse	0,05 g/L

Le pH de ce milieu est de 6,4 à 25°C. Avant inoculation des bactéries, ce milieu est autoclavé à 120°C pendant 15 minutes. Après autoclavage, 3 % d'éthanol (v/v) sont ajoutés stérilement à ce milieu par filtration à travers des membranes de 0,2 µm de seuil de coupure (Elvetec services, Meyzieu-France).

#### ✓ Milieu synthétique pour la préparation des levains de levures et de bactéries

Ce milieu présente la composition suivante:

Glucose	50 g/L
Extrait de levure	1 g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2 g/L
Acide citrique	0,3 g/L
Acide L-malique	5 g/L
Acide L-tartrique	5 g/L
MgSO <sub>4</sub>	0,4 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5 g/L

Le pH de ce milieu est ajusté à 3,5 à l'aide d'une solution NaOH 10 M. Après autoclavage à 120°C pendant 20 minutes, 6 % d'éthanol (v/v) sont ajoutés stérilement au milieu si ce dernier est destiné à servir de levain pour les bactéries.

## ✓ Milieux synthétiques pour les cultures

### a- Milieu synthétique jus de raisin

Ce milieu est utilisé pour réaliser les fermentations alcooliques et malolactiques en cultures pures et mixtes. Sa composition qui ressemble à celle du moût de raisin est la suivante :

Glucose	100 g/L
Fructose	100 g/L
Extrait de levure	1 g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2 g/L
Acide citrique	0,3 g/L
Acide L-malique	5 g/L
Acide L-tartrique	5 g/L
MgSO <sub>4</sub>	0,4 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5 g/L

Le pH de ce milieu est ajusté à 3,5 à l'aide d'une solution NaOH 10 M et le milieu est ensuite autoclavé à 120°C pendant 20 minutes.

### b-Milieu synthétique vin

Ce milieu dont la composition ressemble au vin, est exempt des molécules synthétisées par les levures à l'exception de l'éthanol. Il sera utilisé pour la réalisation de la FML et servira comme témoin ou contrôle des FML réalisées dans les milieux préfermentés par les levures. Sa composition est la suivante :

Glucose	0,5 g/L
Fructose	0,5 g/L
Extrait de levure	0,5 g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,2 g/L
Acide citrique	0,3 g/L
Acide L-malique	4 g/L
Acide L-tartrique	5 g/L
MgSO <sub>4</sub>	0,2 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g/L

Le pH de ce milieu est ajusté à 3,5 à l'aide d'une solution NaOH 10 M et le milieu est ensuite autoclavé à 120°C pendant 20 minutes. Après autoclavage, 10 % d'éthanol (v/v) soit 80 g/L seront ajoutés stérilement au milieu par filtration à travers des membranes de 0,2 µm de seuil de coupure (Elvetec services, Meyzieu-France). L'addition de l'éthanol entraîne une augmentation du pH qui doit être réajusté à 3,5 à l'aide d'une solution d'acide orthophosphorique à 85 %.

Notons que l'extrait de levure utilisé dans ces milieux (Oxoid, Hampshire-Angleterre) présente la composition suivante en acides aminés : valine (1 %), tyrosine (4,95 %), tryptophane (0,85 %), thréonine (2,73 %), sérine (3,42 %), proline (0,88 %), phénylalanine (3,78 %), méthionine (0,8 %), lysine (5,4 %), leucine (6,04 %), isoleucine (4,81 %), glycine (5,95 %), acide glutamique (13,49 %), cystine (0,76 %), acide aspartique (7,07 %), arginine (3,31 %), alanine (0,91 %).

### **c-Milieu MRS modifié**

Ce milieu est utilisé pour tester l'effet inhibiteur sur la croissance bactérienne et la démalication de différentes fractions peptidiques obtenues par ultrafiltration (cf partie II-2-2-10 de ce chapitre, paragraphe b) des milieux préfermentés par certaines souches de levures *S. cerevisiae*. Sa composition est la suivante :

MRS                    55,3 g/L  
Acide L-malique    4 g/L

Ce milieu est autoclavé à 120°C pendant 15 minutes. Après autoclavage, 10 % d'éthanol (v/v) soit 80 g/L ainsi que la fraction peptidique à tester sont ajoutés au milieu. Le pH est ensuite ajusté à 3,5 à l'aide d'une solution d'acide orthophosphorique à 85 % et le milieu est finalement filtré stérilement à travers des membranes de 0,2 µm de seuil de coupure (Elvetec services, Meyzieu-France). Les milieux filtrés sont récupérés dans des fioles d'Erlen-meyer stériles.

Notons que pour ces cultures, le pré-levain est préparé dans un milieu MRS non modifié comme décrit précédemment. Par contre le levain de bactéries ne se fera pas dans le milieu synthétique déjà décrit. Pour cette étape on utilisera plutôt un milieu MRS modifié de la façon suivante :

MRS    55,3 g/L  
Acide L-malique 4 g/L  
Ethanol 6 % (v/v)  
pH= 3,5

## II-2 Méthodes

### II-2-1 Cultures de micro-organismes

#### II-2-1-1 Cultures pures

##### a- Fermentation alcoolique (FA)

Les fermentations alcooliques menées par les différentes souches de levure *S. cerevisiae* se font en 3 étapes. La première étape consiste à réactiver les levures dans un milieu YEPD liquide pendant 24 h. On obtient ainsi notre pré-levain. La deuxième étape consiste à transférer un volume de 2 mL dans 50 mL de milieu synthétique (50 g/L de glucose) ce qui va constituer notre levain. 24 h après, on passe à la troisième étape qui consiste à transférer dans le milieu synthétique jus de raisin (200 g/L de sucre) un certain volume du levain, calculé de façon à obtenir un inoculum initial de  $3 \times 10^6$  cellules/mL au début de la fermentation alcoolique. Cette étape représente notre culture proprement dite. Ces 3 étapes se font dans un incubateur dont la température est réglée à 22°C et la vitesse d'agitation à 150 tours/min. La croissance des levures est contrôlée en réalisant deux prélèvements par jour et leur cinétique de croissance est ainsi suivie en mesurant à chaque prélèvement des paramètres qui sont détaillés plus tard.

##### b- Fermentation malolactique (FML)

Le principe est le même que celui détaillé pour les levures sauf que les bactéries sont réactivées dans un bouillon MRS et que pour le suivi de la cinétique un prélèvement par jour suffit. De plus au début de la culture (milieu synthétique jus de raisin ou milieu synthétique vin) on doit avoir une concentration initiale de  $2 \times 10^6$  cellules/mL.

##### c- Fermentations séquentielles

Pour la réalisation des fermentations séquentielles, les FA menées par les différentes souches de levure comme décrit précédemment, sont tout d'abord suivies jusqu'à consommation totale des sucres ou arrêt de consommation (concentration restante inférieure à 2 g/L) qui correspond en fait à la fin de la fermentation alcoolique. Ceci peut être évalué rapidement à l'aide d'un papier Clinistix (Bayer Diagnostics, Puteaux-France) qui sert à tester qualitativement le taux de sucre restant dans le milieu par changement de couleur. L'évolution de la concentration des sucres dans le milieu est ensuite mesurée quantitativement par le test de DNS (cf partie II-2-2-5 de ce chapitre) réalisé sur les

différents échantillons prélevés au cours de la fermentation alcoolique. Les milieux préfermentés par les levures sont par la suite préparés avant d'être inoculés par les bactéries. Pour cela, ces milieux sont tout d'abord centrifugés (2000 tours/min pendant 20 minutes à 4°C) dans le but d'éliminer les levures et de récupérer les surnageants. Ensuite la concentration d'acide malique est mesurée et réajustée à 5 g/L. Le milieu provenant de chaque fermentation alcoolique est divisé en 2 lots. L'un des deux est additionné de 200 mg/L d'Optired® ; complément nutritionnel riche en mannoprotéines fourni par Lallemand Inc. Finalement le pH est ajusté à 3,5 et les différents milieux sont filtrés stérilement à travers des membranes d'acétate de cellulose présentant un seuil de coupure de 0,2 µm (Sartorius, Goettingen-Allemagne). Les milieux filtrés sont récupérés dans des fioles d'Erlen-meyer stériles et sont inoculés par les bactéries ( $2 \times 10^6$  cellules/mL). La fermentation malolactique est suivie jusqu'à l'arrêt de consommation d'acide malique. Elle est en générale considérée comme achevée quand la concentration d'acide malique devient inférieure à 0,5 g/L.

Les couples levures-bactéries étudiés en fermentation séquentielle sont les suivants :

- *Saccharomyces cerevisiae* souche A/ *Oenococcus oeni* souche X.
- *Saccharomyces cerevisiae* souche B/ *Oenococcus oeni* souche X.
- *Saccharomyces cerevisiae* souche C/ *Oenococcus oeni* souche X.
- *Saccharomyces cerevisiae* souche D/ *Oenococcus oeni* souche X.
- *Saccharomyces cerevisiae* souche B/ *Oenococcus oeni* souche Y.
- *Saccharomyces cerevisiae* souche C/ *Oenococcus oeni* souche Y.
- *Saccharomyces cerevisiae* souche D/ *Oenococcus oeni* souche Y.

### II-2-1-2 Cultures mixtes

Les cultures mixtes sont réalisées dans le bioréacteur à membrane (BRM). Le réservoir contenant la membrane est inoculé par les levures alors que l'autre estensemencé avec les bactéries tout en respectant les concentrations initiales qui doivent être de  $3 \times 10^6$  cellules/mL pour les levures et de  $2 \times 10^6$  cellules/mL pour les bactéries. Ainsi les deux micro-organismes sont séparés physiquement et ne peuvent pas être mélangés et ceci grâce à la membrane dont le seuil de coupure est de 0,1 µm. Seules les substances solubles sont mélangées uniformément dans les deux réservoirs.

Le milieu de culture utilisé est le milieu synthétique jus de raisin présentant un volume total de 4 L (2 L/réservoir). Dans le but de réduire au maximum les réactions de Maillard qui engendrent des molécules toxiques pour les bactéries (ex : furanes), les différents solutés constituant ce milieu sont répartis de la façon suivante dans les 2 réservoirs avant autoclavage :

- Réservoir avec membrane : glucose (200 g/L), fructose (200 g/L), acide citrique (0,3 g/L), acide L-malique (5 g/L), acide L-tartrique (5g/L) ; pH ajusté à 3,5.

- Réservoir sans membrane : extrait de levure (1 g/L), sulfate d'ammonium (2 g/L), sulfate de magnésium (0,4 g/L), dihydrogénophosphate de potassium (5 g/L) ; pH ajusté à 3,5.

Après autoclavage, le BRM est monté et les deux réservoirs sont connectés à l'aide d'une tuyauterie métallique et le mélange se fait pendant 6 h pour bien homogénéiser le milieu dans les deux réservoirs avant d'inoculer les micro-organismes.

La croissance de ces deux microorganismes est suivie en réalisant des prélèvements chaque 24 h pour les bactéries et chaque 12 h pour les levures.

Les couples levures-bactéries étudiés en culture mixte sont les suivants :

- *Saccharomyces cerevisiae* souche A/ *Oenococcus oeni* souche X.
- *Saccharomyces cerevisiae* souche C/ *Oenococcus oeni* souche X.
- *Saccharomyces cerevisiae* souche D/ *Oenococcus oeni* souche X.

## II-2-2 Méthodes analytiques

### II-2-2-1 Enumération des cellules

Pour l'énumération des cellules de micro-organismes, deux hématocymètres différents sont utilisés : la cellule de Thoma pour les levures et le Petit Salumbeni pour les bactéries. Ces hématocymètres sont constitués d'une lame microscopique plane divisée en trois portions : 2 latérales et une centrale (cf Fig. II-1). La portion centrale porte un quadrillage de dimensions connues comportant 256 petits carrés de 1/20mm de côté. Ces 256 petits carrés sont regroupés en 16 grands carreaux (cf Fig. II-2). Sur les deux épaulements latéraux, on place une lamelle qui laisse un intervalle de 0,1 mm pour la cellule de Toma et de 0,04 mm pour celle du Petit Salumbeni avec la portion centrale.

Chaque comptage est réalisé à partir de 5 grands carreaux de la cellule. Il faut compter au moins 150 cellules au total sur chaque lame pour obtenir un pourcentage d'erreur inférieur à 10 %. Si on obtient un nombre inférieur à 150 il faut alors compter les 16 carreaux et si au contraire on obtient un très grand nombre de cellules il faut diluer l'échantillon.

La concentration des cellules est donnée par les formules suivantes :

- Pour les levures :

$$X \text{ (cellules/mL)} = (\text{nb de cellules comptées}) / (\text{nb de grands carreaux comptés}) \times D \times 0,25 \times 10^6$$

- Pour les bactéries :

$$X \text{ (cellules/mL)} = (\text{nb de cellules comptées}) / (\text{nb de grands carreaux comptés}) \times D \times 6,25 \times 10^5$$

Avec D = Facteur de dilution

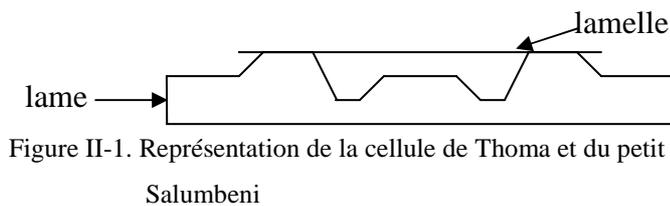


Figure II-1. Représentation de la cellule de Thoma et du petit Salumbeni

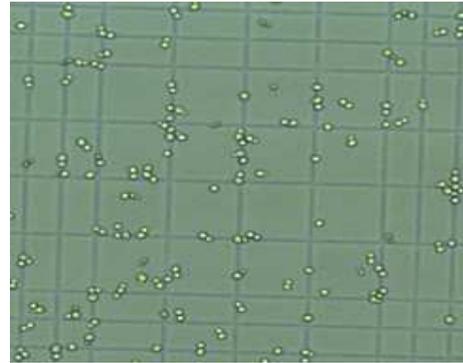


Figure II-2. Vue microscopique d'un grand carreau de la cellule de Thoma renfermant des levures

### II-2-2-2 Viabilité des levures

La viabilité des levures est évaluée par comptage après coloration au bleu de méthylène (Lange *et al.* 1993). La suspension est mélangée volume à volume avec une solution de bleu de méthylène (0,1 g de bleu de méthylène dans un litre de solution de citrate de sodium à 2 %). Après 10 min de contact, les cellules sont comptées au microscope. Les cellules viables apparaissent incolores alors que les mortes sont colorées en bleu. En fait il existe deux hypothèses qui expliquent ce mode de coloration:

- les cellules mortes ont une membrane fragilisée perméable au bleu de méthylène.
- Le bleu de méthylène pénètre dans toutes les cellules mais les viables le réduisent grâce à leur déshydrogénase. Celle-ci semble la plus probable.

Les résultats seront exprimés en pourcentage de cellules viables calculé par rapport au nombre total de cellules comptées sur la lame.

### II-2-2-3 Mesure de la densité optique

La mesure de la densité optique (D.O) est faite au spectrophotomètre à 620 nm dans des cuvettes en verre de 2 mm d'épaisseur pour les levures et dans des cuvettes en plastique de 1 cm d'épaisseur

pour les bactéries. Pour que la corrélation entre la D.O et la concentration des cellules soit linéaire, il faut que l'absorbance reste inférieure ou égale à 0,8 sinon il faut diluer.

#### **II-2-2-4 Mesure du poids sec**

##### **a-Mesure du poids sec des levures**

La mesure du poids sec des levures est réalisée à l'aide d'une thermobalance (Precisa, Dietikon-Suisse). A chaque prélèvement, un volume de l'échantillon est déposé dans la thermobalance qui va chauffer et entraîner une évaporation de l'eau contenue dans cet échantillon. Le poids de l'échantillon va donc diminuer progressivement au cours de l'évaporation de l'eau jusqu'à stabilisation de sa valeur qui correspond à la perte de la totalité de l'eau contenue dans l'échantillon et donc à la valeur de son poids sec. Notons que les échantillons doivent être centrifugés pour éliminer le surnageant. Seul le culot est récupéré et lavé deux fois à l'eau distillée par centrifugation pour bien éliminer les substrats résiduels. Il est par la suite resuspendu dans de l'eau distillée avant de le passer à la thermobalance. Les résultats sont exprimés en g/L.

##### **b- Mesure du poids sec des bactéries**

La mesure du poids sec des bactéries est réalisée par filtration sous vide. Des membranes d'acétate de cellulose de 0,2 µm de seuil de coupure sont utilisées à cet effet (Sartorius, Goettingen-Allemagne). Elles sont tout d'abord mises dans des coupelles et déshydratées pendant 24 h dans l'étuve à 100°C et leur poids est ensuite mesuré. Après filtration d'un volume donné de l'échantillon de bactéries, elles sont à nouveau déshydratées pendant 24 h à 100°C et leur poids est à nouveau mesuré. La différence de poids avant et après filtration de l'échantillon correspond au poids sec des bactéries. Les résultats sont exprimés en g/L.

#### **II-2-2-5 Dosage du sucre restant dans le milieu par la méthode de DNS**

Cette méthode établie par Miller (1959) est utilisée pour suivre la consommation de sucre pendant les fermentations. Les sucres principaux dans le jus de raisin sont le fructose (cétose) et le glucose (aldose) qui sont des sucres réducteurs. Cette méthode teste la présence de groupements carbonyles libres (C=O).

Le DNS ou réactif dinitrosalicylique est préparé de la façon suivante :

- 2,5 g d'acide 3,5-dinitrosalicylique
- 75 g de sodium potassium tartrate
- 4 g d'hydroxyde de sodium

Ces différents constituants sont dissouts suivant l'ordre indiqué dans 250 mL d'eau distillée. Le réactif est conservé à l'obscurité à 4°C et présente une durée de vie de 15 jours.

Une gamme étalon de sucre doit être préparée à partir d'une solution mère de 2 g/L constituée de 50 % glucose et de 50 % fructose. Suite à différentes dilutions, la gamme utilisée présentera les concentrations finales suivantes : 0; 0,5; 1; 1,5 et 2 g/L.

Puisque la concentration de sucre au début de la fermentation est de 200 g/L, on doit diluer les différents échantillons prélevés de façon à ne pas dépasser la limite supérieure de notre gamme étalon soit 2 g/L de sucre. Après dilution, on prend 1 mL de chaque échantillon et on leur ajoute 1 mL de DNS et on vortexe bien avant d'incuber les tubes au bain-marie 5 minutes à 100°C. Les tubes sont par la suite refroidis dans un bain de glace et additionnés de 10 mL d'eau distillée. La D.O est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 540 nm et les différentes concentrations des échantillons sont déterminées à partir de la gamme étalon.

#### **II-2-2-6 Dosage du SO<sub>2</sub> ou anhydride sulfureux**

Le SO<sub>2</sub> synthétisé par les levures au cours de la FA est dosé par iodométrie suivant la méthode de Ripper (Recueil des méthodes analytiques de l'OIV, 1974).

Les réactifs nécessaires à ce dosage sont les suivants :

- Iode N/100
- Amidon
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dilué au 1/3
- Potasse 1N

Pour la préparation de l'empois d'amidon, on procède de la façon suivante :

5 g d'amidon sont pesés auxquels on ajoute 10 g de NaCl. L'ensemble est dissout dans 100 mL d'eau distillée. Le mélange est porté à ébullition pendant 10 minutes, ensuite il est refroidi avant utilisation.

Ce dosage est divisé en deux étapes :

- **1<sup>ère</sup> étape : dosage du SO<sub>2</sub> libre**

Dans cette étape, on ajoute à 50 ml du moût 2 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> puis 2 mL d'empois d'amidon et on dose à l'iode jusqu'à coloration bleu- violet. Soit v le volume d'iode versé à l'équivalence.

- **2<sup>ème</sup> étape : dosage du SO<sub>2</sub> total**

On ajoute à 50 ml de moût, 15 mL de potasse 1N et on laisse agir 10 minutes. La potasse va libérer le SO<sub>2</sub> combiné aux aldéhydes. Ensuite, 5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et 2 ml d'empois d'amidon sont ajoutés successivement. On dose à l'iode jusqu'à coloration bleu-violet. Soit v', le volume versé à l'équivalence.

D'après la réaction suivante :



On a à l'équivalence:

$$\begin{aligned} n(\text{I}_2) &= n(\text{SO}_2) & n &= \text{nombre de moles} \\ \text{CV}(\text{I}_2) &= \text{CV}(\text{SO}_2) & C &= \text{molarité (mole/L)} \\ & & V &= \text{volume (mL)} \end{aligned}$$

On déduit alors la concentration de SO<sub>2</sub> produit par les levures. Les résultats sont exprimés en mg/L.

### II-2-2-7 Dosage du glycérol et de l'éthanol par HPLC

L'éthanol et le glycérol synthétisés par la levure au cours de la FA sont dosés par HPLC. La colonne utilisée est une Aminex<sup>®</sup> HPX-87H Biorad (garnissage cationique H<sup>+</sup>) de dimension 30 cm x 7,8 mm, thermostatée à 40°C, précédée d'une colonne de garde Biorad (H<sup>+</sup>). Le solvant est une solution de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM élué à un débit de 0,4 mL/min par une pompe P1000XR Thermo Separation Products. Le système est également composé d'un injecteur automatique AS100 avec une boucle d'injection de 20 µL, un réfractomètre IV de Thermo Separation Products et un ordinateur pour l'acquisition des données. Le logiciel Borwin V 1,2 permet de calculer la surface des pics détectés. Les concentrations sont calculées par rapport à une gamme étalon d'éthanol et de glycérol et sont exprimées en g/L.

### II-2-2-8 Dosage des acides gras par Chromatographie Gazeuse (GC)

Le dosage des acides gras par GC a été sous-traité à la Faculté d'œnologie de l'Université Victor Segalen, Bordeaux II. Les résultats sont exprimés en mg/L.

### II-2-2-9 Dosage des protéines par la méthode de Lowry

#### Principe du dosage :

La méthode consiste à former un complexe entre les liaisons peptidiques et le sulfate de cuivre en milieu alcalin. Ce complexe réduit alors les acides phosphomolybdiques et phosphotungstiques du réactif Phénol-Folin-Ciocalteu pour donner un second complexe de couleur bleu, mesuré au spectrophotomètre (Frolund *et al.* 1995).

#### Consommables :

##### Réactif A :

[Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>] = 20 g/L.

[NaOH] = 0,1 N.

[C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>KNaO<sub>6</sub>, 4H<sub>2</sub>O] = 1 g/L. (Tartrate de potassium et de sodium)

##### Réactif B :

[CuSO<sub>4</sub>, 5H<sub>2</sub>O] = 5 g/L.

**Réactif de Lowry :** 50 mL de A + 5 mL de B.

**Réactif de Folin-Ciocalteu :** Ce réactif est prêt à l'emploi et il doit être dilué au ½ avant utilisation.

#### Gamme étalon de BSA :

Cette gamme est préparée à partir d'une solution mère de BSA de 500 mg/L : 0, 50, 125, 250, 375 et 500 mg/L.

### **Méthode de dosage :**

Ajouter à chaque tube :

- 0,5 mL des échantillons à doser et des différentes solutions étalons (eau distillée pour le blanc).
- 2 mL du réactif de Lowry. Vortexer et laisser reposer 10 minutes.
- 0,2 mL du réactif de Folin-Ciocalteu. Vortexer et laisser reposer à l'obscurité pendant 30 minutes.

La D.O est ensuite mesurée à 691 nm et la gamme étalon est établie.

Les concentrations des différents échantillons calculées par rapport à la gamme étalon sont exprimées en mg/L.

## **II-2-2-10 Dosage des mannoprotéines**

### **Principe du dosage**

Ce dosage consiste à faire précipiter les polysaccharides contenus dans le surnageant d'un milieu par addition d'acide chlorhydrique et d'éthanol. Le surnageant est ensuite filtré à travers des membranes de filtration et le rétentat pesé (Vinidea.net-Wine Internet Technical Journal, 2002).

### **Consommables**

HCl à 36 %.

Ethanol à 95 %.

### **Méthode de dosage :**

- centrifuger 20 mL du milieu à analyser à 12000 g pendant 10 minutes.
- récupérer le surnageant dans une fiole d'Erlen-meyer de 100 mL.
- précipiter les polysaccharides en ajoutant 4 mL de HCl à 36 % dilués 1:1 et 80 mL d'éthanol à 95 %.
- agiter à 4°C pendant 24 à 48 h.
- sécher des filtres d'acétate de cellulose de 0,45 µm de seuil de coupure (Sartorius, Goettingen-Allemagne) à l'étuve à 40°C pendant 30 minutes et peser (P<sub>1</sub>).
- réaliser une filtration sous vide du milieu à analyser à travers ces membranes après précipitation des polysaccharides.
- sécher de nouveau à l'étuve à 40°C pendant 30 minutes et peser les filtres séchés (P<sub>2</sub>).

$$[\text{Polysaccharides totaux (mg/L)}] = (P_2 - P_1) / V_{\text{milieu}}$$

## **II-2-2-11 Caractérisation préliminaire d'un agent protéique responsable de l'inhibition de la FML dans les milieux préfermentés par certaines souches de levures *S. cerevisiae***

### **a- Traitements thermiques et enzymatiques des milieux préfermentés par les levures**

#### **a-1 Traitements thermiques**

La sensibilité de l'agent inhibiteur à la chaleur est testée en traitant les milieux préfermentés par les levures de la façon suivante :

- Les milieux préfermentés sont tout d'abord centrifugés et leur surnageant récupéré.
- Le traitement thermique est réalisé pendant 30 minutes dans un bain-marie thermostaté à 100°C ou bien par autoclavage (120°C/20 minutes).
- La concentration d'acide malique est réajustée à 5 g/L et 200 mg/L d'Optired<sup>®</sup> sont ajoutés.
- Le pH est réajusté à 3,5 à l'aide d'une solution NaOH 10M.
- Les milieux sont filtrés stérilement à travers des filtres de 0,2 µm de seuil de coupure (Elvetec services, Meyzieu-France) et récupérés dans des fioles d'Erlen-meyer stériles.

#### **a-2 Traitements enzymatiques**

La sensibilité de l'agent inhibiteur à l'activité protéasique de certains enzymes est testée de la façon suivante :

- Les milieux préfermentés sont tout d'abord centrifugés et leur surnageant récupéré.
- 4 enzymes sont testés : la pepsine, la trypsine, la chymotrypsine et la protéase XIV. Le pH de chaque milieu doit être réajusté au pH optimal d'activité de chaque enzyme (2 pour la pepsine, 7,6 pour la trypsine, 7,8 pour la chymotrypsine et 7,5 pour la protéase XIV). Pour augmenter le pH, une solution de NaOH 10 M est utilisée, et pour l'abaisser, on utilise une solution d'acide orthophosphorique à 85 %. Ensuite les enzymes sont ajoutés de façon à avoir 10 µg/µL d'enzyme dans chaque milieu et les milieux sont incubés 1h à 37°C.
- A la fin du traitement enzymatique, la concentration d'acide malique est réajustée à 5 g/L et 200 mg/L d'Optired<sup>®</sup> sont ajoutés.
- Le pH est réajusté à 3,5 à l'aide d'une solution NaOH 10 M pour le milieu traité avec la pepsine et à l'aide de la solution d'acide orthophosphorique 85 % pour les autres.
- Les milieux sont filtrés stérilement à travers des filtres de 0,2 µm de porosité (Elvetec services, Meyzieu-France) et récupérés dans des fioles d'Erlen-meyer stériles.

Suite à ces traitements thermiques et enzymatiques, les milieux sont inoculés par les bactéries ( $2 \times 10^6$  cellules/mL). Le suivi de la FML et sa comparaison avec celle réalisée dans les milieux préfermentés non traités nous permettra de voir si les traitements thermiques et enzymatiques vont lever l'inhibition.

## **b- Méthode des puits (Well plate test)**

### **Principe du test**

Ce test consiste à évaluer l'effet inhibiteur du surnageant des milieux préfermentés par les levures sur gélose. Ces surnageants sont introduits dans des puits creusés dans la gélose contenant les bactéries. Les molécules inhibitrices vont diffuser de façon radiale autour des puits et l'inhibition va se manifester par une zone claire autour du puits (le halo d'inhibition) par rapport au fond bactérien dense sur le reste de la boîte. Le diamètre de cette zone est mesuré et constitue notre unité de mesure.

### **Mode opératoire**

Pour réaliser ce test, une culture d'une quinzaine d'heures de la bactérie sensible à l'inhibition est réalisée sur un milieu MRS (cf partie II-1-2 de ce chapitre). D'autre part le milieu gélosé est préparé de la façon suivante :

- 55,3 g/L de MRS
- 12 g/L d'agar
- 5 g/L d'acide malique

Après autoclavage ( $120^\circ\text{C}/15$  min), le milieu est refroidi dans un bain-marie thermostaté à  $45^\circ\text{C}$  avant d'ajouter la souche de bactérie en question de façon à avoir une D.O initiale de 0,002 qui correspond à une concentration initiale de  $2 \times 10^6$  cellules/mL. Le milieu est par la suite coulé dans les boîtes de Pétri et des puits de 5 mm de diamètre sont coupés dans la gélose (2 puits/boîte). Ces puits sont remplis par 40  $\mu\text{L}$  du milieu préfermenté par la levure inhibitrice filtrés stérilement à travers des membranes de 0,2  $\mu\text{m}$  de seuil de coupure (Elvetec services, Meyzieu-France) avant utilisation. Un des deux puits est rempli par le milieu non traité et l'autre par le milieu traité (traitement thermique ou enzymatique). Les boîtes sont ensuite incubées pendant approximativement 12h au réfrigérateur à  $4^\circ\text{C}$ . Cette étape sert à ralentir la croissance des bactéries laissant le temps à la protéine de diffuser dans la gélose avant l'obtention d'une forte croissance bactérienne. Finalement les boîtes sont incubées 12 h à  $30^\circ\text{C}$ .

## c- Précipitation différentielle des protéines au sulfate d'ammonium

### Principe de cette technique

Cette technique utilise la solubilité différentielle des protéines. Comme chaque protéine est plus ou moins soluble selon sa composition, on peut en séparer plusieurs en fonction de leur tendance à précipiter plus ou moins vite quand on change la force ionique de la solution qui les contient.

Une force ionique élevée peut avoir deux effets sur la solubilité : neutraliser certaines charges ioniques requises en surface pour le maintien de la solubilité, et entraîner une compétition avec les protéines vis-à-vis des molécules d'eau disponibles en solution. Quand la concentration en sel est assez élevée pour priver une protéine des molécules d'eau qui l'hydratent, celle-ci sort de solution et précipite. C'est ce qu'on appelle le phénomène de *salting-out*.

Les protéines sont pour la plupart précipitées par une teneur en sel assez élevée, mais certaines d'entre elles seront remarquablement résistantes alors que d'autres précipitent très facilement. C'est cette différence de solubilité qui permet de les séparer.

Le sel le plus utilisé en laboratoire pour précipiter les protéines est le sulfate d'ammonium. Sa solubilisation n'affecte pas la température de la solution, il ne dénature pas les protéines et ne coûte pas cher.

### Mode opératoire

Les milieux préfermentés par les levures sont tout d'abord centrifugés pour récupérer le surnageant (2000 tours/min, 20 minutes, 4°C). 200 mL de surnageant sont utilisés pour précipiter les protéines au sulfate d'ammonium. Afin d'atteindre un niveau de saturation de 60 % à 0°C, et sachant que dans les milieux préfermentés par les levures, le sulfate d'ammonium résiduel est négligeable, une quantité de 361 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  doit être ajoutée, soit 72,2 g dans les 200 mL. Le sulfate d'ammonium est ajouté progressivement pendant 1h avec une agitation continue qui va durer 5h. Cette étape se fait à 4°C.

Ensuite, le milieu est centrifugé à 11000g pendant 30 minutes à 4°C. Le culot de protéines obtenu est resuspendu dans 20 mL de tampon phosphate (M/15, pH=4,8) et notre échantillon est ainsi 10 fois concentré.

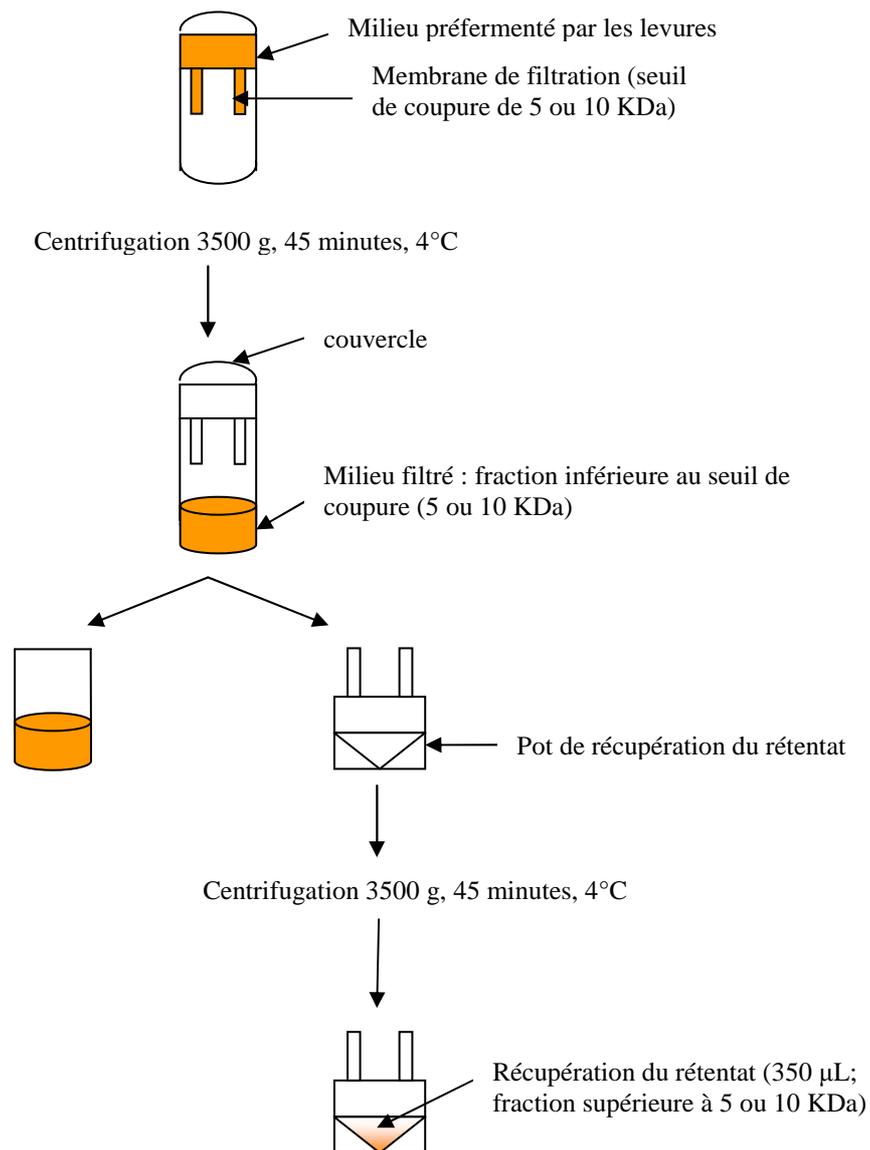
## **d- Ultrafiltration des milieux préfermentés par les levures**

### **Principe de l'ultrafiltration**

L'ultrafiltration consiste à fractionner les milieux préfermentés par les levures en séparant leurs différents constituants suivant leur poids moléculaire et ceci grâce à l'utilisation de membranes présentant différents seuils de coupure. Elle entraîne aussi une concentration du rétentat calculée par rapport au volume initial filtré et au volume final retenu par la membrane. Le passage des constituants d'un côté à l'autre de la membrane est obtenu par une différence de pression. L'ultrafiltration est généralement du type tangentielle, c'est-à-dire que le fluide circule parallèlement à la membrane contrairement à la filtration classique qui est dite frontale. La filtration tangentielle permet de limiter l'accumulation de dépôts qui obturent la surface de filtration.

### **Mode opératoire**

Le fractionnement et la concentration des milieux préfermentés par les levures sont réalisés à l'aide de modules d'ultrafiltration (cf figure II-3) munis de membranes présentant différents seuils de coupure. La séparation des constituants de ces milieux suivant leur poids moléculaire se fait grâce à la force tangentielle de centrifugation. Nous avons utilisé deux modules d'ultrafiltration Centricon Plus 70 (Millipore), présentant des seuils de coupure de 5 KDa (UFC 700508) et de 10 KDa (UFC 701008) qui nous ont permis de concentrer les fractions supérieures à 5 et 10 KDa. Le volume initial introduit dans ces modules doit être au maximum de 70 mL. Une première centrifugation se fait à 3500g pendant 45 minutes à froid. Les filtrats inférieurs aux seuils de coupure (5 et 10 KDa) sont ainsi récupérés. Pour récupérer le rétentat (fractions supérieures à 5 et 10 KDa), il faut faire une deuxième centrifugation dans les mêmes conditions. Le volume final des différents rétentats récupérés est de 350 µL et regroupe les molécules dont le poids moléculaire est supérieur à 5 ou 10 KDa. On a ainsi concentré ces fractions de 200 fois. Leur effet inhibiteur est ensuite testé dans 20 mL du milieu MRS modifié dont la composition a été déjà décrite (cf partie II-1-2 de ce chapitre). Cette étape va entraîner une dilution de ces fractions et elles seront finalement 3,5 fois concentrées. Les bactéries sont ensuite inoculées dans ces milieux et la FML est suivie. L'effet inhibiteur des différentes fractions peptidiques est évalué par rapport à un témoin réalisé dans un milieu MRS modifié mais ne contenant pas les fractions peptidiques.



**Figure II-3. Schéma illustrant les différentes étapes de l'ultrafiltration des milieux préfermentés par les levures.**

Les fractions inférieures à 5 KDa sont elles aussi testées en les dialysant à travers une membrane de 3,5 KDa de seuil de coupure dans le but d'éliminer toute autre molécule inhibitrice comme le  $\text{SO}_2$ , les acides gras, l'éthanol, etc... et de ne garder que la fraction peptidique comprise entre 3,5 et 5 KDa. La dialyse par contre ne concentre pas les échantillons comme l'ultrafiltration.

## e-Dialyse

### Principe de la dialyse

La dialyse est un procédé de séparation des différentes molécules en solution à travers une membrane poreuse utilisant le gradient de concentration comme force de séparation des différents constituants.

### Mode opératoire

La dialyse est réalisée dans des boudins de dialyse de 3,5 KDa de porosité (Cellu-Sep T1, # 5015-19, MFP Inc., Texas, Etats-Unis) contre un tampon phosphate (M/15, pH=4,8, V=1L) pendant 18 à 24 h à 4°C sous agitation. Pendant les dix premières heures, le tampon est changé toutes les heures. Avant utilisation, la membrane de dialyse doit être trempée 20 minutes dans de l'eau distillée puis bien rincée. La longueur de la membrane doit être calculée de la façon suivante :

1-Vol/cm de la membrane : 1,15 mL donc pour dialyser 20 mL il faudra une longueur de 17,4 cm.

2-Il faut ajouter 10% en cas d'expansion ou de contraction de l'échantillon

3-Il faut aussi ajouter 4 cm de chacun des deux côtés de la membrane pour les clampes.

La longueur utilisée sera de 30 cm.

Pour tester l'effet inhibiteur des fractions dialysées (poids moléculaire compris entre 3,5 et 5 KDa), on ajoute aux 20 mL :

- 55,3 g/L de MRS
- 4 g/L d'acide malique
- 10 % d'éthanol
- pH ajusté à 3,5

Ensuite, les milieux dialysés sont filtrés stérilement à travers des membranes de 0,2 µm de seuil de coupure (Elvetec services, Meyzieu-France) et sont récupérés dans des fioles d'Erlen-meyer stériles. Les bactéries sont ensuite inoculées et la FML suivie. L'effet inhibiteur de la fraction peptidique comprise entre 3,5 et 5 KDa est évalué par rapport à un témoin réalisé dans un milieu MRS modifié ne contenant pas les fractions peptidiques.

## II-2-2-12 Dosages enzymatiques

Les dosages enzymatiques suivants sont réalisés de façon automatisée à l'aide d'une machine : Mascott (Lisabio, Morangis-France). 460 µL de chaque échantillon à doser sont introduits dans des godets déposés sur un portoir. Les réactifs enzymatiques sont aussi placés dans la machine. La pompe de la machine assure le mélange des réactifs enzymatiques et des échantillons dans des cuvettes en plastique où se déroulent les différentes réactions enzymatiques. Une gamme étalon pour chaque type de dosage est préalablement réalisée et enregistrée dans le programme de dosage correspondant. Les différentes concentrations de la molécule dosée (substrat ou produit) sont calculées par rapport à la gamme étalon et directement affichées sur l'écran de la machine.

### a- Dosage enzymatique de l'acide L-malique

#### Principe du dosage

En présence de nicotinamide-adénine-dinucléotide ( $\text{NAD}^+$ ), l'acide L-malique est oxydé en oxaloacétate par la L-malate déshydrogénase (L-MDH).

L'équilibre de la réaction est situé du côté du malate. En éliminant l'oxaloacétate du milieu réactionnel, on oriente la réaction (1) dans le sens L-malate  $\longrightarrow$  oxaloacétate.

En présence du L-glutamate, l'oxaloacétate est transformé en L-aspartate (2) par la glutamate – oxaloacétate-transaminase (GOT).



La formation de  $\text{NADH}$ ,  $\text{H}^+$ , mesurée par l'augmentation de l'absorbance à la longueur d'onde de 340 nm, est proportionnelle à la quantité de L-malate consommée.

#### Composition du kit (Microdom, kit n° 110 05 011 00)

Flacon 1 (30 mL) : Tampon en solution.

Flacon 2 (6 mL) :  $\text{NAD}^+$  en solution.

Flacon 3 (0,8 mL) : Suspension de GOT

Flacon 4 (0,8 mL) : Suspension de L-MDH

Flacon 5 (4 mL) : solution standard d'acide malique 0,2 g/L.

**Reconstitution du monoréactif**

Pour 20 mL de réactif de travail : 5 mL du flacon 1

1 mL du flacon 2

0,13 mL du flacon 3

0,13 mL du flacon 4

14 mL d'eau distillée.

Ce monoréactif se conserve  
3 jours à 4/6°C.

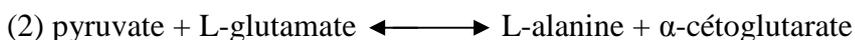
Une gamme étalon d'acide L-malique allant de 0 à 6 g/L a été préalablement introduite au programme de dosage de cet acide.

**b- Dosage enzymatique de l'acide L-Lactique****Principe du dosage**

En présence de nicotinamide-adénine-dinucléotide ( $\text{NAD}^+$ ), l'acide L-Lactique est oxydé en pyruvate par la L-lactate déshydrogénase (L-LDH). L'équilibre de la réaction se situe du côté du lactate.

En éliminant le pyruvate du milieu réactionnel, on oriente la réaction (1) dans le sens  
lactate  $\longrightarrow$  pyruvate.

En présence du L-glutamate, le pyruvate est transformé en L-alanine grâce à la glutamate-pyruvate-transaminase (GPT) (2)



La formation de  $\text{NADH, H}^+$ , mesurée par l'augmentation de l'absorbance à la longueur d'onde de 340 nm, est proportionnelle à la quantité de L-lactate consommée.

**Composition du kit (Microdom, kit n° 110 05 020 00)**

Flacon 1 : Tampon

Flacon 2 : GPT lyophilisé

Flacon 3 : Suspension de L-LDH

## Reconstitution des réactifs

Dissoudre 3 flacons de GPT lyophilisé avec 2 mL de tampon chacun et puis les mélanger

Ajouter 60  $\mu\text{L}$  de L-LDH

Ajouter 12 mL d'eau déminéralisée

Durée de conservation : 3 jours.

Une gamme étalon d'acide L-lactique allant de 0 à 4 g/L a été préalablement introduite au programme de dosage de cet acide.

## c- Dosage enzymatique de l'acide D-Lactique

### Principe du dosage

En présence de D-lactate déshydrogénase (D-LDH), l'acide D-lactique est oxydé en pyruvate par la nicotinamide-adénine-dinucléotide ( $\text{NAD}^+$ ).



L'équilibre de la réaction (1) se situe du côté du D-lactate. En présence du L-glutamate, le pyruvate est transformé en L-alanine (2) par la glutamate-pyruvate-transaminase (GPT). On oriente la réaction (1) dans le sens lactate  $\longrightarrow$  pyruvate et  $\text{NADH}, \text{H}^+$ .



La quantité de  $\text{NADH}, \text{H}^+$  formée au cours de la réaction (1), est proportionnelle à la quantité d'acide D-lactique. L'augmentation de l'absorbance est mesurée à la longueur d'onde de 340 nm.

### Composition du kit (Microdom kit n° 110 05 025 00)

Flacon 1 : Tampon Good (100 mL)

Flacon 2 : Solution Blanc Echantillon (100 mL)

Flacon 3 : lyophilisat ( $\text{NADP/ATP}$ ) (5x Flacon 3)

Flacon 4 : Suspension de D-lactate-déshydrogénase (2,5 mL)

Flacon 5 : solution standard d'acide D-lactique (0,6 g/L ; 10 mL)

## Reconstitution du réactif

Dissoudre un flacon de lyophilisat (NADP/ATP) dans 20 mL de tampon Good. Agiter délicatement jusqu'à dissolution complète (stabilité : 1 semaine entre 4 et 8 °C).

Pour la préparation de 44 mL de monoréactif, mélanger :

- 20 mL de (NADP/ATP)
- 0,5 mL de D-LDH Conservation 2 semaines entre 4 et 8°C
- 20 mL de solution blanc échantillon
- 3,5 mL d'eau distillée

Une gamme étalon d'acide D-lactique allant de 0 à 0,6 g/L a été préalablement introduite au programme de dosage de cet acide.

## d-Dosage enzymatique de l'azote ammoniacal

### Principe du dosage

En présence de glutamate déshydrogénase (GIDH) et de nicotinamide-adénine-dinucléotide (NADH, H<sup>+</sup>), l'azote ammoniacal est transformé en L-glutamate par le 2-oxoglutarate qui oxyde la NADH, H<sup>+</sup>.



La détermination est basée sur la formation de NAD<sup>+</sup>. La diminution de l'absorbance est mesurée à la longueur d'onde de 340 nm. La quantité de NADH, H<sup>+</sup> oxydée en NAD<sup>+</sup> au cours de la réaction est proportionnelle à la quantité d'ammoniaque (azote ammoniacal).

### Composition du kit (Microdom n° 110 05 037 00)

- 2 flacons contenant chacun 50 mL de diluant du chromogène.
- 1 flacon contenant 2,7 mL de chromogène (NADH, H<sup>+</sup>).
- 2 flacons contenant chacun 50 mL de solution de blanc échantillon.
- 1 flacon contenant 5,5 mL de starter (glutamate déshydrogénase)
- 1 flacon de 10 mL d'une solution étalon de 50 mg/L d'azote ammoniacal.

## Reconstitution du monoréactif

Pour un volume réactionnel de 21 mL :

- 0,25 mL de chromogène
  - 10 mL de diluant chromogène
  - 10 mL de solution blanc échantillon
  - 0,5 mL de starter
- Conservation deux semaines entre 4 et 8°C

Une gamme étalon d'azote ammoniacal allant de 0 à 50 mg/L a été préalablement introduite au programme de dosage de cet acide.

## e-Dosage de l'azote alpha-aminé

### Principe du dosage

En présence de o-phthaldialdéhyde/N-acétyl-L-cystéine (OPA/NAC), les groupements d'acides aminés primaires réagissent pour former des dérivés d'isoindole, stables à la longueur d'onde de 340 nm.

### Composition du kit (Microdom kit n° 110 10 110 00)

Flacon 1 : Tampon soude + acide borique + NAC (25 mL)

Flacon 2 : solution hydro-alcoolique d'OPA (20 mL)

Flacon 3 : NAC (5 microtubes)

### Reconstitution des réactifs de travail

Réactif 1 : 25 mL R1 + 1 microtube (Conservation 1 semaine à 4°C)

Réactif 2 : réactif prêt à l'emploi (Conservation 3 mois à 4°C)

Une gamme étalon d'azote alpha-aminé allant de 0 à 80 mg/L a été préalablement introduite au programme de dosage de cet acide.

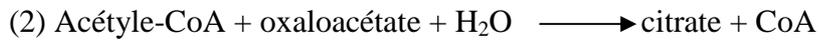
## f-Dosage enzymatique de l'acide acétique

### Principe du dosage

L'acide acétique est converti en acétyl-CoA en présence de l'acétyl-CoA synthétase (ACS), de l'adénosine-5'-triphosphate (ATP) et du coenzyme A (CoA) (1).



L'acétyl-CoA réagit avec l'oxaloacétate pour donner du citrate en présence de la citrate synthase (CS) (2).



L'oxaloacétate requis pour la réaction (2) est formé à partir du L-malate et du nicotinamide- adénine-dinucléotide ( $\text{NAD}^+$ ) en présence de la L-malate déshydrogénase (L-MDH) (3). Dans cette réaction le  $\text{NAD}^+$  est réduit en  $\text{NADH}$ ,  $\text{H}^+$ .



Le dosage est basé sur la formation de  $\text{NADH}$ ,  $\text{H}^+$  mesuré par l'augmentation de l'absorbance à 340 nm et qui est indirectement proportionnel à la concentration d'acide acétique consommé.

### Composition du kit (Boehringer Mannheim kit n<sup>o</sup> 10 148 261 035)

Flacon 1 : tampon triéthanolamine pH= 8,4, acide L-malique (134 mg), chlorure de magnésium (67 mg) contenus tous dans un volume de 32 mL.

Flacon 2 : 280 mg de lyophilisat contenant : ATP (175 mg), CoA (18 mg),  $\text{NAD}^+$  (86 mg)

Flacon 3 : 0,4 mL de suspension contenant : L-MDH (1100 U), citrate synthase (270 U)

Flacon 4 : 3 flacons de lyophilisat d'acétyl-CoA synthétase de 5 U chacun.

Le contenu du flacon 2 est dissous avec 7 mL d'eau distillée et le contenu du flacon 4 est dissous avec 4 mL d'eau distillée.

**Reconstitution des réactifs de travail**

Réactif 1 : 10 mL du flacon 1  
 2,3 mL du flacon 2  
 0,133 mL du flacon 3

Réactif 2 : 4 mL du flacon 4

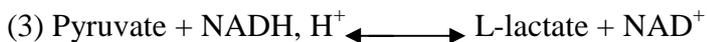
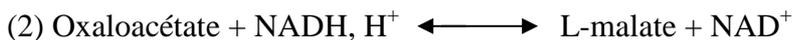
Une gamme étalon d'acide acétique allant de 0 à 1 g/L a été préalablement introduite au programme de dosage de cet acide.

**g-Dosage enzymatique de l'acide citrique****Principe du dosage**

L'acide citrique est transformé en oxaloacétate et acétate dans une réaction catalysée par la citrate-lyase (1).



En présence de L-malate déshydrogénase (2) et de L-lactate déshydrogénase (3), l'oxaloacétate et son dérivé de décarboxylation, le pyruvate, sont réduits en L-malate et en L-lactate par le nicotinamide-adenine-dinucléotide réduit (NADH).



La quantité de NADH oxydé en  $\text{NAD}^+$  est proportionnelle au citrate présent dans l'échantillon. L'oxydation du NADH est mesurée par la diminution de son absorption à la longueur d'onde de 340 nm.

**Composition du kit (Microdom n<sup>o</sup> 110 05 036 00)**

Flacon 1 : 72 mL de tampon Tris/L-LDH/L-MDH.  
 Flacon 2 : 8 mL de chromogène (solution NADH)  
 Flacon 3 : 80 mL de blanc échantillon  
 Flacon 4 : citrate lyase

Flacon 5 : 5 mL d'une solution pour l'enzyme citrate lyase

Flacon 6 : 10 mL d'une solution étalon d'acide citrique 0,8 g/L

### **Reconstitution du monoréactif de travail**

- 1- Reconstitution de la solution de travail chromogène : 18 mL de tampon + 2 mL de chromogène. Solution stable 2 semaines entre 4 et 8 °C.
- 2- Solution starter de citrate lyase : 1 flacon de citrate lyase + 1 mL de solution pour citrate lyase. Solution stable 1 semaine entre 4 et 8 °C ou 4 semaines à -20 °C.
- 3- Le monoréactif de travail est finalement préparé en mélangeant 1 mL de citrate lyase reconstitué avec 20 mL de la solution de travail chromogène.

## II-3 Calculs

Le calcul des paramètres cinétiques utilisés dans l'analyse de nos résultats (chapitre III) et de certains paramètres biochimiques sont définis dans ce qui suit :

### Paramètres cinétiques :

#### a- Paramètres cinétiques utilisés pour l'analyse des résultats des fermentations alcooliques.

**La productivité** définie comme étant la concentration de biomasse formée par unité de temps est calculée en divisant la biomasse maximale atteinte à la fin de la phase active de croissance par le temps sans prendre en considération ni la phase de latence ni la phase stationnaire. Elle est exprimée en g/L/h.

**La vitesse spécifique maximale de croissance  $\mu$  ( $\text{h}^{-1}$ )** est calculée sur Excel à l'aide d'un lisseur automatique [ $\mu = [\text{Ln}(X_2) - \text{Ln}(X_1)] / (t_2 - t_1)$ ]. Elle est constante et maximale au cours de la phase exponentielle de croissance.

**La vitesse globale de consommation du sucre** est définie comme étant la quantité totale de sucre consommée divisée par la durée de la FA. Elle est exprimée en g/L/h.

**Le rendement en poids sec** est défini comme étant le rapport de la biomasse formée sur la quantité de sucre consommée multiplié par 100. Il est exprimé en %.

**Le rendement en éthanol** est défini comme étant le rapport de la quantité d'éthanol formée sur la quantité de sucre consommée multiplié par 100. Il est exprimé en %.

**Le rendement en glycérol** est défini comme étant le rapport de la quantité de glycérol formée sur la quantité de sucre consommée multiplié par 100. Il est exprimé en %.

**Le rendement en acide acétique** est défini comme étant le rapport de la quantité d'acide acétique formée sur la quantité de sucre consommée multiplié par 100. Il est exprimé en %.

**La durée de la FA (h)** prend en considération le temps jusqu'à l'arrêt de consommation du sucre.

## **b- Paramètres cinétiques utilisés pour l'analyse des résultats des fermentations malolactiques.**

**La productivité (g/L/h) et la vitesse spécifique maximale de croissance  $\mu$  ( $h^{-1}$ )** des bactéries sont calculées de la même façon que pour les levures.

**La vitesse globale de consommation de l'acide malique** est définie comme étant la quantité totale d'acide malique consommée divisée par la durée de la FML. Elle est exprimée en g/L/h.

**La vitesse spécifique moyenne de consommation de l'acide malique (g/g/h)** est calculée de la façon suivante :

[Quantité d'acide malique consommée (g/L) / durée de la FML (h)] / Biomasse (g/L) présente à la fin de la FML.

**Le pourcentage d'inhibition de la vitesse de démalication (%)** est défini comme étant la réduction de la vitesse de démalication de la bactérie dans le milieu préfermenté par la levure en comparaison avec le témoin (milieu synthétique jus de raisin) et est calculé de la façon suivante :

[1- (vitesse de démalication dans le milieu préfermenté par la levure/ vitesse de démalication dans le milieu synthétique jus de raisin)] x 100.

**Le pourcentage d'activation de la démalication** est défini comme étant l'augmentation de la vitesse de démalication de la bactérie dans le milieu préfermenté par la levure en comparaison avec le témoin (milieu synthétique jus de raisin) et est calculé de la façon suivante :

[(vitesse de démalication dans le milieu préfermenté par la levure/ vitesse de démalication dans le milieu témoin) - 1] x 100.

**La durée de la FML (h)** prend en considération le temps jusqu'à l'arrêt de consommation de l'acide malique.

## **Paramètres biochimiques**

### **a- Calcul de la fraction moléculaire du SO<sub>2</sub> libre synthétisé par les levures au cours des FA**

La fraction moléculaire du SO<sub>2</sub> qui correspond à la forme toxique est calculée à l'aide de la formule suivante ([www.itv-midipyrenees.com](http://www.itv-midipyrenees.com)):

$$\text{SO}_2 \text{ moléculaire (mg/L)} = \text{SO}_2 \text{ libre (mg/L)} / (10^{(\text{pH}-\text{pK}_a)} + 1).$$

La concentration de  $\text{SO}_2$  moléculaire est calculée à  $\text{pH}=3,5$  qui correspond à la valeur du  $\text{pH}$  réajustée avant inoculation des bactéries dans les milieux préfermentés par les levures.

$\text{pK}_a(\text{SO}_2) = 2$  dans nos conditions de travail qui correspondent à une température de  $22^\circ\text{C}$  et une concentration d'éthanol comprise entre 9,7 et 11 % (v/v) dans les différents milieux préfermentés par les levures.

#### **b- Calcul de la fraction moléculaire des acides gras synthétisés par les levures au cours des FA**

La fraction moléculaire ou non-dissociée des acides gras qui correspond à leur forme toxique est calculée à l'aide de la formule de Henderson-Hasselbach:

$$\text{pH} = \text{pK}_A + \log \left( \frac{[\text{fraction ionique}]}{[\text{fraction non-dissociée}]} \right)$$

$$[\text{acide organique total}] = [\text{fraction ionique}] + [\text{fraction non-dissociée}]$$

$$\text{pH} = 3,5$$

$$\text{pK}_A(\text{acide octanoïque}) = 4,89$$

$$\text{pK}_A(\text{acide décanoïque}) = 4,9$$

$$\text{pK}_A(\text{acide dodécanoïque}) = 4,8$$

## *Chapitre III. Résultats et Discussion*



## *Partie I. Cultures pures*



## Partie I. Cultures pures

Dans cette première partie de notre étude, des cultures pures de 5 souches de *S. cerevisiae* (A, B, C, D et E) et de 3 souches d'*O. oeni* (X, Y et Z) ont été réalisées dans le milieu synthétique jus de raisin en fioles d'Erlen-meyer. Les milieux fermentés par les levures ont servi plus tard à l'inoculation des bactéries pour la réalisation des cultures séquentielles. Parmi les 3 souches de bactéries testées, on s'est surtout intéressé à la souche X dont la culture pure a été reprise dans le milieu synthétique vin en fiole d'Erlen-meyer. Cette culture avait pour but de tester l'effet inhibiteur de l'éthanol sur la croissance bactérienne de cette souche et sa démalication. Ensuite 3 cultures pures de la souche X ont été réalisées dans le bioréacteur à membrane en utilisant le milieu synthétique jus de raisin et en testant 3 conditions gazeuses différentes : air, CO<sub>2</sub> et azote. Les cultures pures des différentes souches de bactéries ont servi de témoin pour les interactions observées plus tard lors des cultures séquentielles et mixtes.

### I-1 Cultures pures des différentes souches de *S. cerevisiae* en fioles d'Erlen-meyer.

Les cultures pures des différentes souches de *S. cerevisiae* (A, B, C, D et E) ont été réalisées dans le milieu synthétique jus de raisin (cf partie II-2-1-1 du chapitre II, paragraphe a). Les milieux préfermentés par 4 de ces souches (A, B, C et D) ont servi plus tard à la réalisation des cultures séquentielles par inoculation des différentes souches d'*O. oeni*. Dans ce qui suit nous allons présenter les cinétiques de croissance et de consommation de sucre chez ces levures ainsi que le profil biochimique des milieux à la fin de la FA, établi par le dosage de certains métabolites extracellulaires relargués par les levures (éthanol, glycérol, acide acétique, SO<sub>2</sub>, acides gras, protéines totales) et par le dosage de l'azote assimilable (azote ammoniacal et alpha-aminé) et de l'acide malique consommés.

## I-1-1 Etude cinétique

### Résultats :

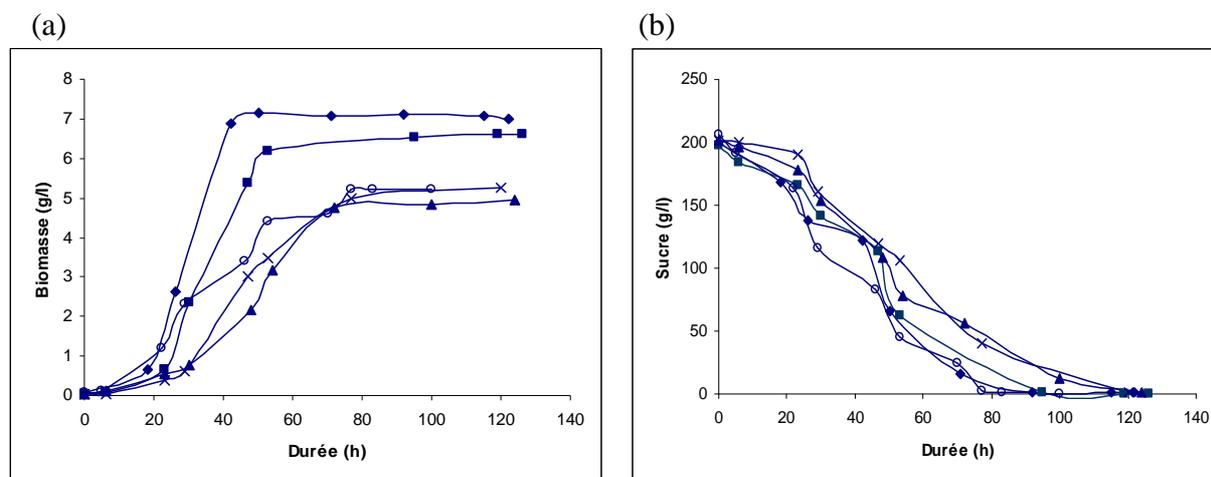


Fig. I-1 Evolution de la biomasse des différentes souches de *S. cerevisiae* (a) et de la consommation de sucre (b) au cours de la FA. (x) *S. cerevisiae* souche A, (▲) *S. cerevisiae* souche B, (■) *S. cerevisiae* souche C, (◆) *S. cerevisiae* souche D, (○) *S. cerevisiae* souche E.

**Tableau I-1. Paramètres cinétiques de la FA menée par les cinq souches de *S. cerevisiae*.**

	Souche A	Souche B	Souche C	Souche D	Souche E
Biomasse initiale (g/L)	0,04	0,03	0,054	0,062	0,07
Biomasse maximale (g/L)	5,25	4,95	6,6	7,16	5,2
Productivité (g/L/h)	0,07	0,071	0,13	0,14	0,071
Concentration cellulaire maximale (cellules/mL) x 10 <sup>6</sup>	334	275	300	398	220
Sucre initial (g/L)	201,7	201,5	197,6	200,3	206
Sucre final (g/L)	1,58	1,16	0,45	0,65	0,45
Vitesse globale de consommation du sucre (g/L/h)	1,67	1,62	1,66	1,64	2,1
Rendement en poids sec (%)	2,6	2,5	3,3	3,6	2,5
Durée de la FA (h)	120	124	119	122	100

### Discussion :

La figure I-1 nous permet de suivre les cinétiques de croissance (a) des cinq souches de *S. cerevisiae* au cours de la fermentation alcoolique ainsi que la consommation du sucre (b). Les courbes de croissance des cinq souches se caractérisent par une courte phase de latence, une phase active de croissance suivie d'une phase stationnaire. La phase de latence de courte durée s'explique par le fait que les levures s'adaptent rapidement au milieu suite aux deux étapes de précultures par lesquelles elles sont déjà passées. La phase active de croissance se caractérise par une prolifération

importante de la biomasse alors qu'en phase stationnaire le taux de bourgeonnement devient faible. Parallèlement à la croissance, nous remarquons que la consommation du sucre est plutôt continue tout au long de la fermentation. Nous constatons aussi que pour les 5 souches les phases stationnaires sont atteintes avant consommation totale du sucre ce qui est classique en vinification. Partant d'un inoculum initial presque identique (aux alentours de  $3 \times 10^6$  cellules/mL), les cinq souches ont atteint des populations finales différentes et ont présenté différentes vitesses de croissance (Tableau I-1). La souche D a atteint la biomasse maximale la plus élevée et a aussi présenté la productivité la plus élevée suivie par la souche C, alors que les 3 autres souches ; A, B et E ont atteint des biomasses maximales moins élevées mais presque identiques et ont présenté la même productivité (Tableau I-1). En terme de biomasse, les souches C et D ont présenté des biomasses maximales très proches ; 6,6 et 7,16 g/L respectivement, cependant les concentrations cellulaires correspondantes n'étaient pas aussi rapprochées ( $300 \times 10^6$  et  $398 \times 10^6$  cellules/mL respectivement). Ceci peut être dû à une différence morphologique entre ces deux souches qui se traduit par une taille plus grande des cellules de la souche C. Cette même remarque peut être faite en comparant les biomasses maximales des souches A et E (5,25 et 5,2 g/L) et leurs concentrations cellulaires correspondantes ( $334 \times 10^6$  et  $220 \times 10^6$  cellules/mL). D'ailleurs les corrélations linéaires entre la biomasse et la concentration cellulaire pour chacune des cinq souches dont les graphes sont représentés en annexes de la partie I-1 (Figures a-4, b-4, c-4, d-4 et e-4) nous permettent de déduire que pour une même concentration cellulaire, par exemple  $10^6$  cellules/mL, les biomasses correspondantes sont différentes :

Souche A : 0,016 g/L

Souche B : 0,017 g/L

Souche C : 0,022 g/L

Souche D : 0,018 g/L

Souche E : 0,024 g/L

Ceci explique également les différences entre les valeurs de biomasses initiales qui ne se traduisent pas par une différence importante au niveau des concentrations cellulaires initiales qui sont toutes d'ailleurs aux alentours de  $3 \times 10^6$  cellules/mL.

Les cinq fermentations alcooliques ont été suivies jusqu'à arrêt de consommation de sucre sans qu'on n'observe une phase de déclin. Au contraire, les levures ont gardé un pourcentage élevé de viabilité entre 70 et 95 % (cf tableaux a-1, b-1, c-1, d-1 et e-1 en annexes de la partie I-1).

La fermentation alcoolique est considérée comme achevée quand la concentration restante de sucre devient inférieure à 2 g/L ce qui est notre cas (Tableau I-1). Les profils de consommation de sucre (Fig. I-1, b) ainsi que les durées de fermentation et les vitesses globales de consommation (Tableau I-1) nous montrent que la souche E est celle qui consomme le plus rapidement le sucre alors que les souches A, B, C et D consomment moins rapidement le sucre mais présentent toutes un comportement presque identique. Cependant la souche E présente une productivité identique à celle des souches A et B mais qui est inférieure à celle des souches C et D (Tableau I-1). Ceci nous amène à la conclusion que la vitesse de consommation du sucre n'est pas directement liée à celle de croissance ni à la quantité de biomasse maximale atteinte. Cette constatation peut être expliquée par un taux de bourgeonnement plus élevé chez les souches C et D que chez la souche E ou bien par une différence de morphologie entre les souches qui se traduit dans ce cas par une taille plus grande des cellules de la souche E par rapport aux autres souches. De même, les souches A et B présentent des productivités identiques mais inférieures à celles des souches C et D. Par contre toutes les 4 présentent les mêmes vitesses globales de consommation du sucre ce qui peut aussi se traduire par une taille plus importante des cellules des souches A et B ou bien par un taux de bourgeonnement plus élevé chez les souches C et D.

Finalement, le rendement en poids sec est approximativement le même pour les souches C et D et il est un peu plus élevé que pour les trois autres souches qui présentent aussi un rendement en poids sec identique entre elles. On peut conclure que malgré les différences cinétiques déjà citées, les 5 souches présentent un comportement global semblable.

On va passer maintenant à l'étude du comportement biochimique de ces cinq souches du point de vue consommation et production de certains métabolites.

## I-1-2 Etude biochimique

## Résultats :

Tableau I-2. Profil biochimique des milieux préfermentés par les cinq souches de *S. cerevisiae*.

	Souche A	Souche B	Souche C	Souche D	Souche E
Ethanol produit (g/L)	86 ( $\pm 3$ )	81 ( $\pm 2,5$ )	77 ( $\pm 2$ )	86 ( $\pm 2,7$ )	85 ( $\pm 3$ )
Rendement en éthanol (%)	43	40	39	43	41
Glycérol produit (g/L)	6,5 ( $\pm 0,23$ )	6,9 ( $\pm 0,23$ )	6,3 ( $\pm 0,23$ )	6,7 ( $\pm 0,23$ )	6,5 ( $\pm 0,23$ )
Rendement en glycérol (%)	3,2	3,44	3,2	3,36	3,2
Acide acétique produit (g/L)	0,15 ( $\pm 0,006$ )	0,15 ( $\pm 0,006$ )	0,37 ( $\pm 0,006$ )	0,19 ( $\pm 0,01$ )	0,4 ( $\pm 0,006$ )
Rendement en acide acétique (%)	0,075	0,075	0,2	0,1	0,2
Acide L-malique consommé (g/L)	0,84 ( $\pm 0,14$ )	0,63 ( $\pm 0,11$ )	0,96 ( $\pm 0,13$ )	0,94 ( $\pm 0,1$ )	0,54 ( $\pm 0,1$ )
SO <sub>2</sub> libre (mg/L)	8,9 ( $\pm 0,6$ )	6 ( $\pm 0,4$ )	8,9 ( $\pm 0,1$ )	8,96 ( $\pm 0,8$ )	12 ( $\pm 1,2$ )
SO <sub>2</sub> moléculaire (mg/L) à pH=3,5	0,28	0,18	0,27	0,28	0,37
SO <sub>2</sub> total (mg/L)	26,7 ( $\pm 2$ )	13,44 ( $\pm 1,2$ )	28,9 ( $\pm 1,6$ )	20 ( $\pm 1,4$ )	42 ( $\pm 4,2$ )
Acide octanoïque total (mg/L)	16,7	5,7	24,8	0,7	-
Acide octanoïque moléculaire (mg/L) à pH=3,5	16	5,48	23,8	0,67	-
Acide décanoïque total (mg/L)	1,9	0,5	2,9	<0,1	-
Acide décanoïque moléculaire (mg/L) à pH=3,5	1,8	0,48	2,8	<0,096	-
Acide dodécanoïque total (mg/L)	0,2	<0,1	0,2	<0,1	-
Acide dodécanoïque moléculaire (mg/L) à pH=3,5	0,19	<0,095	0,19	<0,095	-
Azote ammoniacal initial (mg/L)	380 ( $\pm 4,54$ )	389 ( $\pm 7$ )	379 ( $\pm 4,52$ )	394 ( $\pm 12,6$ )	386 ( $\pm 7,2$ )
Azote ammoniacal final (mg/L)	0	0	0	0	0
Azote alpha-aminé initial (mg/L)	78 ( $\pm 5,54$ )	94 ( $\pm 6,11$ )	76 ( $\pm 2,7$ )	82 ( $\pm 1,13$ )	83 ( $\pm 4$ )
Azote alpha-aminé final (mg/L)	26,6 ( $\pm 3,55$ )	10,2 ( $\pm 2,34$ )	9,3 ( $\pm 1,04$ )	13,4 ( $\pm 0,62$ )	15 ( $\pm 2$ )
Protéines initiales (mg/L)	306,71 ( $\pm 22$ )	306,71 ( $\pm 22$ )	306,71 ( $\pm 22$ )	306,71 ( $\pm 22$ )	306,71 ( $\pm 22$ )
Protéines finales (mg/L)	915 ( $\pm 40$ )	1120 ( $\pm 42$ )	1023 ( $\pm 81$ )	964 ( $\pm 51$ )	1006 ( $\pm 54$ )

Notons que les gammes étalons qui ont permis le calcul des concentrations d'éthanol, de glycérol et de protéines se trouvent en annexes de la partie I-1 et que les formules qui ont permis le calcul des rendements en éthanol, glycérol et acide acétique ainsi que le calcul des fractions moléculaires du SO<sub>2</sub> et des acides gras se trouvent dans la partie II-3 du chapitre II de ce manuscrit.

(-) : Les concentrations des acides octanoïque, décanoïque et dodécanoïque n'ont pas été mesurées pour la souche E.

(<) : Les concentrations des acides gras avec le symbole <, signifient qu'elles sont inférieures à la limite détectable par le dosage réalisé en CG.

## Discussion :

D'après la réaction de Gay-Lussac, 200 g/L de sucre entraînent la formation de 102,68 g/L d'éthanol. Le rendement théorique maximal en éthanol est donc de 51 %.

Cependant, le rendement en éthanol des cinq fermentations est inférieur au rendement théorique maximal. Ceci est dû à la formation de biomasse et de certains métabolites secondaires parmi lesquels on a dosé le glycérol et l'acide acétique (cf tableau I-2). La formation du glycérol est souvent recherchée par les œnologues car il participe aux caractères organoleptiques du vin en lui conférant un goût de gras ce qui donne une rondeur en bouche. Par contre la formation d'acide acétique est indésirable puisqu'elle augmente l'acidité volatile du vin. D'ailleurs les concentrations obtenues avec les cinq souches sont faibles et acceptables par rapport aux critères œnologiques et organoleptiques puisqu'elles sont inférieures à 0,9 g/L équ  $H_2SO_4$  soit 1,1 g/L d'acide acétique (cf tableau I-2).

Les cinq souches ont consommé de faibles quantités d'acide malique à partir des 5 g/L initialement présents ce qui caractérise en général les souches de *Saccharomyces cerevisiae* (Taillandier et Strehaiano, 1991, Rainieri *et al.* 1998a, b). En effet, au pH des milieux de culture (pH=3,5), 43 % de l'acide malique ( $pK_A=3,4$ ) se trouvent sous forme moléculaire capable de diffuser librement à travers la membrane cellulaire (Bony *et al.* 1997). Ce moyen est le seul que possèdent ces levures pour consommer l'acide malique car elles sont dépourvues de malate perméase. Cependant les proportions d'acide malique consommé par les cinq souches sont inférieures à 43 % et varient entre 11 et 19 %. Ceci peut être expliqué par l'inefficacité de *S. cerevisiae* à dégrader l'acide malique. En effet, l'acide malique est principalement catabolisé chez *S. cerevisiae* par décarboxylation oxydative catalysée par l'enzyme malique de la levure (Boles *et al.* 1998). Etant donné que cet enzyme possède une faible affinité au substrat ( $K_m= 50$  mM) et qu'il est localisé dans les mitochondries qui sont peu nombreuses et dysfonctionnelles pendant la FA (Osothsilp, 1987), on peut mieux comprendre pourquoi ces souches n'ont pas pu consommer une plus grande quantité.

Certains métabolites produits par la levure au cours de la FA peuvent avoir une grande influence sur le déroulement de la FML menée plus tard par les bactéries lactiques. Parmi ces métabolites nous avons dosé l'éthanol, le  $SO_2$  et les acides gras saturés à chaîne moyenne qui sont capables d'agir de façon synergique pour inhiber les bactéries.

L'inhibition par l'éthanol a été détaillée dans la partie I-5-2 du chapitre I de ce manuscrit. Plus tard dans ce chapitre (partie I-2-2) nous allons expliquer comment l'éthanol produit par les différentes souches va participer à l'inhibition de la FML.

Concernant le  $SO_2$  endogène produit par *S. cerevisiae*, Dittrich, (1987) note qu'habituellement 10 à 30 mg/L sont produits au maximum ce qui correspond aux concentrations de  $SO_2$  total retrouvées

pour 4 de nos souches (cf tableau I-2). Néanmoins, la souche E a produit 42 mg/L de SO<sub>2</sub> total. Ceci rejoint les études de Henick-Kling et Park, (1994) qui ont constaté qu'il existe des souches qui peuvent en produire jusqu'à 100 mg/L. Nous rappelons que le SO<sub>2</sub> total peut se trouver sous sa forme libre et/ou combinée. Ceci dépend du pouvoir de combinaison du milieu (présence de composés carbonylés). Par ailleurs, le SO<sub>2</sub> libre peut se trouver sous sa forme ionique et/ou moléculaire en fonction du pH du milieu. La forme la plus active contre les micro-organismes est la forme moléculaire dont l'action inhibitrice a été décrite dans la partie I-5-2 du chapitre I de ce manuscrit. Les concentrations de SO<sub>2</sub> moléculaire données dans le tableau I-2 ont été calculées à pH=3,5 car pour la réalisation des cultures séquentielles, le pH des milieux préfermentés par les levures a été réajusté à cette valeur avant l'inoculation des bactéries (cf partie II-2-1-1 du chapitre II, paragraphe c). Parmi les cinq souches testées, la souche B est celle qui produit la plus faible quantité de SO<sub>2</sub> moléculaire alors que les quantités produites par les souches A, C et D sont un peu plus élevées et identiques et celle produite par la souche E est la plus élevée (cf tableau I-2). Cependant, ces valeurs restent inférieures aux concentrations inhibitrices retrouvées dans la littérature. En effet, Delfini et Morsiani (1992) ont trouvé qu'une concentration de SO<sub>2</sub> moléculaire supérieure à 0,5 mg/L est capable d'inhiber complètement la croissance cellulaire de 10 souches de *Leuconostoc* et de 4 souches de *Lactobacillus*. De plus, une population de *Leuconostoc* de  $2 \times 10^6$  cellules/mL était morte 22 h après addition de 0,84 mg/L de SO<sub>2</sub> moléculaire. Ceci nous laisse penser que le SO<sub>2</sub> moléculaire ne constituera pas un facteur extrêmement inhibiteur au cours des prochaines cultures séquentielles réalisées dans les milieux préfermentés par ces levures.

L'effet antimicrobien du SO<sub>2</sub> combiné est lié au fait que le catabolisme des substances liées au SO<sub>2</sub> (acétaldéhydes et d'autres composés carbonylés) par les bactéries libère une partie du SO<sub>2</sub> combiné et le rend plus actif (Somers et Wescombe, 1987). Le SO<sub>2</sub> combiné à des concentrations supérieures à 30 mg/L prolonge la phase de latence et limite la population maximale dans le vin. Ceci peut être le cas d'une croissance bactérienne dans le milieu préfermenté par la souche E dans lequel la concentration de SO<sub>2</sub> combiné correspond à 30 mg/L. Pour les autres souches la concentration du SO<sub>2</sub> combiné varie entre 7,44 mg/L (souche B) et 20 mg/L (souche C) et donc ce risque n'existe pas.

L'activité malolactique est aussi sensible à toutes les formes de SO<sub>2</sub>. A 20 mg/L de SO<sub>2</sub> combiné l'activité malolactique est réduite de 13 %, à 50 mg/L l'inhibition est de 50 % et à 110 mg/L elle est totale (Lafon-Lafourcade, 1970). On peut donc penser à une influence négative du SO<sub>2</sub> sur une FML réalisée dans des milieux préfermentés par les souches C et E.

Les acides gras saturés à chaîne moyenne (C<sub>8</sub> à C<sub>12</sub>) produits par les levures peuvent aussi avoir une influence sur le déroulement de la FML. L'action inhibitrice de ces métabolites a été décrite dans la partie I-5-2 du chapitre I de ce manuscrit. Elle est surtout due à la fraction moléculaire de ces acides

qui constitue la forme prédominante dans notre cas car le pH des milieux est inférieur aux  $pK_A$  de ces acides (cf partie II-3 du chapitre II de ce manuscrit). Les souches A et C ont produit les quantités les plus élevées d'acide octanoïque, décanoïque et dodécanoïque. Cependant, ces quantités restent inférieures aux concentrations inhibitrices retrouvées dans la littérature. En effet, 2,9 et 1,9 mg/L d'acide décanoïque ont été produits respectivement par les souches C et A mais d'après Edwards et Beelman (1987), il faut ajouter 5 à 10 mg/L d'acide décanoïque au jus de raisin pour inhiber la croissance bactérienne et la FML. L'addition de 30 mg/L est létale. Lonvaud-Funel *et al.* (1988) ont eux aussi montré que l'addition de 4 mg/L d'acide décanoïque entraîne une inhibition de la FML dans le vin. Concernant l'acide dodécanoïque, ces deux souches de levure ont produit uniquement 0,2 mg/L alors que 0,5 mg/L de cet acide sont nécessaires pour avoir une inhibition de la FML dans le vin (Lonvaud-Funel *et al.* 1988).

Malgré le fait que ces concentrations soient inférieures aux valeurs inhibitrices, leur présence simultanée avec l'acide octanoïque et les autres molécules inhibitrices peut amplifier leur effet inhibiteur et les rendre responsables d'une partie de l'inhibition rencontrée plus tard au cours des FML.

En plus des molécules potentiellement inhibitrices relarguées par les levures, nous nous sommes aussi intéressés à la composition en azote assimilable de ces milieux à la fin de la FA. En effet une limitation dans les besoins en nutriments des bactéries lactiques constitue également un facteur inhibiteur de la croissance bactérienne et de la démalication. D'après le tableau I-2, nous constatons que l'azote ammoniacal a été complètement consommé par les levures contrairement à l'azote alpha-aminé qui n'a pas été entièrement utilisé. Nous étudierons dans la partie I-2-1 de ce chapitre la consommation d'azote assimilable par les bactéries lactiques et nous verrons l'influence de ce facteur sur le déroulement de la FML. Les cinétiques de consommation de l'azote ammoniacal et alpha-aminé au cours de la FA menée par ces souches de levure sont représentées en annexes de la partie I-1.

D'après le tableau I-2, nous constatons une production de protéines par les 5 souches de levure au cours de la FA. Ces protéines peuvent inclure des fractions peptidiques de faible poids moléculaire stimulatrices de la FML (Guilloux-Benatier et Chassagne, 2003) et des macromolécules incluant des protéines et des mannoprotéines aussi stimulatrices de la FML (Guilloux-Benatier *et al.* 1993, 1995). L'action stimulatrice de ces dernières a été décrite dans la partie I-5-1 du chapitre I, paragraphe a-2. A côté de ces molécules stimulatrices, les milieux préfermentés par les levures peuvent également contenir des peptides/protéines inhibiteurs de la FML qui feront l'objet de notre étude dans la partie III de ce chapitre.

## I-2 Cultures pures des différentes souches de bactéries lactiques *O. oeni*.

Trois souches d'*O. oeni* ont été étudiées dans ce travail (X, Y et Z). Les cultures pures de la souche X réalisées dans les milieux synthétiques jus de raisin et vin en fioles d'Erlen-meyer et la culture pure de la souche Y réalisée uniquement dans le milieu synthétique jus de raisin en fiole d'Erlen-meyer (cf partie II-2-1-1 du chapitre II, paragraphe b) ont servi de référence pour les cinétiques de croissance cellulaire et de consommation d'acide malique pendant les cultures séquentielles réalisées plus tard avec ces deux souches de bactéries. La souche X a été également étudiée en culture pure dans le bioréacteur à membrane sous air, azote et CO<sub>2</sub> en utilisant le milieu synthétique jus de raisin et a servi de témoin pour les cultures mixtes réalisées dans les mêmes conditions.

### I-2-1 Caractéristiques cinétiques et biochimiques des 3 souches d'*O. oeni* pendant leur culture pure dans le milieu synthétique jus de raisin réalisée en fioles d'Erlen-meyer.

#### a-Etude cinétique

#### Résultats

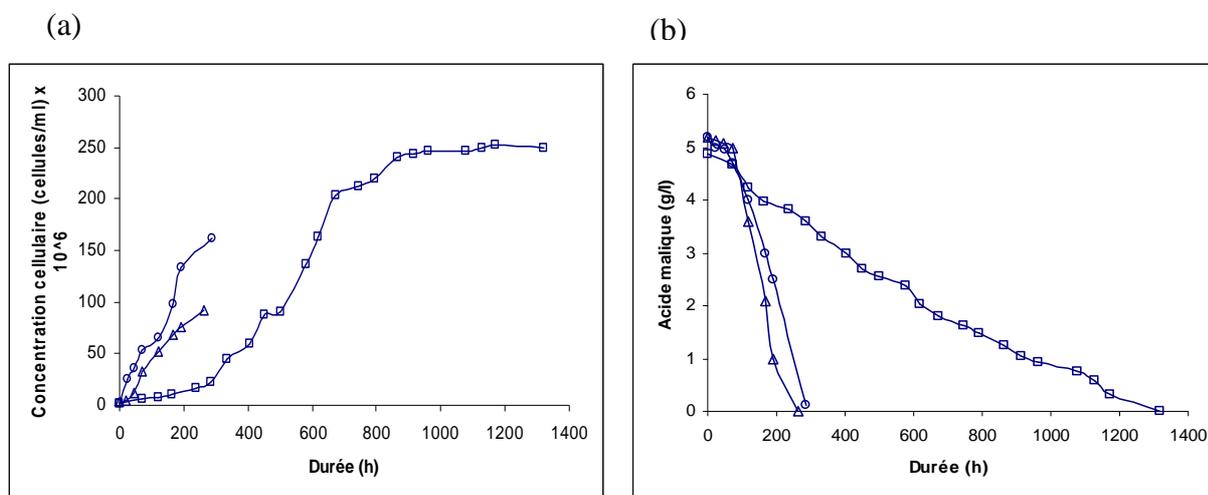


Fig. I-2 Evolution de la concentration cellulaire des 3 souches d'*O. oeni* (a) et de leur consommation d'acide malique (b) pendant leur culture pure dans le milieu synthétique jus de raisin en fioles d'Erlen-meyer. (○) *O. oeni* souche X, (□) *O. oeni* souche Y, (△) *O. oeni* souche Z.

**Tableau I-3. Paramètres cinétiques de la FML menée par les trois souches d'*O. oeni* dans le milieu synthétique jus de raisin en fioles d'Erlen-meyer.**

	Souche X	Souche Y	Souche Z
Concentration initiale (cellules/mL) x 10 <sup>6</sup>	1,9	1,8	2,6
Concentration maximale (cellules/mL) x 10 <sup>6</sup>	161,6	250	92
*Productivité (cellules/mL/h)	0,56	0,33	0,36
Vitesse spécifique maximale de croissance ; $\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )	35 x 10 <sup>-4</sup>	14 x 10 <sup>-4</sup>	40 x 10 <sup>-4</sup>
Biomasse maximale (g/L)	0,7	0,1	0,6
acide malique initial (g/L)	5,2	4,9	5,2
acide malique final (g/L)	0	0	0
Vitesse globale de consommation de l'acide malique (g/L/h)	18 x 10 <sup>-3</sup>	3,7 x 10 <sup>-3</sup>	20 x 10 <sup>-3</sup>
Vitesse spécifique moyenne de consommation de l'acide malique (g/g/h)	26 x 10 <sup>-3</sup>	37 x 10 <sup>-3</sup>	33 x 10 <sup>-3</sup>
Durée de la FML (h)	288	1319	263

\* La productivité dans ce cas est définie comme étant la concentration cellulaire maximale atteinte à la fin de la phase active de croissance divisée par le temps sans prendre en considération ni la phase de latence ni la phase stationnaire.

## Discussion

Les trois FML ont été suivies jusqu'à l'arrêt de consommation de l'acide malique qui correspond dans notre cas à une consommation complète de l'acide malique initialement présent dans le milieu. La figure I-2 (a) nous montre 3 profils de croissance distincts pour les 3 souches testées. Alors que chez la souche Y la phase active de croissance a commencé après une phase de latence de 165 heures, les phases de latence chez les souches X et Z sont passées inaperçues. Les FML menées par les souches X et Z ont été achevées avant que ces deux souches n'atteignent la phase stationnaire de croissance contrairement au cas de la souche Y. Chez cette dernière les différentes phases de croissance (latence, active et stationnaire) ont été bien marquées alors que la démalication a été continue tout au long de la fermentation. D'ailleurs ces deux activités ne sont pas systématiquement corrélées (Capucho et San Romao, 1994). Malgré le fait que la souche Y ait présenté la productivité et la vitesse spécifique de croissance les plus faibles, elle a atteint le niveau de population le plus élevé (cf tableau I-3). Les souches X et Z ont présenté des vitesses spécifiques de croissance très proches ainsi qu'un profil de croissance très proche jusqu'à 167 heures. A partir de ce moment la croissance de la souche Z a été ralentie et elle a finalement atteint un niveau de population 1,76 fois plus faible que celui obtenu avec la souche X (cf figure I-2 et tableau I-3). Cependant les profils de démalication de ces deux souches ont été presque identiques avec des vitesses globales de

démalication très proches (cf tableau I-3). La démalication chez la souche Y a été 5 fois plus lente que chez les deux autres souches alors que toutes les 3 ont présenté des vitesses spécifiques de démalication proches. Ceci s'explique par la faible biomasse formée par la souche Y (0,1 g/L). Les corrélations linéaires entre le poids sec et la concentration cellulaire de ces 3 souches représentées par les graphes a-4, f-4 et g-4 de l'annexe de la partie I-2 nous montre que pour une même concentration cellulaire, par exemple  $10^6$  cellules/mL, les biomasses correspondantes sont différentes :

Souche X : 0,0044 g/L

Souche Y : 0,0004 g/L

Souche Z : 0,0076 g/L

Ces valeurs reflètent la différence de morphologie entre les trois souches et montrent bien que la souche Y est celle qui présente la plus petite taille ; le dixième de celle de la souche X. En effet cette dernière a atteint une concentration maximale de  $161,6 \times 10^6$  cellules/mL qui correspond à une biomasse de 0,7 g/L alors que la souche Y a atteint une concentration maximale de  $250 \times 10^6$  cellules/mL qui correspond à une biomasse de 0,1 g/L.

## b-Etude biochimique

### Résultats

**Tableau I-4. Profil biochimique des milieux synthétiques jus de raisin fermentés par les trois souches d'*O. oeni*.**

	Souche X	Souche Y	Souche Z
Sucre initial (g/L)	198 ( $\pm 4,1$ )	200,7 ( $\pm 5,1$ )	201 ( $\pm 4,6$ )
Sucre consommé (g/L)	4 ( $\pm 0,64$ )	6 ( $\pm 1,42$ )	4 ( $\pm 1,1$ )
Acide D-Lactique produit (g/L)	0,56 ( $\pm 0,078$ )	0,93 ( $\pm 0,08$ )	0,5 ( $\pm 0,1$ )
Acide acétique produit (g/L)	0,1 ( $\pm 0$ )	0,66 ( $\pm 0,015$ )	0,23 ( $\pm 0,03$ )
Azote alpha-aminé initial (mg/L)	81,2 ( $\pm 3,1$ )	80 ( $\pm 2,56$ )	79 ( $\pm 2,8$ )
Azote alpha-aminé consommé (mg/L)	8,62 ( $\pm 0,61$ )	4 ( $\pm 0,52$ )	7,4 ( $\pm 0,64$ )

### Discussion

Le tableau I-4 nous montre que la consommation de sucre par *O. oeni* est faible. *O. oeni* métabolise les hexoses via la voie hétérofermentaire des pentoses-phosphates avec comme produit majoritaire le D-lactate mais aussi de l'éthanol, de l'acétate et du  $\text{CO}_2$  (cf partie I-4-3 du chapitre I de ce

manuscrit). Nous n'avons pas détecté une production d'éthanol lors des dosages effectués, mais plutôt une production d'acide acétique. Ceci dépend du potentiel redox du milieu. En effet, vu que les milieux utilisés contiennent du fructose (milieu synthétique jus de raisin), les coenzymes réduits (NADH, H<sup>+</sup>) issus du métabolisme du glucose seront réoxydés grâce à la réduction du fructose en mannitol. Ceci va régénérer les molécules de coenzyme nécessaires pour l'oxydation du glucose et va orienter la réaction vers la formation d'acétate (cf Fig. I-7 de la partie I-4-3 du chapitre I). On constate d'après ce tableau que les souches X et Z consomment les mêmes quantités de sucre et produisent les mêmes quantités d'acide D-Lactique. De plus ces deux souches ont atteint des biomasses maximales proches (0,7 g/L pour X et 0,6 g/L pour Z). Par contre la souche Z a produit deux fois plus d'acide acétique que la souche X. D'autre part, la souche Y qui a produit la biomasse maximale la plus faible (0,1 g/L) a consommé une quantité de sucre légèrement plus élevée que celle consommée par les souches X et Z et a aussi produit une quantité plus élevée d'acide D-lactique et d'acide acétique. Les quantités d'acide D-Lactique et d'acide acétique produites par les trois souches restent cependant faibles et acceptables ce qui pourrait suggérer que l'inoculation de ces bactéries en même temps que les levures lors d'une culture mixte dans un moût de raisin ne risque pas d'entraîner une augmentation de l'acidité volatile du vin due surtout à une production élevée d'acide acétique. Notons que ce dernier peut également provenir du catabolisme de l'acide citrique mais les 3 cultures pures en fioles d'Erlen-meyer n'ont montré aucune consommation d'acide citrique donc l'acide acétique provient uniquement du catabolisme du sucre.

Les dosages effectués ont également montré que les souches d'*O. oeni* ne consomment pas d'azote ammoniacal. Par contre, les acides aminés constituent des nutriments indispensables à la croissance cellulaire et au métabolisme bactérien (cf partie I-4-4 du chapitre I de ce manuscrit). Pour cela, la consommation d'azote alpha-aminé au cours de ces fermentations a été suivie. D'après le tableau I-4, nous constatons que cette consommation est faible surtout dans le cas de la souche Y. Les cinétiques correspondantes sont représentées en annexes de la partie I-2.

Nous pouvons conclure d'après les profils biochimiques de ces 3 souches qu'*O. oeni* a besoin d'une faible quantité de sucre pour bien se développer. L'azote alpha-aminé constitue une source nutritionnelle importante. Quantitativement, les besoins ne sont pas élevés mais qualitativement l'absence de certains acides aminés indispensables peut affecter négativement la croissance cellulaire et la démalication (cf partie I-4-4 du chapitre I de ce manuscrit). Nous constatons finalement un comportement similaire des souches X et Z d'un point de vue cinétique et biochimique contrairement à la souche Y qui se distingue par sa cinétique plus lente, sa petite taille, la faible biomasse formée et sa faible consommation d'azote alpha-aminé.

### I-2-2 Comparaison du comportement d'*O. oeni* souche X en culture pure dans les milieux synthétiques jus de raisin et vin réalisée en fioles d'Erlen-meyer.

Le milieu synthétique vin présente une composition qui simule celle du vin naturel mais qui est exempte des métabolites levuriens à l'exception de l'éthanol et qui présente une teneur réduite de 50 % en source d'azote et de vitamines par rapport au milieu synthétique jus de raisin (cf partie II-1-2 du chapitre II de ce manuscrit). Son utilisation avait pour but principal de quantifier l'effet inhibiteur de l'éthanol sur la croissance bactérienne et la démalication. Les FML menées par *O. oeni* souche X dans les milieux synthétiques jus de raisin et vin ont ainsi servi comme témoins ou références pour les cultures séquentielles réalisées plus tard avec cette même souche de bactérie. La quantification de l'inhibition due à l'éthanol nous a aidés à déterminer la part de l'inhibition due à d'autres conditions inhibitrices pendant les cultures séquentielles.

### Résultats

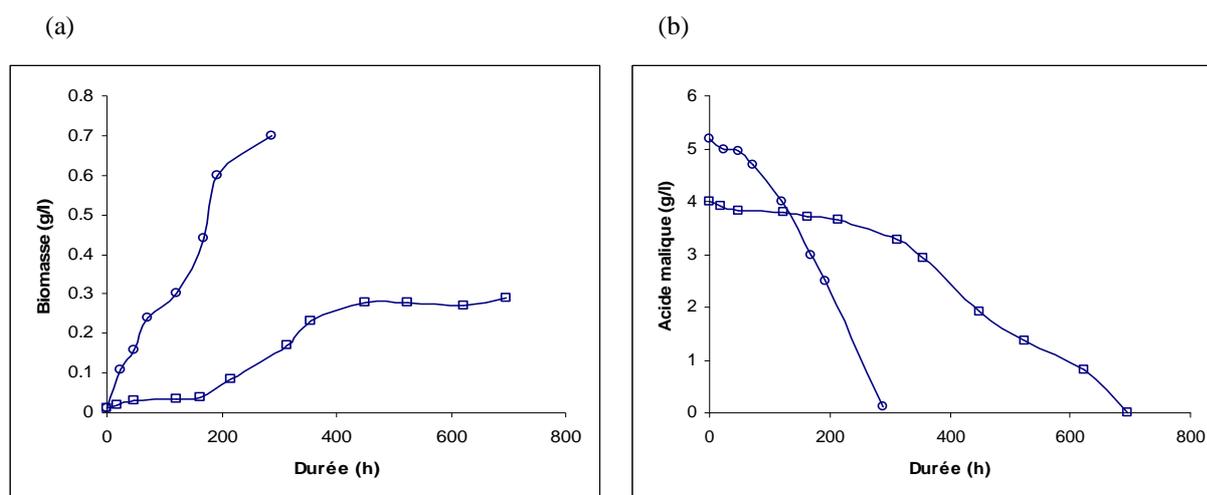


Fig. I-3 Evolution de la biomasse d'*O. oeni* souche X (a) et de sa consommation d'acide malique (b) au cours de ses cultures pures dans les milieux synthétiques jus de raisin et vin en fioles d'Erlen-meyer. (○) Milieu synthétique jus de raisin, (□) Milieu synthétique vin.

**Tableau I-5. Paramètres cinétiques des FML menées par *O. oeni* souche X dans les milieux synthétiques jus de raisin et vin en fioles d'Erlen-meyer.**

	Milieu synthétique jus de raisin	Milieu synthétique vin
Biomasse initiale (g/L)	0,013	0,013
Biomasse maximale (g/L)	0,7	0,29
Productivité (g/L/h)	$24 \times 10^{-4}$	$8,5 \times 10^{-4}$
Vitesse spécifique maximale de croissance : $\mu_{max}$ ( $h^{-1}$ )	$3,43 \times 10^{-3}$	$3 \times 10^{-3}$
Acide malique initial (g/L)	5,2	4
Acide malique final (g/L)	0	0
Vitesse globale de consommation de l'acide malique (g/L/h)	$18 \times 10^{-3}$	$6 \times 10^{-3}$
*Pourcentage d'inhibition de la vitesse de démalication (%)	-	67
Vitesse spécifique moyenne de consommation de l'acide malique (g/g/h)	$26 \times 10^{-3}$	$21 \times 10^{-3}$
Durée de la FML (h)	288	695

\*Le pourcentage d'inhibition de la vitesse de démalication est défini comme étant la réduction de la vitesse de démalication dans le milieu synthétique vin par rapport au milieu synthétique jus de raisin et est calculé de la façon suivante :

$[1 - (\text{vitesse de démalication dans le milieu synthétique vin} / \text{vitesse de démalication dans le milieu synthétique jus de raisin})] \times 100$ .

## Discussion

En présence de 10 % d'éthanol (v/v) dans le milieu synthétique vin, nous remarquons que le profil de croissance d'*O. oeni* souche X a changé (Fig. I-3, a). En effet, l'éthanol a entraîné l'apparition d'une phase de latence de 164 heures non observée dans le milieu synthétique jus de raisin suivie d'une phase active de croissance qui a abouti à la formation d'une biomasse maximale 2,4 fois plus faible que celle obtenue dans le milieu synthétique jus de raisin. De plus la phase stationnaire a été atteinte alors qu'il restait encore dans le milieu 1,91 g/L d'acide malique contrairement à la FML dans le milieu synthétique jus de raisin où la démalication a été complètement achevée avant même d'observer un plateau de croissance. Enfin, la productivité dans le milieu synthétique vin était 2,8 fois plus faible que dans le milieu synthétique jus de raisin. Du point de vue croissance cellulaire, l'éthanol a donc entraîné une prolongation de la phase de latence pendant laquelle les bactéries ont essayé de s'adapter aux conditions stressantes du milieu. Celles qui ont réussi à s'adapter aux 10 % d'éthanol (v/v) et sont restées vivantes, se sont multipliées plus tard mais par conséquent la biomasse maximale atteinte a été plus faible. On note que leur vitesse spécifique maximale de croissance a été légèrement plus faible que dans le milieu synthétique jus de raisin.

Dans le milieu synthétique vin, on remarque au début de la FML une phase lente de démalication de 215 heures non observée dans le milieu synthétique jus de raisin. De plus la vitesse de démalication a été 3 fois plus lente et réduite de 67 % par rapport à celle obtenue dans le milieu synthétique jus de raisin (cf tableau I-5). Cependant les 10 % d'éthanol (v/v) n'ont pas empêché la consommation complète des 4 g/L d'acide malique initialement présents. Ceci rejoint les études de Capucho et San Romao (1994) qui ont constaté qu'en présence de 8 % d'éthanol (v/v), la croissance cellulaire est fortement inhibée alors que l'acide malique continue à être dégradé à un taux de 90 %. Cette remarque rejoint aussi l'hypothèse de Manca de Nadra et Strasser de Saad (1987, 1990) qui montre qu'il n'y a pas de corrélation directe entre l'activité malolactique et la croissance bactérienne. De plus, la vitesse spécifique de consommation de l'acide malique dans le milieu synthétique vin a été légèrement plus faible que celle obtenue dans le milieu synthétique jus de raisin (Tableau I-5). Nous pouvons donc conclure que la plus longue durée de la FML dans le milieu synthétique vin était due à une limitation de la biomasse formée plutôt qu'à une réduction importante de l'activité de démalication.

Notons finalement que la composition en nutriments du milieu synthétique vin était réduite mais non limitante surtout en ce qui concerne l'azote alpha-aminé disponible dans le milieu (cf partie II-1-2 du chapitre II). En effet au début de la fermentation il y avait 25,74 mg/L d'azote alpha-aminé provenant des 0,5 g/L de l'extrait de levure utilisé pour la préparation de ce milieu. Vu la composition en acides aminés de l'extrait de levure utilisé (cf partie II-1-2 du chapitre II) et la faible consommation d'azote alpha-aminé par la souche X dans le milieu synthétique jus de raisin (8,62 mg/L), nous pouvons confirmer qu'il n'y avait pas de carence à ce niveau. Cependant, seuls 3,74 mg/L d'azote alpha-aminé ont été consommés dans le milieu synthétique vin (cf annexes de la partie I-2, tableau e-2). Ceci est probablement dû à l'action inhibitrice de l'éthanol. Par ailleurs, le dosage des sucres a montré une consommation de 1,7 g/L à partir des 2 g/L initialement présents. On peut conclure que malgré une consommation réduite d'azote alpha-aminé et de sucre, la consommation des 4 g/L d'acide malique a été complète. Ceci nous confirme encore une fois qu'*O. oeni* n'est pas quantitativement exigeante d'un point de vue nutritionnel.

### **I-2-3 Comparaison du comportement d'*O. oeni* souche X en culture pure dans le milieu synthétique jus de raisin réalisée dans le BRM sous différentes conditions gazeuses.**

Comme déjà décrit dans la partie I-6-1-2 du chapitre I de ce manuscrit, paragraphe b-1, l'homogénéisation du milieu synthétique jus de raisin dans les deux réservoirs du BRM se fait grâce à une circulation alternative de ce milieu d'un réservoir à l'autre assurée par une surpression résultant de l'introduction d'un gaz comprimé. Dans le but d'évaluer l'effet éventuel du gaz sur la

FML en termes de croissance cellulaire et de démalication, 3 gaz ont été testés : l'air, le CO<sub>2</sub> et l'azote. La comparaison des résultats des FML obtenus au cours des 3 cultures pures d'*O. oeni* souche X nous a permis de choisir le gaz le plus convenable à la réalisation de la FML dans des conditions proches des conditions réelles de vinification. Ce gaz a été adopté au cours des cultures mixtes ultérieures. Les cultures pures d'*O. oeni* souche X en BRM ont servi de référence pour les cinétiques de croissance cellulaire et de démalication pendant les cultures mixtes réalisées plus tard en utilisant cette même souche de bactérie.

### a- Etude cinétique

#### Résultats

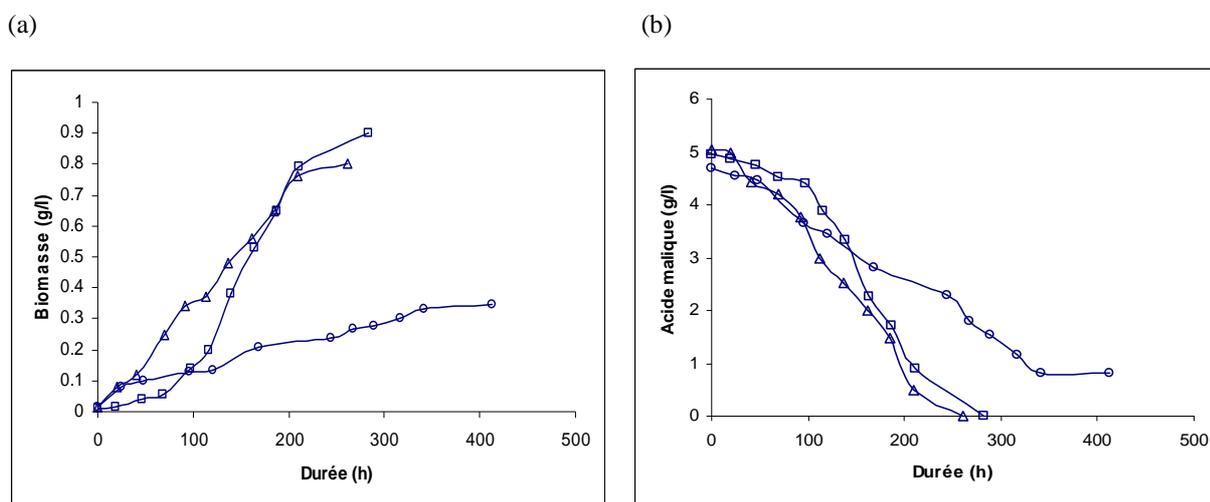


Fig. I-4 Evolution de la biomasse d'*O. oeni* souche X (a) et de sa consommation d'acide malique (b) au cours des 3 cultures pures réalisées dans le BRM. (○) air, (Δ) CO<sub>2</sub>, (□) azote.

**Tableau I-6. Paramètres cinétiques des FML menées par *O. oeni* souche X dans le BRM sous air, azote et CO<sub>2</sub>.**

	Air	Azote	CO <sub>2</sub>
Biomasse initiale (g/L)	0,013	0,01	0,015
Biomasse maximale (g/L)	0,33	0,9	0,8
Productivité (g/L/h)	$0,93 \times 10^{-3}$	$3,36 \times 10^{-3}$	$3,6 \times 10^{-3}$
Vitesse spécifique maximale de croissance : $\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )	$2,82 \times 10^{-3}$	$3,73 \times 10^{-3}$	$4,74 \times 10^{-3}$
Acide malique initial (g/L)	4,7	4,95	5,04
Acide malique final (g/L)	0,8	0	0
Vitesse globale de consommation de l'acide malique (g/L/h)	$11,44 \times 10^{-3}$	$17,5 \times 10^{-3}$	$19 \times 10^{-3}$
Vitesse spécifique moyenne de consommation de l'acide malique (g/g/h)	$35 \times 10^{-3}$	$19,4 \times 10^{-3}$	$24 \times 10^{-3}$
Durée de la FML (h)	341	283	261

## Discussion

Partant d'un même inoculum initial, la souche X a atteint différents niveaux de population et a présenté des profils de croissance différents suivant les conditions gazeuses appliquées (cf figure I-4, a et tableau I-6). Alors que les biomasses maximales obtenues sous azote et sous CO<sub>2</sub> étaient proches avec une valeur légèrement plus élevée sous azote, la biomasse maximale obtenue sous air était respectivement 2,73 et 2,43 fois plus faible que celles obtenues sous azote et sous CO<sub>2</sub>. On remarque aussi que la cinétique de croissance sous CO<sub>2</sub> était plus accélérée que sous azote pendant les premières 120 heures de ces deux cultures. Ensuite, les cinétiques se sont rapprochées suite à un ralentissement de la croissance sous CO<sub>2</sub> ce qui a aboutit à la phase stationnaire au niveau de ce dernier après 209 heures. La vitesse spécifique maximale de croissance était la plus élevée sous CO<sub>2</sub> et elle était respectivement 1,27 et 1,7 fois plus importante que celles obtenues sous azote et sous air. Par ailleurs, la démalication n'a pas été complètement achevée sous air et a laissé 0,8 g/L d'acide malique dans le milieu alors qu'elle a été complète sous azote et sous CO<sub>2</sub>. Les profils de démalication sous CO<sub>2</sub> et sous azote étaient proches ainsi que les vitesses globales de démalication qui étaient respectivement 1,7 et 1,53 fois plus rapides que sous air. Cependant, la vitesse spécifique de démalication sous air était respectivement 1,8 et 1,5 fois plus élevée que sous azote et sous CO<sub>2</sub>. En effet l'air a défavorisé la croissance cellulaire plutôt que la démalication et a ainsi entraîné une augmentation de l'activité spécifique de démalication. Malgré cela, les bactéries n'ont pas pu entièrement consommer l'acide malique.

Finalement nous pouvons conclure que malgré les légères différences cinétiques entre le CO<sub>2</sub> et l'azote qui rendent le CO<sub>2</sub> un peu plus favorable à la réalisation de la FML, ces deux gaz semblent être les mieux adaptés à la croissance cellulaire et à la démalication chez *O. oeni*. En effet, *O. oeni* est une bactérie anaérobie facultative qui se développe mieux en l'absence d'oxygène, mais pour elle l'oxygène n'est pas toxique. Ceci explique les meilleurs résultats obtenus sous azote et sous CO<sub>2</sub> qui assurent tous les deux à la bactérie des conditions strictement anaérobies et qui sont d'ailleurs plus proches des conditions qu'on retrouve pendant le processus naturel de vinification au cours duquel le milieu est rapidement saturé en CO<sub>2</sub>.

Pour des raisons techniques, l'azote a été retenu pour la réalisation des cultures mixtes ultérieures.

## b- Etude biochimique

### Résultats

**Tableau I-7. Profil biochimique des milieux synthétiques jus de raisin fermentés par *O. oeni* souche X dans le BRM sous air, azote et CO<sub>2</sub>.**

	Air	Azote	CO <sub>2</sub>
Sucre initial (g/L)	202 (±4,6)	200,7 (±5,3)	201,4 (±5,7)
Sucre consommé (g/L)	3 (±0,22)	12 (±1,3)	8 (±0,7)
Acide D-Lactique produit (g/L)	0,47 (±0,014)	1,9 (±0,13)	1,24 (±0,036)
Acide acétique produit (g/L)	0,107 (±0,006)	0,09 (±0,006)	0,082 (±0,006)
Acide citrique consommé (g/L)	0	0,09 (±0,011)	0,053 (±0,004)
Azote alpha-aminé initial (mg/L)	79,22 (±1,25)	81,11 (±0,85)	74 (±2,86)
Azote alpha-aminé consommé (mg/L)	4,22 (±0,82)	10,71 (±1)	7 (±3,11)

### Discussion

Comme déjà expliqué dans la partie I-2-1, la consommation de sucre par *O. oeni* est faible. La quantité consommée la plus élevée a été observée sous azote au niveau duquel on avait obtenu également la biomasse la plus élevée (cf tableau I-6). Etant donné qu'*O. oeni* est une bactérie hétérofermentaire facultative, les sucres sont métabolisés suivant la voie des pentoses-phosphates, ce qui entraîne la formation en plus du D-Lactate, de l'acétate, de l'éthanol et du CO<sub>2</sub>. Comme pour les cultures pures des différentes souches d'*O. oeni* réalisées en fioles d'Erlen-meyer, on n'a pas détecté une production d'éthanol pour les mêmes raisons expliquées dans la partie I-2-1. La plus grande quantité d'acide D-Lactique a été produite sous azote et des quantités très proches d'acide acétique ont été détectées sous les trois conditions gazeuses avec une concentration légèrement plus élevée sous air. La faible consommation de sucre et la faible production d'acide acétique et d'acide D-Lactique sont encourageantes pour l'utilisation ultérieure de cette souche de bactérie lors des cultures mixtes dans le BRM sous azote et aussi en co-culture pendant le procédé naturel de vinification. Rappelons que le milieu synthétique jus de raisin contenait initialement 0,3 g/L d'acide citrique. Comme pour les cultures pures des différentes souches d'*O. oeni* en fioles d'Erlen-meyer, il n'y a pas eu de consommation d'acide citrique au cours de la culture pure de la souche X sous air. Cependant de faibles concentrations ont été consommées pendant les cultures pures de cette souche sous azote et sous CO<sub>2</sub>. La consommation d'une mole d'acide citrique entraîne la formation d'une mole d'acétate et d'une mole d'oxaloacétate. Donc les 0,09 g/L d'acide citrique consommés sous azote ont donné 0,03 g/L d'acide acétique et les 0,053 g/L consommés sous CO<sub>2</sub> ont donné 0,02 g/L d'acide acétique. En d'autres termes l'acide acétique produit sous azote et sous CO<sub>2</sub> ne provenait pas uniquement du métabolisme du sucre.

Finalement nous constatons que la consommation d'azote alpha-aminé est faible comme décrit précédemment pour les différentes souches d'*O. oeni* (cf partie I-2-1). La quantité consommée la plus élevée a été obtenue pendant la culture pure de la souche X sous azote pendant laquelle on avait également obtenu la consommation de sucre la plus élevée ce qui d'ailleurs explique la production la plus importante de biomasse en présence de ce gaz. L'évolution de la consommation de l'azote alpha-aminé par la souche X en fonction du temps est donnée pour les trois conditions gazeuses dans les tableaux et les graphes b-2, c-2 et d-2 de l'annexe de la partie I-2. Comme pour la culture pure de cette souche en fiole d'Erlen-meyer, l'azote alpha-aminé a été consommé pendant les premières 48 heures des cultures pures sous air, azote et CO<sub>2</sub>.

### I-3 Conclusion

Le suivi des fermentations alcooliques nous a permis de constater de faibles différences dans le comportement cinétique des 5 souches de levure testées (croissance et consommation de sucre) ainsi que dans le profil biochimique des milieux établi à la fin de ces fermentations, notamment la production de certains métabolites inhibiteurs de la FML (éthanol, SO<sub>2</sub> et acides gras) et la quantité d'azote assimilable restant dans le milieu (azote ammoniacal et alpha-aminé).

Les cultures pures des trois souches d'*O. oeni* dans le milieu synthétique jus de raisin en fioles d'Erlen-meyer ont montré un comportement cinétique proche pour les souches X et Z contrairement à la souche Y qui s'est distinguée par sa faible biomasse et par une lente activité de démalication. Par ailleurs, les 3 souches ont consommé de faibles quantités de sucre et d'azote alpha-aminé et ont produit de faibles quantités d'acide D-lactique et d'acide acétique. *O. oeni* souche X a été également testée dans un milieu synthétique vin et a montré que même en présence de 10 % d'éthanol (v/v), elle était capable de consommer complètement l'acide malique. Sa vitesse de démalication était cependant réduite de 67 % par rapport à celle obtenue dans le milieu synthétique jus de raisin. Les deux cultures pures d'*O. oeni* souche X dans les milieux synthétiques jus de raisin et vin et celle d'*O. oeni* souche Y dans le milieu synthétique jus de raisin vont servir plus tard de référence pour les cinétiques de croissance et de consommation d'acide malique pendant leurs cultures séquentielles. De plus *O. oeni* souche X a été testée en culture pure dans le bioréacteur à membrane (milieu synthétique jus de raisin) en utilisant 3 gaz différents : l'air, le CO<sub>2</sub> et l'azote. Les meilleurs résultats de la FML ont été obtenus sous CO<sub>2</sub> et sous azote. L'azote a été finalement adopté pour les cultures mixtes réalisées ultérieurement dans ce bioréacteur.

## Annexes de la partie I-1 : Cultures pures des différentes souches de *S. cerevisiae* dans le milieu synthétique jus de raisin en fioles d'Erlen-meyer.

### Etude cinétique

#### a- Culture pure de *S. cerevisiae* souche A en fiole d'Erlen-meyer.

Tableau a-1. Suivi cinétique de la culture pure de *S. cerevisiae* souche A en fiole d'Erlen-meyer.

Durée (h)	D.O	Concentration cellulaire (cellules/mL) x 10 <sup>6</sup>	Viabilité (%)	Poids sec (g/L)	Sucre (g/L)
0	0.035	2.95		0.04	201.7
6	0.038	3.73		0.042	200
23	0.341	36.72		0.38	190
29	0.56	83.5		0.62	161
47	2.7	192	80	3	119.4
53	3.1	220	79	3.46	106.7
77	4.4	317	77	5	39.7
120	4.7	334	76	5.25	1.58

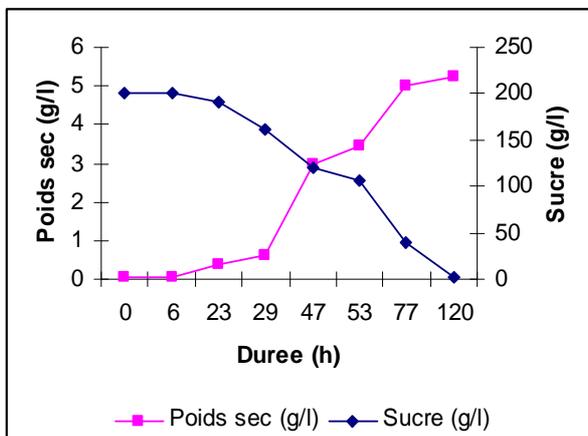


Fig. a-1 Evolution de la biomasse de la souche A et de sa consommation de sucre au cours de sa culture pure en Erlen-meyer.

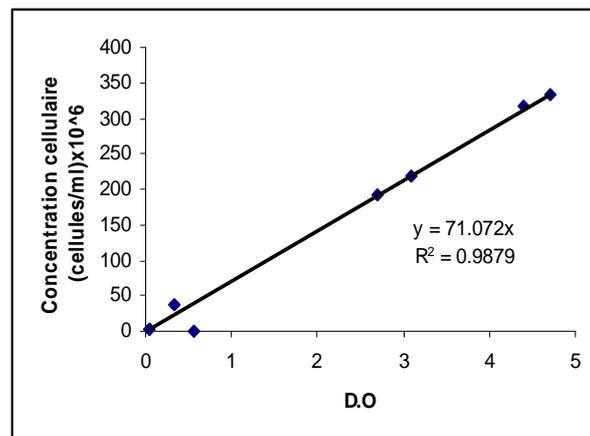


Fig. a-2 Evolution de la concentration cellulaire de la souche A en fonction de la D.O au cours de sa culture pure en Erlen-meyer.

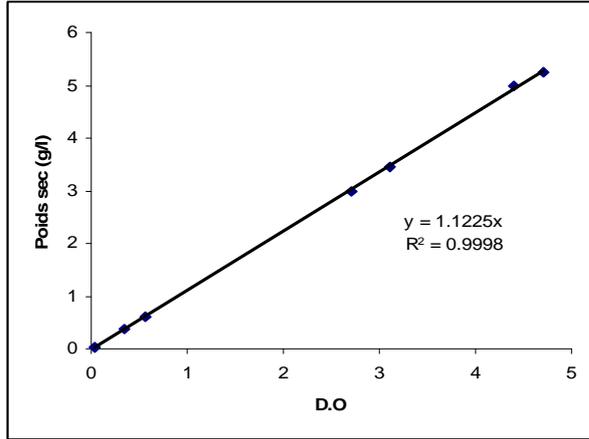


Fig. a-3 Evolution du poids sec de la souche A en fonction de la D.O au cours de sa culture pure en Erlen-meyer.

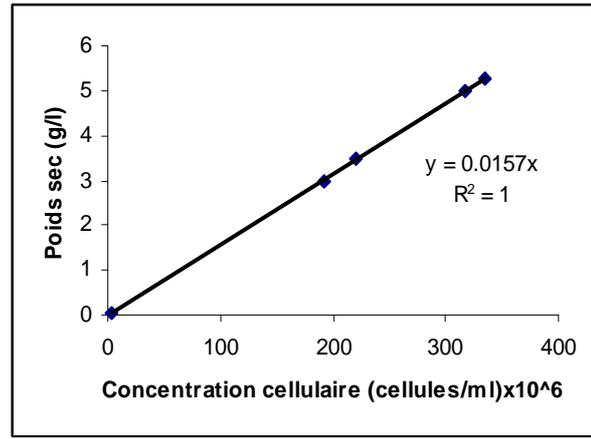


Fig. a-4 Evolution du poids sec de la souche A en fonction de sa concentration cellulaire au cours de sa culture pure en Erlen-meyer.

**Tableau a-2. Evolution de la consommation de l'azote ammoniacal et de l'azote alpha aminé au cours de la culture pure de *S. cerevisiae* souche A en fiole d'Erlen-meyer.**

Durée (h)	Azote ammoniacal (mg/L)	Azote alpha-aminé (mg/L)
0	380,12 ( $\pm 4,54$ )	81,32 ( $\pm 7,06$ )
6	372,37 ( $\pm 21,45$ )	77,8 ( $\pm 5,54$ )
23	296,1 ( $\pm 13,3$ )	36,8 ( $\pm 4,16$ )
29	274,6 ( $\pm 7,3$ )	33,42 ( $\pm 3,08$ )
47	75,14 ( $\pm 10,8$ )	26,54 ( $\pm 3,12$ )
53	42,72 ( $\pm 5,6$ )	24,82 ( $\pm 2,85$ )
77	0	19,8 ( $\pm 2,74$ )
120	0	26,6 ( $\pm 3,55$ )

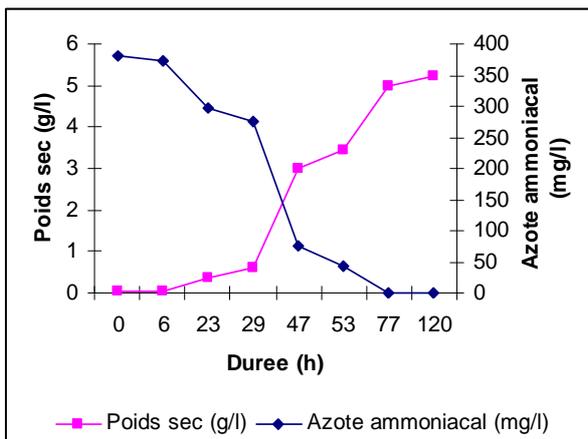


Fig. a-5 Evolution de la biomasse de la souche A et de sa consommation d'azote ammoniacal au cours de sa culture pure en Erlen-meyer.

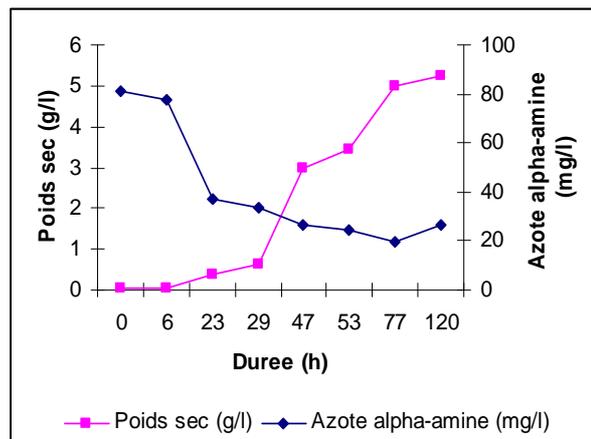


Fig. a-6 Evolution de la biomasse de la souche A et de sa consommation d'azote alpha-aminé au cours de sa culture pure en Erlen-meyer.

**b- Culture pure de *S. cerevisiae* souche B en fiole d'Erlen-meyer.**

**Tableau b-1. Suivi cinétique de la culture pure de *S. cerevisiae* souche B en fiole d'Erlen-meyer.**

Durée (h)	D.O	Concentration cellulaire (cellules/mL) x 10 <sup>6</sup>	Viabilité (%)	Poids sec (g/L)	Sucre (g/L)
0	0,021	2,8 (± 0,26)		0,03 (± 0,03)	201,5 (± 6,1)
6	0,029	5,77 (± 0,2)		0,1 (± 0,037)	196,23 (± 3,1)
23	0,352	64,33 (± 0,76)		0,56 (± 0,024)	178 (± 7,6)
30	0,551	87,17 (± 0,3)		0,79 (± 0)	153,8 (± 8,32)
48	2,04	221,33 (± 1,63)	80,2	2,16 (± 0,08)	108 (± 1,85)
54	2,48	234,33 (± 1)	79,53	3,16 (± 0)	78 (± 1)
72	2,9	249 (± 7,2)	81,67	4,76 (± 0,034)	55,8 (± 6,44)
100	3,4	254,33 (± 2,32)	83,2	4,83 (± 0,07)	11,6 (± 0,8)
124	3,48	275 (± 2)	78	4,95 (± 0,08)	1,16 (± 0,26)

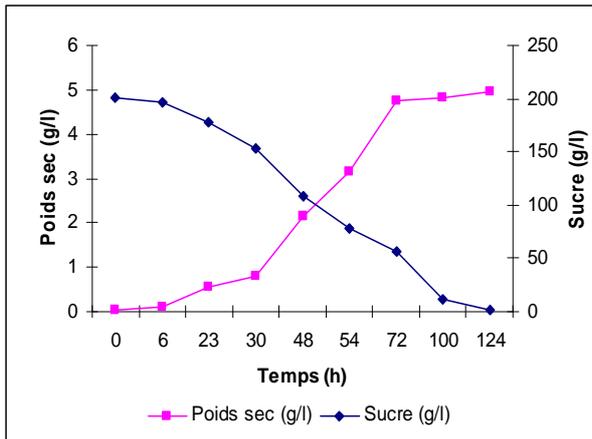


Fig. b-1 Evolution de la biomasse de la souche B et de sa consommation de sucre au cours de sa culture pure en Erlen-meyer.

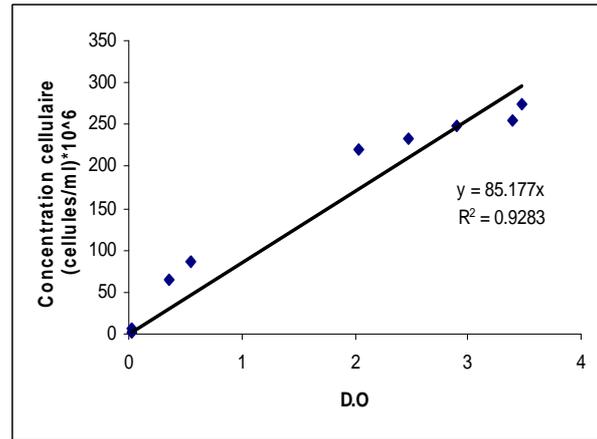


Fig. b-2 Evolution de la concentration cellulaire de la souche B en fonction de la D.O au cours de sa culture pure en Erlen-meyer.

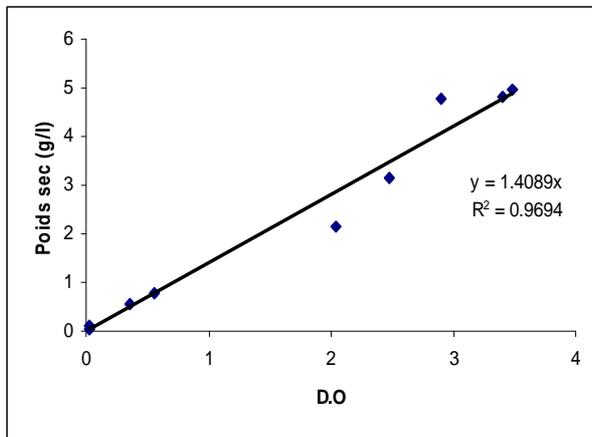


Fig. b-3 Evolution du poids sec de la souche B en fonction de la D.O au cours de sa culture pure en Erlen-meyer.

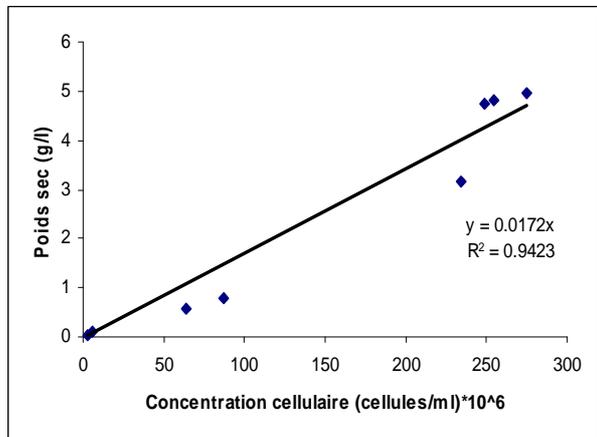


Fig. b-4 Evolution du poids sec de la souche B en fonction de sa concentration cellulaire au cours de sa culture pure en Erlen-meyer.

**Tableau b-2. Evolution de la consommation de l'azote ammoniacal et de l'azote alpha aminé au cours de la culture pure de *S. cerevisiae* souche B en fiole d'Erlen-meyer.**

Durée (h)	Azote ammoniacal (mg/L)	Azote alpha-aminé (mg/L)
0	388,7 ( $\pm 7$ )	93,52 ( $\pm 6$ )
6	363,1 ( $\pm 12,7$ )	72,15 ( $\pm 4,14$ )
23	321,32 ( $\pm 4,7$ )	33,93 ( $\pm 2,33$ )
30	260,1 ( $\pm 14,8$ )	28,7 ( $\pm 3,87$ )
48	15,2 ( $\pm 2,84$ )	18,12 ( $\pm 3,1$ )
54	0	13,02 ( $\pm 2,57$ )
72	0	9,46 ( $\pm 2,73$ )
100	0	9,23 ( $\pm 2,7$ )
124	0	10,15 ( $\pm 2,34$ )

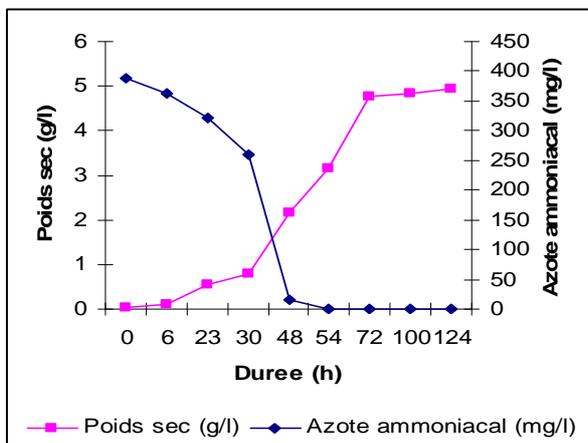


Fig. b-5 Evolution de la biomasse de la souche B et de sa consommation d'azote ammoniacal au cours de sa culture pure en Erlen-meyer.

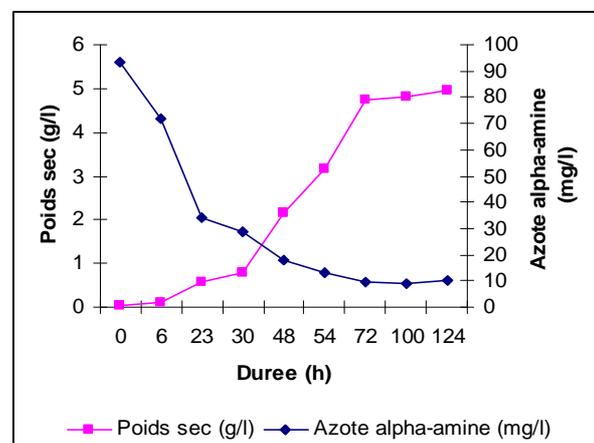


Fig. b-6 Evolution de la biomasse de la souche B et de sa consommation d'azote alpha-aminé au cours de sa culture pure en Erlen-meyer.

### c- Culture pure de *S. cerevisiae* souche C en fiole d'Erlen-meyer.

**Tableau c-1. Suivi cinétique de la culture pure de *S. cerevisiae* souche C en fiole d'Erlen-meyer.**

Durée (h)	D. O.	concentration cellulaire (cellules /mL) x 10 <sup>6</sup>	Viabilité (%)	Poids sec (g/L)	sucres (g/L)
0	0.021	2,42 ( $\pm 0,057$ )	-	0,054 ( $\pm 0,0012$ )	197.6
6	0.026	3,975 ( $\pm 0,57$ )	-	0,088 ( $\pm 0,0125$ )	183.9
23	0.266	29,33 ( $\pm 2,65$ )	-	0,65 ( $\pm 0,0583$ )	165.6
30	1.21	106,8 ( $\pm 5,75$ )	89.7	2,36 ( $\pm 0,13$ )	141.9
47	2.85	242,3 ( $\pm 14$ )	77.2	5,36 ( $\pm 0,31$ )	113.5
53	3.22	280,5 ( $\pm 10$ )	78.5	6,2 ( $\pm 0,22$ )	62.4
95	4.43	296,3 ( $\pm 6,5$ )	89	6,55 ( $\pm 0,125$ )	0.69
119	4.85	300,6 ( $\pm 11$ )	88	6,6 ( $\pm 0,242$ )	0.46
126	4.71	299 ( $\pm 9,54$ )	92.5	6,6 ( $\pm 0,21$ )	0.45

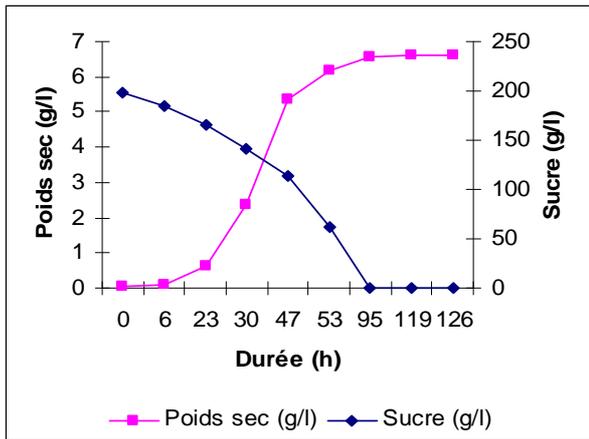


Fig. c-1 Evolution de la biomasse de la souche C et de sa consommation de sucre au cours de sa culture pure en Erlen-meyer

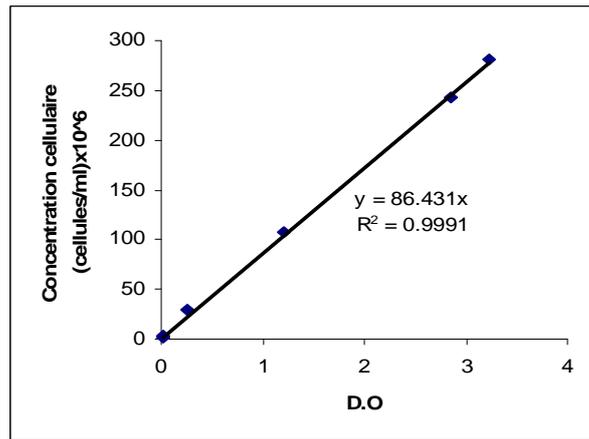


Fig. c-2 Evolution de la concentration cellulaire de la souche C en fonction de la D.O au cours de sa culture pure en Erlen-meyer

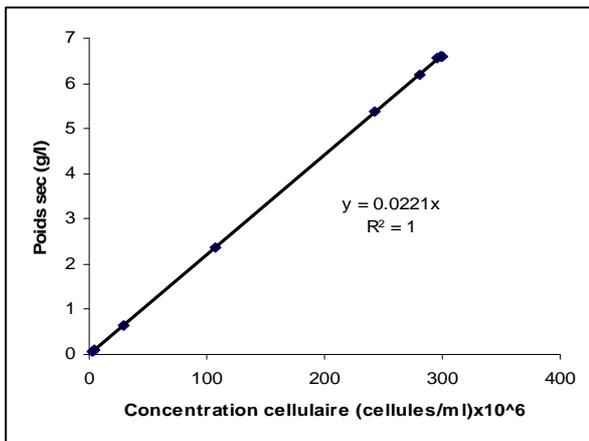


Fig. c-3 Evolution du poids sec de la souche C en fonction de la D.O au cours de sa culture pure en Erlen-meyer.

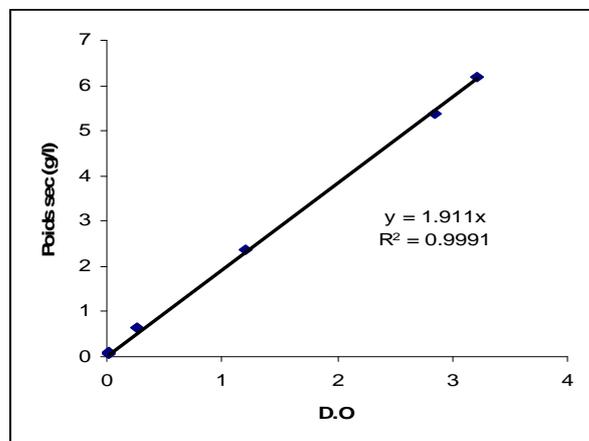


Fig. c-4 Evolution du poids sec de la souche C en fonction de sa concentration cellulaire au cours de sa culture pure en Erlen-meyer.

**Tableau c-2. Evolution de la consommation de l'azote ammoniacal et de l'azote alpha aminé au cours de la culture pure de *S. cerevisiae* souche C en fiole d'Erlen-meyer.**

Durée (h)	Azote ammoniacal (mg/L)	Azote alpha-aminé (mg/L)
0	379,1 (± 4,51)	76 (±2,7)
6	368,88 (±11)	59,54 (±1,11)
23	325,93 (±7,29)	28,83 (±0,29)
30	255,07 (±3,8)	20,7 (±0,4)
47	22,8 (±2,4)	14,11 (±0,4)
53	0	9,86 (±0,61)
95	0	9,58 (±0,3)
119	0	9,5 (±1,12)
126	0	9,3 (±1,04)

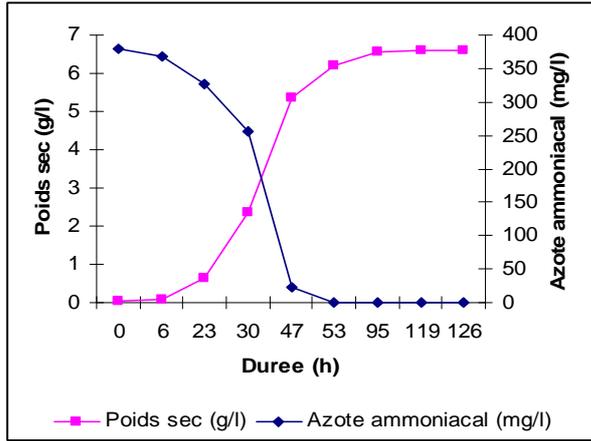


Fig. c-5 Evolution de la biomasse de la souche C et de sa consommation d'azote ammoniacal au cours de sa culture pure en Erlen-meyer.

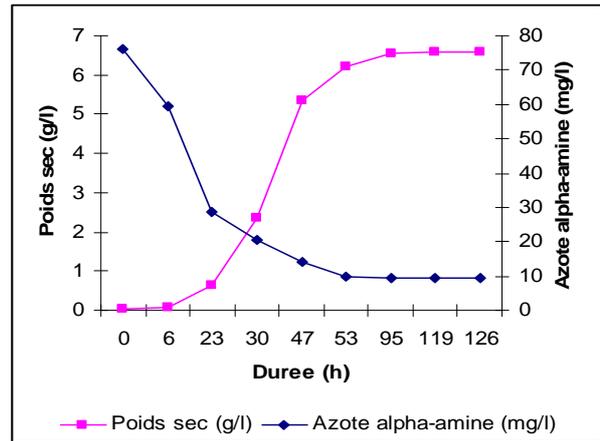


Fig. c-6 Evolution de la biomasse de la souche C et de sa consommation d'azote alpha-amine au cours de sa culture pure en Erlen-meyer.

**d- Culture pure de *S. cerevisiae* souche D en fiole d'Erlen-meyer.**

**Tableau d-1. Suivi cinétique de la culture pure de *S. cerevisiae* souche D en fiole d'Erlen-meyer.**

Durée (h)	D.O	Concentration cellulaire (cellules/mL) x 10 <sup>6</sup>	Viabilité (%)	Poids sec (g/L)	Sucre (g/L)
0	0,033	3,45		0,062	200,3
18	0,32	36,75		0,66	168,4
26	1,26	145 (±9,54)	95	2,61 (± 0,17)	137,5
42	3,33	382 (±4,58)	87	6,88 (±0,082)	122,1
50	3,45	398 (±7)	89,4	7,16 (±0,126)	66
71	4,27	392 (±4,04)	96	7,06 (±0,073)	15,6
92	4,92	395 (±11,36)	94	7,11 (±0,204)	1,78
115	4,4	392 (±8,62)	94,5	7,06 (±0,16)	0,7
122	3,84	388,5 (±7,57)	94	7 (±0,14)	0,65

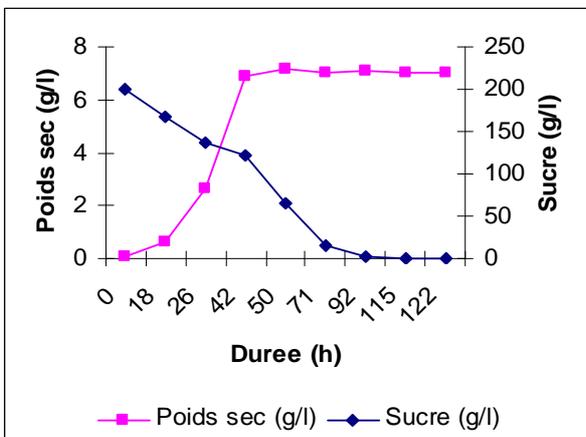


Fig. d-1 Evolution de la biomasse de la souche D et de sa consommation de sucre au cours de sa culture pure en Erlen-meyer.

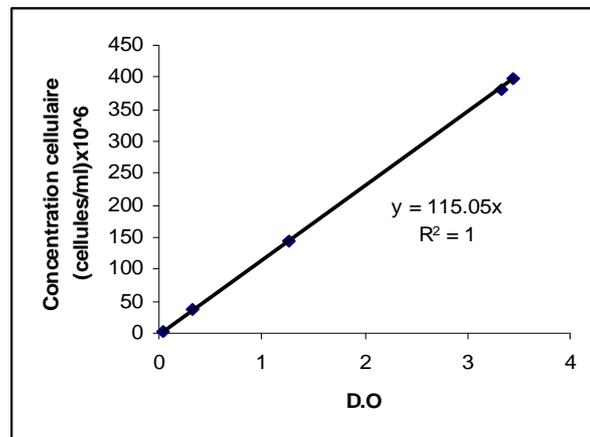


Fig. d-2 Evolution de la concentration cellulaire de la souche D en fonction de la D.O au cours de sa culture pure en Erlen-meyer.

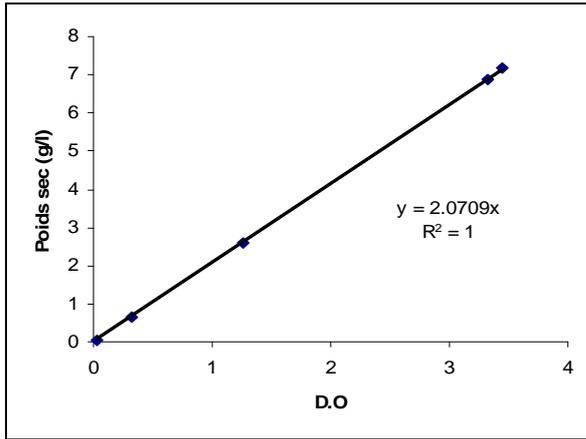


Fig. d-3 Evolution du poids sec de la souche D en fonction de la D.O au cours de sa culture pure en Erlen-meyer.

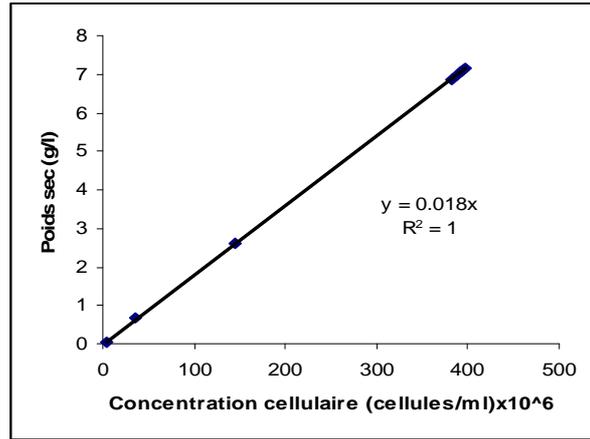


Fig. d-4 Evolution du poids sec de la souche D en fonction de sa concentration cellulaire au cours de sa culture pure en Erlen-meyer.

**Tableau d-2. Evolution de la consommation de l'azote ammoniacal et de l'azote alpha aminé au cours de la culture pure de *S. cerevisiae* souche D en fiole d'Erlen-meyer.**

Durée (h)	Azote ammoniacal (mg/L)	Azote alpha-aminé (mg/L)
0	393,76 (±12,6)	81,77 (±1,13)
18	347,34 (±7,18)	42,41 (±2,2)
26	260,7 (±5,35)	24,94 (±0,6)
42	13,67 (±1,95)	17,08 (±0,63)
50	1,2 (±0,2)	14,33 (±0,61)
71	0	14,16 (±0,26)
92	0	14,106 (±0,1)
115	0	13,41 (±0,26)
122	0	13,36 (±0,62)

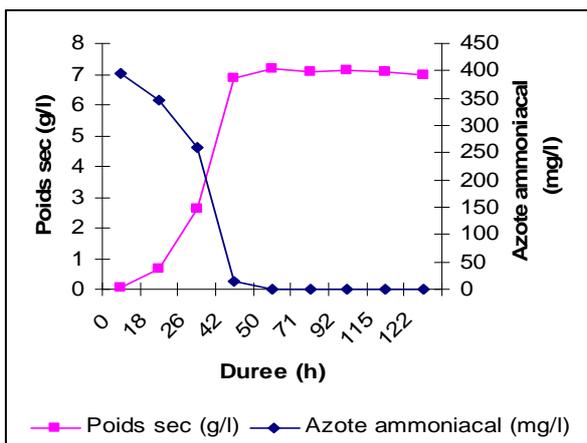


Fig. d-5 Evolution de la biomasse de la souche D et de sa consommation d'azote ammoniacal au cours de sa culture pure en Erlen-meyer

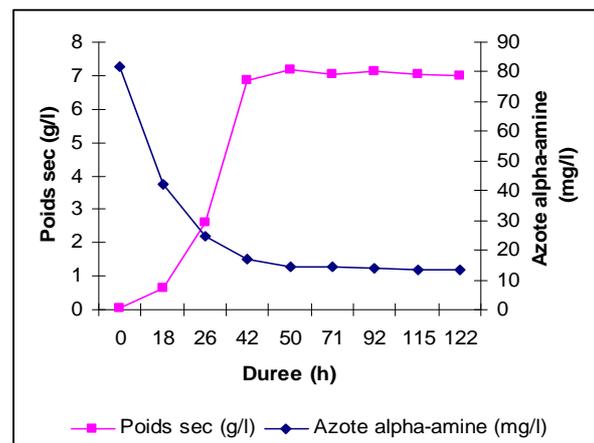


Fig. d-6 Evolution de la biomasse de la souche D et de sa consommation d'azote alpha-aminé au cours de sa culture pure en Erlen-meyer

**e- Culture pure de *S. cerevisiae* souche E en fiole d'Erlen-meyer.**

**Tableau e-1. Suivi cinétique de la culture pure de *S. cerevisiae* souche E en fiole d'Erlen-meyer.**

Durée (h)	D.O	Concentration cellulaire (cellules/mL) x 10 <sup>6</sup>	Viabilité (%)	Poids sec (g/L)	Sucre restant (g/L)
0	0,031	2,61		0,07	206
5	0,035	5,6		0,1	192
22	0,46	52,34		1,2	163,6
29	0,73	77,5	73	2,3	116
46	1,93	156,6	72	3,4	83
53	2,3	191		4,4	45,72
70	2,82	194	67	4,6	25
77	3,25	220	67	5,2	2,59
83	3,25	221	67	5,2	0,96
100	3,25	218	65	5,2	0,45

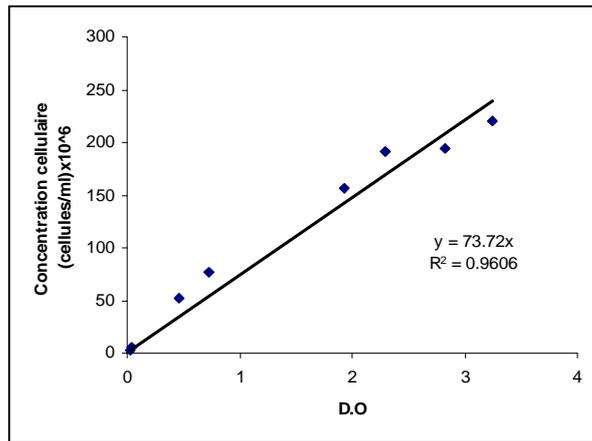
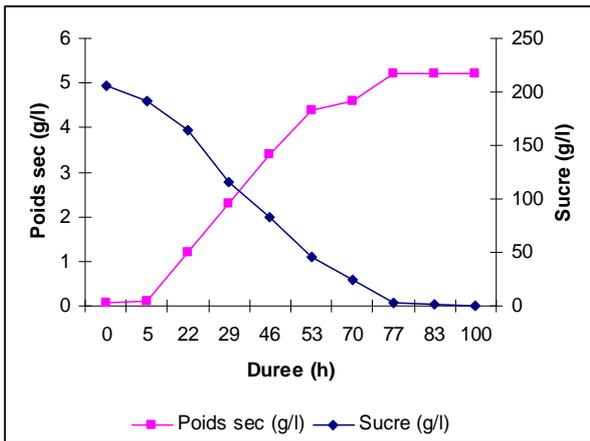


Fig. e-1 Evolution de la biomasse de la souche E et de sa consommation de sucre au cours de sa culture pure en Erlen-meyer.

Fig. e-2 Evolution de la concentration cellulaire de la souche E en fonction de la D.O au cours de sa culture pure en Erlen-meyer.

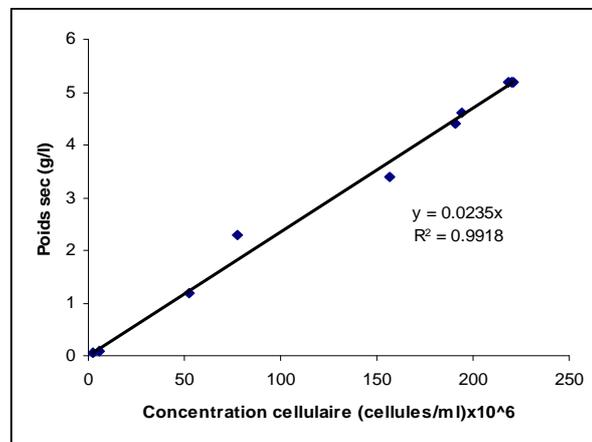
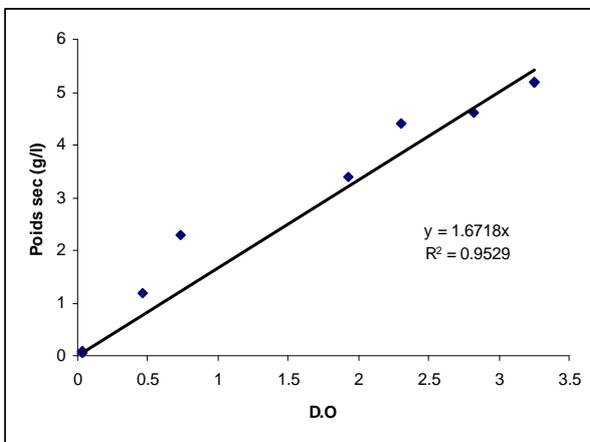


Fig. e-3 Evolution du poids sec de la souche E en fonction de la D.O au cours de sa culture pure en Erlen-meyer.

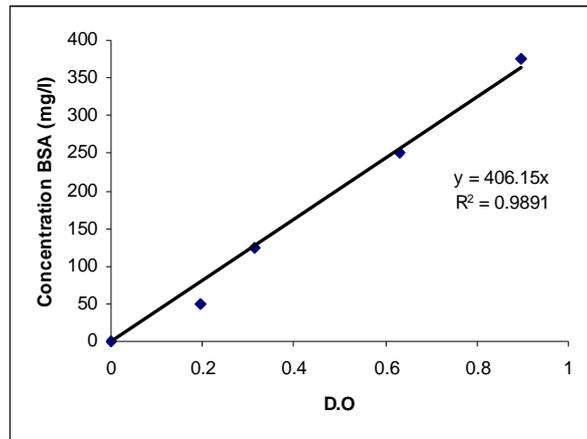
Fig. e-4 Evolution du poids sec de la souche E en fonction de la concentration cellulaire au cours de sa culture pure en Erlen-meyer.

**Etude biochimique**

**a- Dosage des protéines par la méthode de Lowry**

**Gamme étalon de BSA qui a servi pour le dosage**

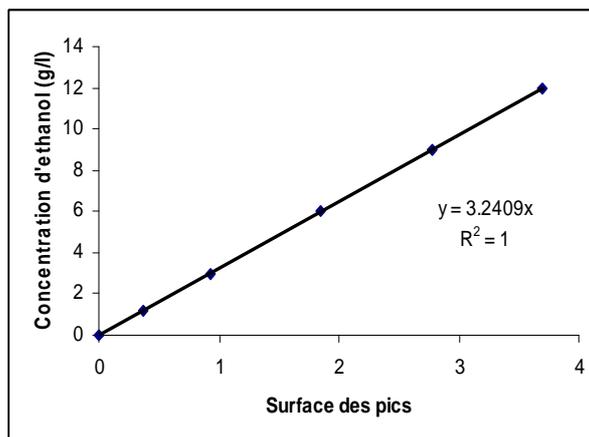
D.O	Concentration de BSA (mg/L)
0,173	0
0,195	50
0,312	125
0,63	250
0,896	375
0,996	500



**b- Dosage de l'éthanol et du glycérol par HPLC**

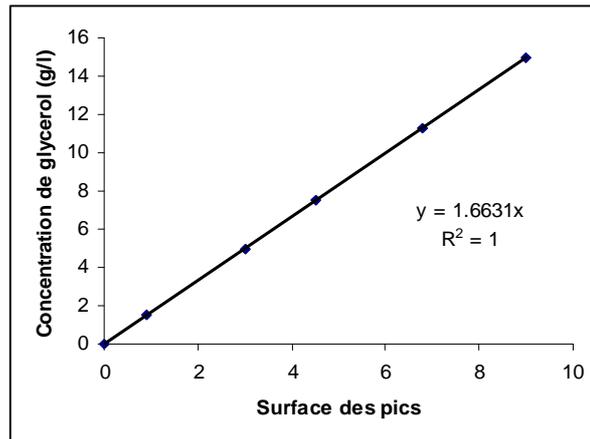
**Gamme étalon qui a servi pour le dosage de l'éthanol**

Surface des pics	Concentration d'éthanol (g/L)
0	0
0.37	1.2
0.93	3
1.85	6
2.78	9
3.7	12



### Gamme étalon qui a servi pour le dosage du glycérol

surface des pics	Concentration de glycérol (g/L)
0	0
0.9	1.5
3	5
4.5	7.5
6.8	11.25
9	15



## Annexes de la partie I-2 : Cultures pures des différentes souches de bactéries lactiques *O. oeni*.

### Etude cinétique

a- Culture pure d'*O. oeni* souche X dans le milieu synthétique jus de raisin en fiole d'Erlenmeyer.

Tableau a-1. Suivi cinétique de la culture pure d'*O. oeni* souche X dans le milieu synthétique jus de raisin en fiole d'Erlenmeyer.

Durée (h)	D.O	Concentration cellulaire (cellules/mL) x 10 <sup>6</sup>	Poids sec (g/L)	acide malique (g/L)
0	0,002	1,9	0,013	5,2
24	0,017	25	0,11	5
48	0,024	35,25	0,16	4,96
72	0,036	53	0,24	4,7
120	0,045	66	0,3	4
168	0,067	98,4	0,44	3
192	0,091	133,6	0,6	2,5
288	0,11	161,6	0,7	0,12

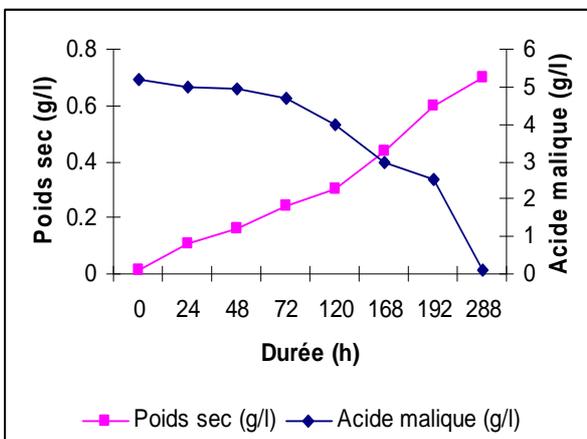


Fig. a-1 Evolution de la biomasse de la souche X et de sa consommation d'acide malique au cours de sa culture pure dans le milieu synthétique jus de raisin en Erlenmeyer

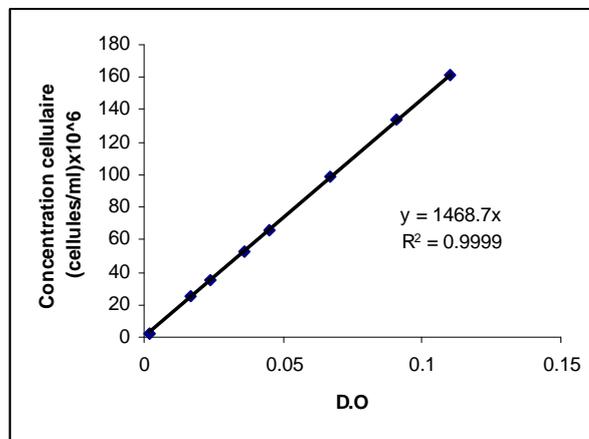


Fig. a-2 Evolution de la concentration cellulaire de la souche X en fonction de la D.O au cours de sa culture pure dans le milieu synthétique jus de raisin en Erlenmeyer

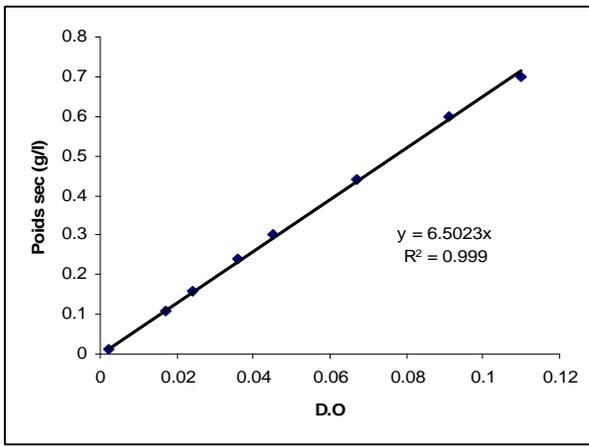


Fig. a-3 Evolution du poids sec de la souche X en fonction de la D.O au cours de sa culture pure dans le milieu synthétique jus de raisin en Erlen-meyer.

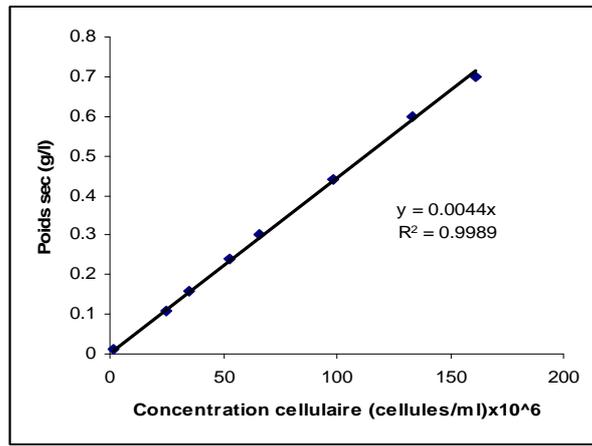


Fig. a-4 Evolution du poids sec de la souche X en fonction de sa concentration cellulaire au cours de sa culture pure dans le milieu synthétique jus de raisin en Erlen-meyer.

**Tableau a-2. Evolution de la consommation de l'azote alpha aminé au cours de la culture pure d'*O. oeni* souche X dans le milieu synthétique jus de raisin en fiole d'Erlen-meyer.**

Durée (h)	Azote alpha-aminé (mg/L)
0	81,2 (±3,1)
24	76,6 (±2,82)
48	72,58 (±0,61)
72	72,58 (±0,52)
120	72,6 (±3,76)
168	72,61 (±3,1)
192	73,6 (±5,4)
288	73 (±4,12)

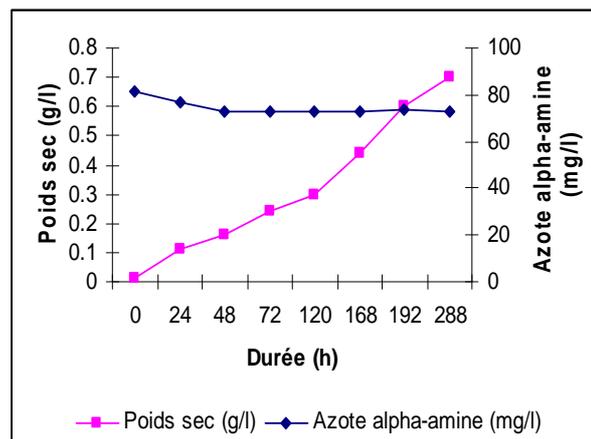


Fig. a-5 Evolution de la biomasse de la souche X et de sa consommation d'azote alpha-aminé au cours de sa culture pure dans le milieu synthétique jus de raisin en Erlen-meyer.

**b- Culture pure d'*O. oeni* souche X en BRM sous air.****Tableau b-1. Suivi cinétique de la culture pure d'*O. oeni* souche X en BRM sous air.**

Durée (h)	D.O	*Concentration cellulaire (cellules/mL) x10 <sup>6</sup> dans le réservoir sans membrane	Poids sec (g/L)	acide malique (g/L) (Réservoir sans membrane)	acide malique (g/L) (Réservoir avec membrane)
0	0,006	5,8	0,026	4,64 (± 0,085)	4,74 (± 0,16)
24	0,024	35	0,16	4,5 (± 0,11)	4,62 (± 0,13)
48	0,03	44,06	0,2	4,33 (± 0,055)	4,57 (± 0,085)
96	0,039	57,28	0,26	3,65 (± 0,12)	3,66 (± 0,12)
120	0,041	60,22	0,27	3,28 (± 0,17)	3,64 (± 0,15)
168	0,063	92,52	0,42	2,7 (± 0,1)	2,94 (± 0,12)
244	0,073	107,21	0,48	2,2 (± 0,13)	2,4 (± 0,085)
268	0,08	117,5	0,53	1,69 (± 0,087)	1,93 (± 0,1)
289	0,084	123,36	0,55	1,45 (± 0,11)	1,64 (± 0,073)
317	0,091	133,64	0,6	1,12 (± 0,15)	1,2 (± 0,17)
341	0,1	147	0,66	0,8 (± 0,073)	0,8 (± 0,085)
413	0,105	154,2	0,69	0,8 (± 0,17)	0,8 (± 0,13)

\* : La concentration cellulaire représentée dans ce tableau correspond à la concentration dans le réservoir contenant les bactéries donc elle est calculée par rapport à un volume de 2L. La concentration réelle des bactéries au cours de cette culture doit être ramenée au volume total, soit 4L et donc on doit diviser les valeurs du tableau par 2. Ceci est aussi vrai pour la D.O et le poids sec et pour toutes les cultures pures d'*O. oeni* en BRM.

**Remarques :**

1- Notons que les corrélations entre concentration cellulaire et D.O, poids sec et D.O et poids sec et concentration cellulaire sont linéaires et sont les mêmes pour toutes les cultures pures d'*O. oeni* souche X puisqu'il s'agit de la même souche et des mêmes conditions opératoires à l'exception du gaz utilisé dans le BRM.

2- Les graphes montrant l'évolution du poids sec de la souche X et sa consommation d'acide malique dans les cultures en BRM sont réalisés en prenant la biomasse (g/L) calculée par rapport au volume total (4L) et la moyenne des concentrations d'acide malique dans les deux réservoirs.

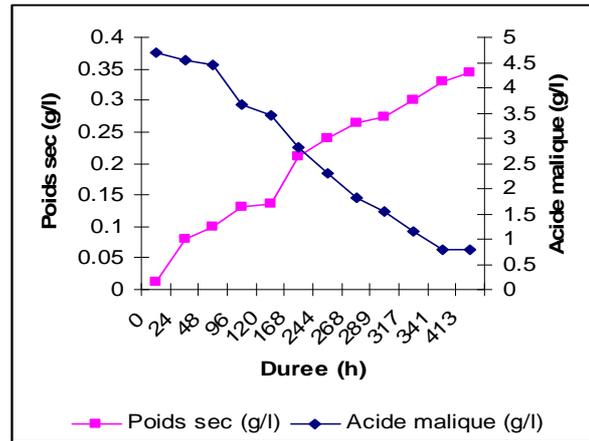


Fig. b-1 Evolution de la biomasse de la souche X et de sa consommation d'acide malique au cours de sa culture pure dans le BRM sous air.

**Tableau b-2. Evolution de la consommation de l'azote alpha aminé au cours de la culture pure d'*O. oeni* souche X en BRM sous air.**

Durée (h)	Azote alpha-aminé (mg/L) (Réservoir sans membrane)	Azote alpha-amine (mg/L) (Réservoir avec membrane)	Concentration moyenne (mg/L)
0	79,81 (±2)	78,62 (±0,5)	79.22
24	77,05 (±1,22)	75,68 (±0)	76.37
48	75,4 (±1,13)	73,62 (±0,5)	74.5
96	75 (±0,52)	75,43 (±0,7)	75.2
120	75,94 (±0,76)	75,3 (±1)	75.62
168	77,4 (±3,1)	77,91 (±2,4)	77.7
244	73,24 (±3,4)	73,6 (±3)	73.4
268	72,38 (±3,12)	74,7 (±3,6)	73.54
289	75,5 (±2)	73,67 (±1,4)	75
317	79,43 (±3,4)	73,5 (±2,3)	76.5
341	75,74 (±0,5)	76,8 (±1,3)	76.3
413	79,43 (±3,6)	79,6 (±3,4)	79.5

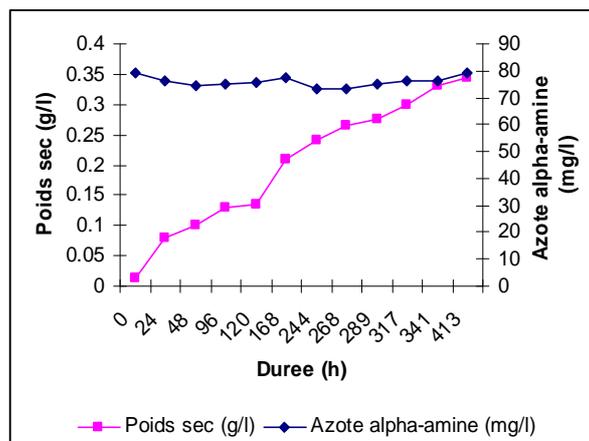


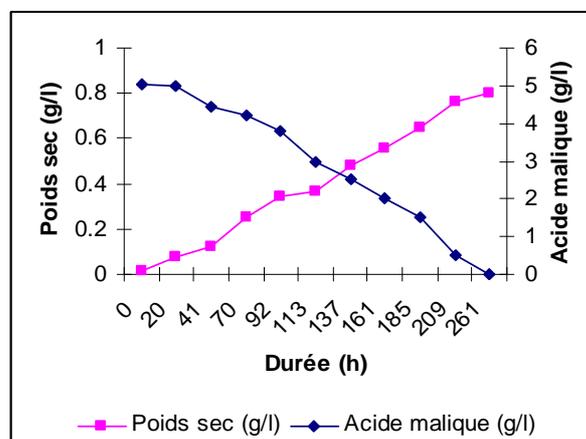
Fig. b-2 Evolution de la biomasse de la souche X et de sa consommation d'azote alpha-aminé au cours de sa culture pure en BRM sous air.

**Tableau b-3. Temps d'inversion du milieu d'un réservoir à l'autre pendant la culture pure d'*O. oeni* souche X dans le BRM sous air.**

Durée (h)	Temps d'inversion (secondes)	
	Réservoir sans membrane → Réservoir avec membrane	Réservoir avec membrane → Réservoir sans membrane
0	10	11
24	11	12
48	11	13
96	12	14
120	12	15
168	13	17
244	14	17
268	14	18
289	15	19
317	17	20
341	18	20

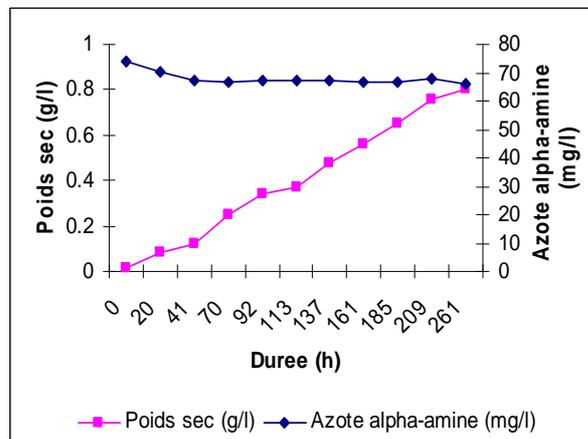
**c- Culture pure d'*O. oeni* souche X en BRM sous CO<sub>2</sub>.****Tableau c-1. Suivi cinétique de la culture pure d'*O. oeni* souche X en BRM sous CO<sub>2</sub>.**

Durée (h)	D.O	Concentration cellulaire (cellules/mL) x 10 <sup>6</sup>	Poids sec (g/L)	Acide malique (g/L) (Réservoir sans membrane)	Acide malique (g/L) (Réservoir avec membrane)
0	0,005	6,97 (±1,54)	0,03 (±0,0067)	5 (±0)	5,08 (±0,024)
20	0,025	36 (±4,5)	0,16 (±0,04)	5 (±0)	5 (±0)
41	0,036	52,62 (±1,5)	0,24 (±0,013)	4,32 (±0,33)	4,53 (±0,17)
70	0,074	108,33 (±4,5)	0,5 (±0,038)	4,02 (±0,15)	4,4 (±0,25)
92	0,1	150 (±6,5)	0,68 (±0,13)	3,72 (±0,18)	3,84 (±0,19)
113	0,11	164 (±6,6)	0,74 (±0,049)	2,93 (±0,23)	3,12 (±0,14)
137	0,14	212,5 (±5,5)	0,96 (±0,049)	2,5 (±0,39)	2,54 (±0,47)
161	0,17	246 (±8,3)	1,11 (±0,073)	1,97 (±0,03)	2,1 (±0,18)
185	0,2	288 (±6,9)	1,3 (±0,024)	1,4 (±0,046)	1,57 (±0,2)
209	0,23	338 (±3,8)	1,52 (±0,09)	0,95 (±0,006)	0,98 (±0,12)
261	0,24	352,5 (±5,28)	1,6 (±0,049)	0 (±0)	0 (±0)

Fig. c-1 Evolution de la biomasse de la souche X et sa consommation d'acide malique au cours de sa culture pure en BRM sous CO<sub>2</sub>.

**Tableau c-2. Evolution de la consommation de l'azote alpha aminé au cours de la culture pure d'*O. oeni* souche X en BRM sous CO<sub>2</sub>.**

Durée (h)	Azote alpha-aminé (mg/L) (Réservoir sans membrane)	Azote alpha-amine (mg/L) (Réservoir avec membrane)	Concentration moyenne (mg/L)
0	76,02 ( $\pm 3,28$ )	72 ( $\pm 2,43$ )	74
20	72,5 ( $\pm 3,87$ )	68 ( $\pm 2,24$ )	70.25
41	67,11 ( $\pm 3,37$ )	67,7 ( $\pm 2,55$ )	67.4
70	67,6 ( $\pm 3,52$ )	65,8 ( $\pm 2,7$ )	66.7
92	65,33 ( $\pm 2,76$ )	68,7 ( $\pm 3$ )	67
113	68 ( $\pm 3,1$ )	65,87 ( $\pm 2,4$ )	67
137	68 ( $\pm 3,4$ )	66 ( $\pm 2$ )	67
161	69 ( $\pm 3,12$ )	64,4 ( $\pm 1,6$ )	66.7
185	69,34 ( $\pm 2$ )	63,5 ( $\pm 1,4$ )	66.42
209	69,52 ( $\pm 3,4$ )	66 ( $\pm 2,3$ )	67.7
261	67,8 ( $\pm 2,5$ )	64,8 ( $\pm 1,3$ )	66.3

Fig. c-2 Evolution de la biomasse de la souche X et de sa consommation d'azote alpha aminé au cours de sa culture pure en BRM sous CO<sub>2</sub>.**Tableau c-3 Temps d'inversion du milieu d'un réservoir à l'autre pendant la culture pure d'*O. oeni* souche X dans le BRM sous CO<sub>2</sub>.**

Durée (h)	Temps d'inversion (secondes)	
	Réservoir sans membrane → Réservoir avec membrane	Réservoir avec membrane → Réservoir sans membrane
0	16	20
20	20	24
41	22	27
70	25	30
92	26	32
113	30	35
137	32	37
161	33	39
185	35	42
261	36	45

**d- Culture pure d'*O. oeni* souche X en BRM sous azote.****Tableau d-1. Suivi cinétique de la culture pure d'*O. oeni* souche X en BRM sous azote.**

Durée (h)	D.O	Concentration cellulaire (cellules/mL) x 10 <sup>6</sup>	Poids sec (g/L)	Acide malique (g/L) (Réservoir sans membrane)	Acide malique (g/L) (Réservoir avec membrane)
0	0,003	4,1 (± 0,27)	0,02 (± 0,004)	5 (± 0,32)	4,9 (± 0,27)
19	0,004	5,77 (± 0,35)	0,026 (± 0,002)	4,94 (± 0,04)	4,8 (± 0,44)
47	0,012	18 (± 0,43)	0,08 (± 0,002)	4,75 (± 0,042)	4,74 (± 0,032)
69	0,017	25 (± 4,3)	0,11(± 0,02)	4,44 (± 0,64)	4,57 (± 0,1)
97	0,042	61,25 (± 1,15)	0,28 (± 0,006)	4,37 (± 0,12)	4,4 (± 0,05)
116	0,061	90 (± 5)	0,4 (± 0,025)	3,85 (± 0,056)	3,9 (± 0,1)
139	0,114	167,4 (± 5)	0,75 (± 0,045)	3,43 (± 0,061)	3,25 (± 0,23)
164	0,16	235 (± 2,52)	1,06 (± 0,01)	2,15 (± 0,087)	2,36 (± 0,08)
187	0,195	285 (± 2)	1,29 (± 0,01)	1,6 (± 0,061)	1,78 (± 0,07)
211	0,24	352 (± 6)	1,58 (± 0,02)	0,8 (± 0,02)	1 (± 0,1)
283	0,27	396 (± 2,7)	1,78 (± 0,007)	0 (± 0)	0 (± 0)

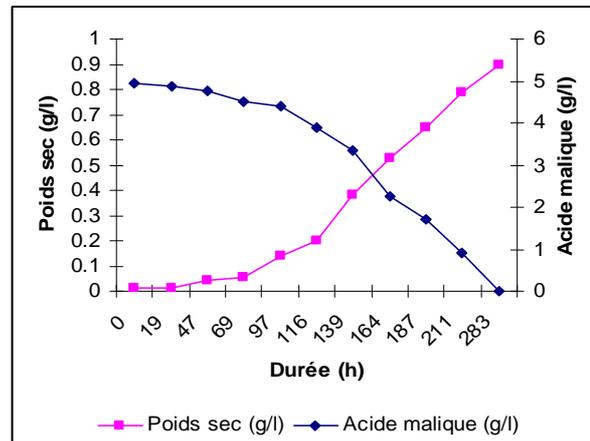


Fig. d-1 Evolution de la biomasse de la souche X et de sa consommation d'acide malique au cours de sa culture pure en BRM sous azote.

**Tableau d-2. Evolution de la consommation de l'azote alpha aminé au cours de la culture pure d'*O. oeni* souche X en BRM sous azote.**

Durée (h)	Azote alpha-aminé (mg/L) (Réservoir sans membrane)	Azote alpha-aminé (mg/L) (Réservoir avec membrane)	Concentration moyenne (mg/L)
0	81,61 (±1,46)	80,6 (±0,23)	81.11
19	79 (±2)	77,14 (±2,43)	78.1
47	70,36 (±0,25)	70,43 (±1,7)	70.4
69	70,36 (±0,52)	70,74 (±0,7)	70.6
97	70,6 (±0,76)	70,7 (±1,3)	70.7
116	70,42 (±1,1)	70,2 (±1,4)	70.3
139	70,23 (±1,4)	70 (±0,2)	70
164	70,83 (±1,12)	70,6 (±1,6)	70.72
187	73,16 (±2)	73,3 (±1,4)	73.23
211	73,1 (±2,4)	73,31 (±2,3)	73.2
283	73,16 (±2,5)	73,11 (±1,3)	73.14

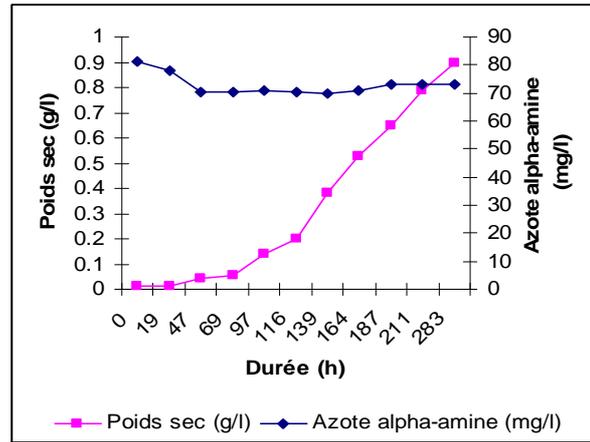


Fig. d-2 Evolution de la biomasse de la souche X et de sa consommation d'azote alpha-aminé au cours de sa culture pure en BRM sous azote.

**Tableau d-3 Temps d'inversion du milieu d'un réservoir à l'autre pendant la culture pure d'*O. oeni* souche X dans le BRM sous azote.**

Durée (h)	Temps d'inversion (secondes)	
	Réservoir sans membrane → Réservoir avec membrane	Réservoir avec membrane → Réservoir sans membrane
0	9	9
19	12	13
47	15	18
69	25	30
97	21	17
116	21	25
139	24	27
164	28	32
187	32	35
211	37	40
283	40	42

e- Culture pure d'*O. oeni* souche X dans le milieu synthétique vin en fiole d'Erlen-meyer.Tableau e-1. Suivi cinétique de la culture pure d'*O. oeni* souche X dans le milieu synthétique vin en fiole d'Erlen-meyer.

Durée (h)	Concentration cellulaire (cellules/mL) x 10 <sup>6</sup>	Poids sec (g/L)	Acide malique (g/L)
0	2,8 (±0,14)	0,0126 (±0,0006)	4 (±0,021)
19	4,54 (±0,27)	0,02 (±0,0015)	3,91 (±0,01)
47	6,7 (±0,17)	0,03 (±0,0012)	3,84 (±0,025)
122	7,5 (±0,27)	0,034 (±0,0012)	3,8 (±0,02)
164	8,5 (±0,23)	0,038 (±0,0015)	3,7 (±0,06)
215	19,45 (±0,13)	0,086 (±0,0006)	3,66 (±0,012)
313	38 (±0,12)	0,17 (±0)	3,27 (±0,02)
355	50,2 (±1,38)	0,23 (±0,006)	2,93 (±0,04)
450	63,3 (±3,5)	0,28 (±0,015)	1,91 (±0,076)
525	63,07 (±)	0,28 (±0,06)	1,36 (±0,006)
623	59,8 (±0,54)	0,27 (±0)	0,8 (±0,006)
695	64,43 (±1)	0,29 (±0,006)	0 (±0)

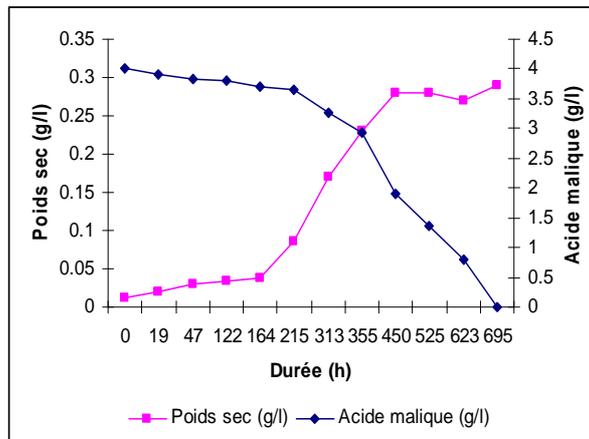


Fig. e-1 Evolution de la biomasse de la souche X et de sa consommation d'acide malique au cours de sa culture pure dans le milieu synthétique vin en Erlen-meyer.

**Tableau e-2. Evolution de la consommation de l'azote alpha aminé au cours de la culture pure d'*O. oeni* souche X dans le milieu synthétique vin en fiole d'Erlen-meyer.**

Durée (h)	Azote alpha-aminé (mg/L)
0	25,74 ( $\pm 1,46$ )
19	24,02 ( $\pm 1,46$ )
47	21,44 ( $\pm 1$ )
122	22 ( $\pm 0,73$ )
164	22,13 ( $\pm 1$ )
215	22,19 ( $\pm 1$ )
313	22,67 ( $\pm 1,4$ )
355	22,81 ( $\pm 1,12$ )
450	22,64 ( $\pm 0,62$ )
525	22,16 ( $\pm 0,73$ )
623	22,2 ( $\pm 0,54$ )
695	22,16 ( $\pm 0,76$ )

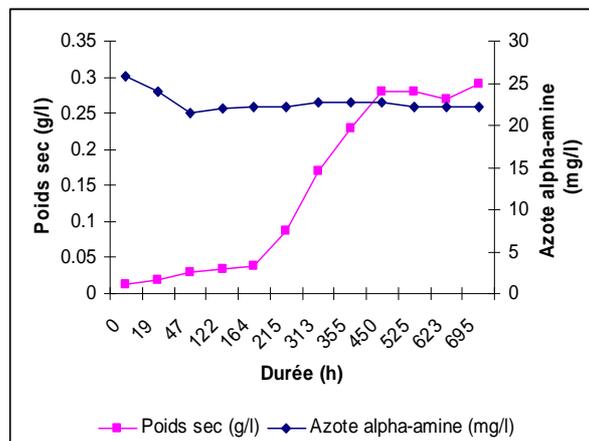


Fig. e-2 Evolution de la biomasse de la souche X et de sa consommation d'azote alpha-aminé au cours de sa culture pure dans le milieu synthétique vin en Erlen-meyer.

**f- Culture pure d'*O. oeni* souche Y dans le milieu synthétique jus de raisin en fiole d'Erlen-meyer.**

**Tableau f-1. Suivi cinétique de la culture pure d'*O. oeni* souche Y dans le milieu synthétique jus de raisin en fiole d'Erlen-meyer.**

Durée (h)	D.O	Concentration cellulaire (cellules/mL) x 10 <sup>6</sup>	Poids sec (g/L)	Acide malique (g/L)
0	0.001	1.8	0.0007	4.88
72	0.004	5.3	0.0026	4.67
120	0.005	7.57	0.0033	4.23
165	0.007	10.6	0.0046	3.96
237	0.01	16.5	0.007	3.83
285	0.014	22.5	0.0091	3.6
333	0.027	44.6	0.018	3.3
404	0.037	59.5	0.024	3
452	0.048	87.33	0.035	2.7
501	0.053	91	0.035	2.55
579	0.08	137.3	0.055	2.39
619	0.095	163	0.062	2.03
672	0.119	204.2	0.082	1.8
744	0.124	213	0.085	1.63
792	0.128	220	0.088	1.49
863	0.14	240	0.096	1.25
915	0.142	244	0.098	1.05
962	0.144	247.1	0.099	0.94
1077	0.144	247.1	0.099	0.76
1128	0.145	249	0.1	0.57
1172	0.147	252	0.1	0.32
1319	0.145	249	0.1	0

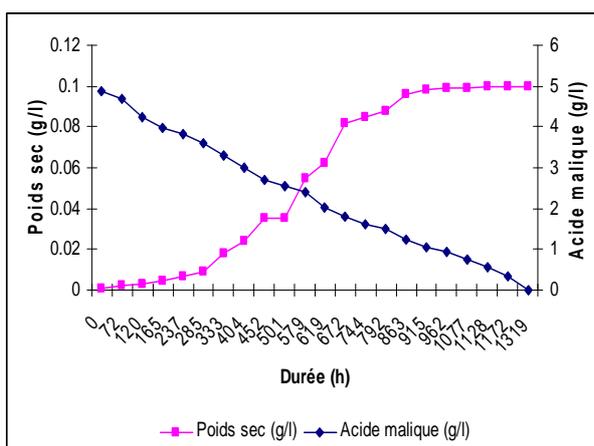


Fig. f-1 Evolution de la biomasse de la souche Y et de sa consommation d'acide malique au cours de sa culture pure dans le milieu synthétique jus de raisin en Erlen-meyer.

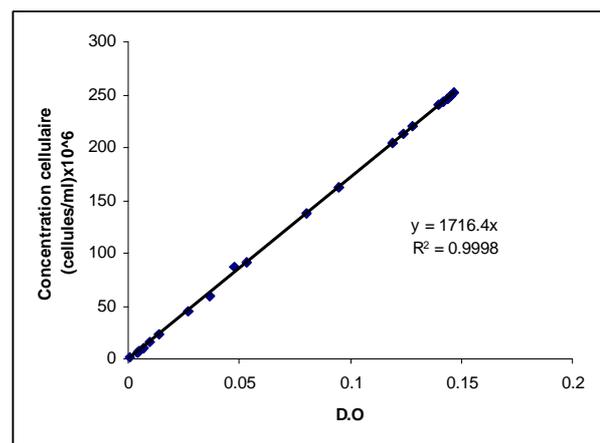


Fig. f-2 Evolution de la concentration cellulaire de la souche Y en fonction de la D.O au cours de sa culture pure dans le milieu synthétique jus de raisin en Erlen-meyer.

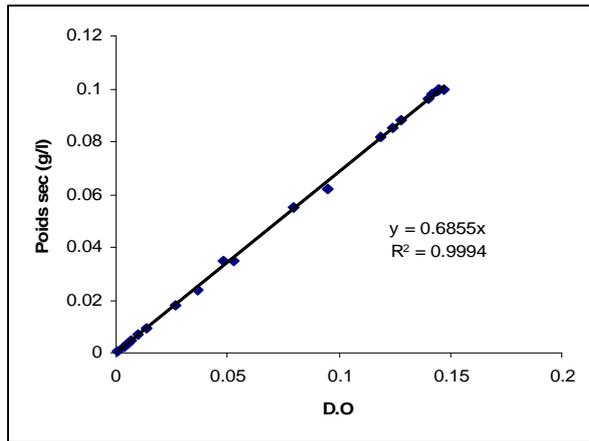


Fig. f-3 Evolution du poids sec de la souche Y en fonction de la D.O au cours de sa culture pure dans le milieu synthétique jus de raisin en Erlen-meyer.

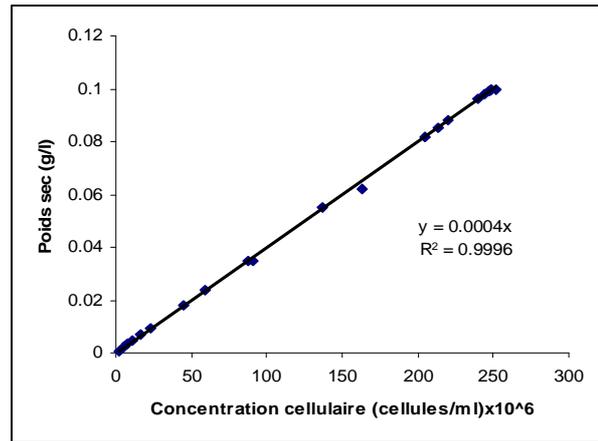


Fig. f-4 Evolution du poids sec de la souche Y en fonction de sa concentration cellulaire au cours de sa culture pure dans le milieu synthétique jus de raisin en Erlen-meyer.

### g- Culture pure d'*O. oeni* souche Z dans le milieu synthétique jus de raisin en fiole d'Erlen-meyer.

Tableau g-1. Suivi cinétique de la culture pure d'*O. oeni* souche Z dans le milieu synthétique jus de raisin en fiole d'Erlen-meyer.

Durée (h)	D.O	Concentration (cellules/mL) x 10 <sup>6</sup>	Poids sec (g/L)	Acide Malique (g/L)
0	0,008	2,6	0,044	5,2
22	0,016	5	0,09	5,14
47	0,027	12	0,16	5,08
71	0,042	32	0,24	5
120	0,06	52	0,4	3,6
167	0,09	68	0,52	2,1
191	0,098	76	0,56	1
263	0,11	92	0,6	0

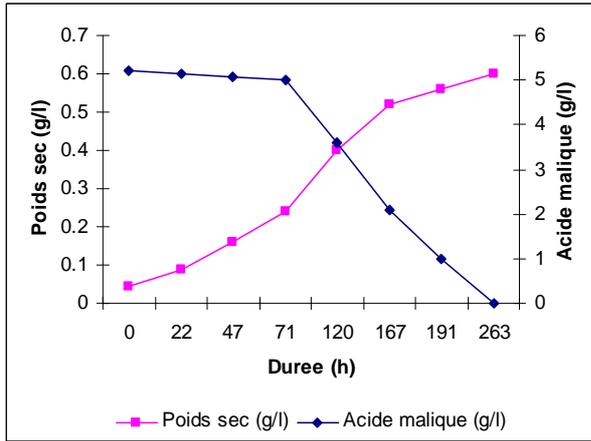


Fig. g-1 Evolution de la biomasse de la souche Z et de sa consommation d'acide malique au cours de sa culture pure dans le milieu synthétique jus de raisin en Erlen-meyer.

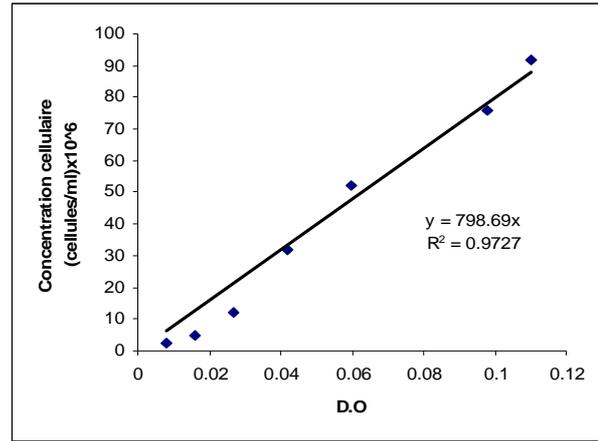


Fig. g-2 Evolution de la concentration cellulaire de la souche Z en fonction de la D.O au cours de sa culture pure dans le milieu synthétique jus de raisin en Erlen-meyer.

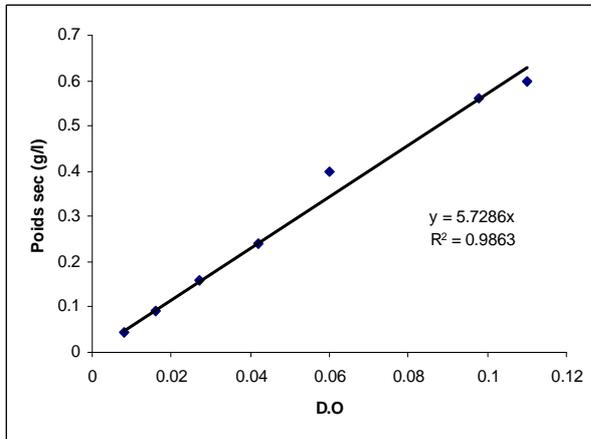


Fig. g-3 Evolution du poids sec de la souche Z en fonction de la D.O au cours de sa culture pure dans le milieu synthétique jus de raisin en Erlen-meyer.

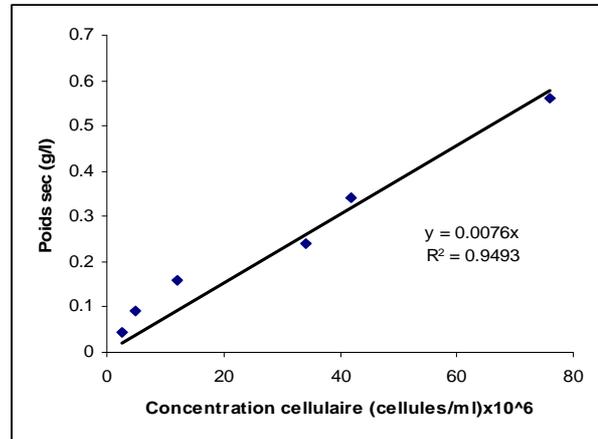


Fig. g-4 Evolution du poids sec de la souche Z en fonction de sa concentration cellulaire au cours de sa culture pure dans le milieu synthétique jus de raisin en Erlen-meyer.

## *Partie II. Cultures séquentielles*



## Partie II. Cultures séquentielles.

Les cultures séquentielles réalisées au cours de ce travail ont simulé le procédé de vinification naturel. En d'autres termes la FML a commencé quand la FA a été achevée. Pour cela, les milieux synthétiques jus de raisin préfermentés par les différentes souches de levure *S. cerevisiae* sont passés par différentes étapes comme décrit dans la partie II-2-1-1 du chapitre II, paragraphe c, avant d'être inoculés par les bactéries. Les FML ont été réalisées en fioles d'Erlen-meyer et ont été suivies jusqu'à l'arrêt de consommation de l'acide malique. Les couples levure-bactérie étudiés en culture séquentielle sont les suivants :

- *S. cerevisiae* souche A/O. *oeni* souche X
- *S. cerevisiae* souche B/O. *oeni* souche X
- *S. cerevisiae* souche C/O. *oeni* souche X
- *S. cerevisiae* souche D/O. *oeni* souche X
- *S. cerevisiae* souche B/O. *oeni* souche Y
- *S. cerevisiae* souche C/O. *oeni* souche Y
- *S. cerevisiae* souche D/O. *oeni* souche Y

### II-1 Cultures séquentielles réalisées avec *O. oeni* souche X

#### II-1-1 Optimisation des conditions de réalisation des cultures séquentielles : adaptation des bactéries à l'éthanol et emploi d'un complément nutritionnel.

Dans le but d'assurer des conditions favorables à la réalisation des FML, deux conditions ont été testées : adaptation des bactéries à l'éthanol avant leur inoculation dans les milieux préfermentés par les levures et addition d'un complément nutritionnel aux milieux préfermentés.

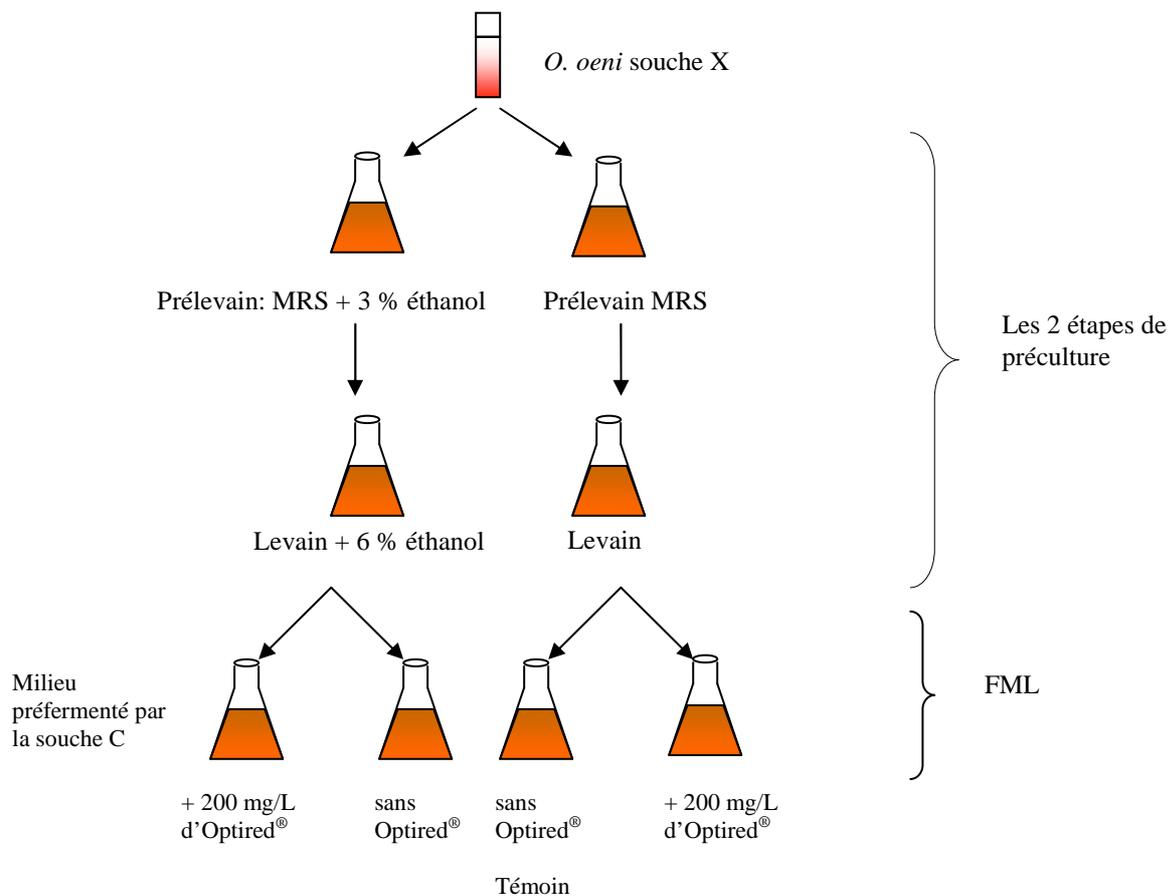
Les milieux préfermentés par les différentes souches de levure contiennent entre 9,7 et 11 % d'éthanol (v/v) (cf tableau I-2 de la partie I-1-2 de ce chapitre). Une adaptation des bactéries à l'éthanol par augmentation progressive de la teneur en éthanol des précultures pourrait aider les bactéries à mieux résister aux conditions stressantes des milieux préfermentés par les levures. Nous avons vérifié cette hypothèse en ajoutant 3 % d'éthanol (v/v) au milieu MRS servant de prélevain et 6 % d'éthanol (v/v) au milieu synthétique servant de levain.

De plus, 200 mg/L d'un complément nutritionnel riche en mannoprotéines (Optired<sup>®</sup>), fourni par Lallemand Inc., ont été ajoutés aux milieux préfermentés par les levures et leur impact sur le déroulement de la FML a été évalué.

Le couple *S. cerevisiae* souche C/*O. oeni* souche X a été étudié en testant les 4 conditions suivantes :

- Témoin : sans adaptation des bactéries à l'éthanol et sans Optired®.
- Adaptation des bactéries à l'éthanol et absence d'Optired®.
- Sans adaptation des bactéries à l'éthanol et addition d'Optired®.
- Adaptation des bactéries à l'éthanol et addition d'Optired®.

Ces 4 conditions sont illustrées dans la figure II-1 suivante :



**Figure II-1. FML menées par *O. oeni* souche X dans le milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche C dans 4 conditions différentes.**

## Résultats

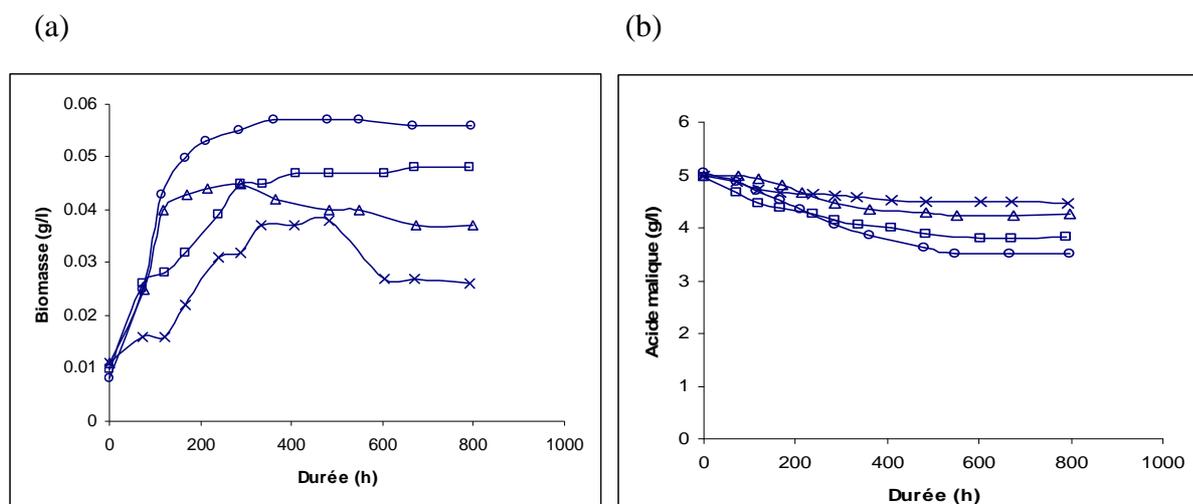


Fig. II-2 Evolution de la biomasse d'*O. oeni* souche X (a) et de sa consommation d'acide malique (b) pendant les FML réalisées dans le milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche C. (x) Témoin : sans adaptation à l'éthanol et sans Optired<sup>®</sup>, (Δ) adaptation à l'éthanol et absence d'Optired<sup>®</sup>, (□) sans adaptation à l'éthanol et addition d'Optired<sup>®</sup>, (○) adaptation à l'éthanol et addition d'Optired<sup>®</sup>.

**Tableau II-1. Paramètres cinétiques des FML menées par *O. oeni* souche X dans le milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche C suivant les 4 conditions testées.**

	Témoin	Adaptation à l'éthanol et absence d'Optired <sup>®</sup>	Sans adaptation à l'éthanol et addition d'Optired <sup>®</sup>	Adaptation à l'éthanol et addition d'Optired <sup>®</sup>
Biomasse initiale (g/L)	0,011	0,011	0,01	0,008
Biomasse maximale (g/L)	0,037	0,045	0,047	0,057
Productivité (g/L/h)	$7,8 \times 10^{-5}$	$12 \times 10^{-5}$	$12 \times 10^{-5}$	$13,6 \times 10^{-5}$
Vitesse spécifique maximale de croissance : $\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )	$2,11 \times 10^{-3}$	$6,1 \times 10^{-3}$	$2,7 \times 10^{-3}$	$7 \times 10^{-3}$
Acide malique initial (g/L)	5	5	4,95	5,05
Acide malique final (g/L)	4,5	4,24	3,8	3,5
Vitesse globale de consommation de l'acide malique (g/L/h)	$10^{-3}$	$1,4 \times 10^{-3}$	$1,91 \times 10^{-3}$	$2,83 \times 10^{-3}$
Vitesse spécifique moyenne de démalication (g/g/h)	$26 \times 10^{-3}$	$35 \times 10^{-3}$	$41 \times 10^{-3}$	$50 \times 10^{-3}$
Durée de la FML (h)	483	550	603	548

## Discussion

La figure II-2 et le tableau II-1 nous permettent d'évaluer l'effet de l'adaptation des bactéries à l'éthanol avant leur inoculation dans le milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche C et l'effet de l'addition à ce milieu d'un complément nutritionnel riche en mannoprotéines reconnu sous le nom

d'Optired<sup>®</sup>. Nous constatons une nette amélioration de la croissance cellulaire des bactéries quand elles sont uniquement adaptées à l'éthanol. Dans ce cas, les bactéries se multiplient rapidement pour atteindre une biomasse de 0,04 g/L ( $9,2 \times 10^6$  cellules/mL) après 120 heures, alors que ces mêmes bactéries dans le milieu témoin n'avaient atteint qu'une biomasse de 0,016 g/L ( $3,44 \times 10^6$  cellules/mL) pendant la même durée. Ensuite la croissance cellulaire des bactéries adaptées continue à évoluer jusqu'à l'obtention d'une biomasse de 0,045 g/L ( $9,92 \times 10^6$  cellules/mL) après 287 heures suivie d'une phase de déclin aboutissant à une biomasse de 0,037 g/L ( $8,3 \times 10^6$  cellules/mL) après 673 heures. Quant aux bactéries non adaptées, elles ont aussi poursuivi leur croissance cellulaire mais plus lentement et ont atteint une biomasse maximale de 0,037 g/L ( $8,2 \times 10^6$  cellules/mL) après 335 heures suivie d'une phase de déclin beaucoup plus marquée que celle observée avec les bactéries adaptées et aboutissant à une biomasse de 0,027 g/L ( $6 \times 10^6$  cellules/mL) après 603 heures. La productivité et la vitesse spécifique de croissance des bactéries adaptées à l'éthanol étaient respectivement 1,54 et 2,9 fois plus élevées que celles du témoin (Tableau II-1).

En ce qui concerne l'addition de 200 mg/L d'Optired<sup>®</sup>, nous avons également observé une nette amélioration de la croissance cellulaire. En effet, après 335 heures de suivi de la fermentation, la biomasse maximale atteinte en présence d'Optired<sup>®</sup> était de 0,047 g/L ( $10,4 \times 10^6$  cellules/mL) alors que celle obtenue avec le témoin était de 0,037 g/L ( $8,3 \times 10^6$  cellules/mL). De plus, après ces 335 heures les bactéries ont atteint la phase stationnaire en présence d'Optired<sup>®</sup> qui a été maintenue tout au long de la fermentation et on n'a observé aucun déclin contrairement au témoin (Fig. II-2). La productivité et la vitesse spécifique maximale de croissance en présence d'Optired<sup>®</sup> étaient 1,54 et 1,3 fois plus élevées que celles du témoin (Tableau II-1).

On peut conclure que ces deux facteurs ont un effet positif sur l'amélioration de la croissance cellulaire avec un impact plus important de l'adaptation à l'éthanol sur la vitesse spécifique maximale de croissance.

L'application de ces deux facteurs ensemble a lui aussi amélioré nettement la croissance cellulaire des bactéries. On a ainsi obtenu la biomasse maximale, la productivité et la vitesse spécifique maximale de croissance les plus élevées. La productivité et la vitesse spécifique maximale de croissance ont été 1,74 et 3,32 fois plus importantes que celles du témoin. Ces deux facteurs réunis ensemble avaient ainsi un effet cumulatif mais non additif sur la croissance cellulaire.

Parallèlement à la croissance cellulaire, la démalication a aussi été améliorée par ces deux facteurs. L'adaptation à l'éthanol a amélioré les vitesses globale et spécifique de démalication de 1,4 fois. L'Optired<sup>®</sup> les a améliorées de 1,91 et 1,6 fois respectivement. Les deux facteurs ensemble les ont améliorées de 2,83 et 1,92 fois. On peut conclure comme pour la croissance cellulaire, que ces deux facteurs ensemble avaient un effet cumulatif mais non additif sur l'amélioration de la démalication.

De plus l'effet de l'Optired® était plus important que celui de l'adaptation à l'éthanol sur la démalication contrairement à la croissance cellulaire ou l'effet de l'adaptation à l'éthanol était plus marquant.

L'amélioration de la FML par adaptation des bactéries à l'éthanol et addition d'Optired® dans le milieu préfermenté peut être expliquée de la façon suivante :

Il a été montré par plusieurs auteurs qu'*O. oeni* a besoin d'une phase d'adaptation à l'éthanol pour croître dans les conditions de vinification et qu'il est recommandé lors de l'emploi d'un levain malolactique comme dans notre cas, de préparer celui-ci en le mélangeant avec le vin à traiter pour habituer les bactéries au milieu (Peynaud 1984, Gerbeaux, 1998). En effet, les cellules d'*O. oeni* adaptées à l'éthanol sont capables de répondre à l'effet fluidisant de ce dernier en augmentant l'ordre des lipides au niveau de l'interface lipido-aqueuse et en diminuant la perméabilité. Il a été aussi montré que les bactéries possèdent un mécanisme d'adaptation qui permet de compenser l'effet de l'accumulation de substances toxiques amphiphiles comme l'éthanol dans leur membrane (Weber *et al.* 1996). Ces mécanismes impliquent la synthèse de protéines de stress comme la protéine Lo18 (Jobin *et al.* 1997, Mantis *et al.* 1992, Coucheney *et al.* 2005). Tsvetkova *et al.* (2002) et Coucheney *et al.* (2005) ont montré que ces protéines interagissent avec la bicouche lipidique et la stabilise. Un autre mécanisme impliquant des protéines et des composés cytoplasmiques indépendants des protéines de stress participent également à cette stabilisation (Graca Da Silveira *et al.* 2003).

Donc l'amélioration de la croissance bactérienne et de la démalication dans notre cas a été sûrement due à des mécanismes similaires. Notons que ces mécanismes ont probablement renforcé la résistance des bactéries à l'éthanol (9,7 % (v/v)) mais aussi à d'autres facteurs inhibiteurs du milieu comme le SO<sub>2</sub> et les acides gras dont les concentrations produites par *S. cerevisiae* souche C sont représentées dans le tableau I-2 de la partie I-1-2 de ce chapitre.

Par ailleurs, l'effet positif de l'Optired® utilisé est probablement dû à sa composition en mannoprotéines. Le dosage de ces dernières a montré que les 200 mg/L d'Optired® utilisés renfermaient 95 mg/L de mannoprotéines. Ces dernières sont capables d'améliorer la FML en agissant de deux façons (Guilloux-Benatier et Feuillat, 1993):

- 1- détoxification du milieu par adsorption des acides gras inhibiteurs des bactéries lactiques.
- 2- rôle nutritionnel car *O. oeni* possède le matériel enzymatique nécessaire à la dégradation des macromolécules ( $\beta$ -glucosidase,  $\alpha$ -glucosidase, N-acétyl-glucosaminidase, glucanases et aminopeptidases). Les produits d'hydrolyse vont enrichir le milieu en nutriments.

Rappelons que *S. cerevisiae* souche C a produit les concentrations les plus élevées d'acide octanoïque, décanoïque et dodécanoïque parmi les différentes souches testées (cf tableau I-2 de la

partie I-1-2 de ce chapitre). L'adsorption de ces acides gras par les mannoprotéines de l'Optired® a probablement joué un rôle positif dans l'amélioration de la FML.

Suite aux résultats obtenus avec le couple *S. cerevisiae* souche C/*O. oeni* souche X, nous avons décidé d'adapter toujours les bactéries à l'éthanol avant inoculation dans les milieux préfermentés par les différentes souches de levure testées et aussi avant utilisation de ces bactéries en cultures mixtes. Nous avons également décidé de rajouter 200 mg/L d'Optired® aux milieux préfermentés par les levures avant la réalisation des cultures séquentielles.

### **II-1-2 Comparaison des résultats des FML menées par *O. oeni* souche X dans le milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche C en présence de 200 mg/L d'Optired®, d'Optimalo® ou d'Extrait de levure.**

Ces FML ont été réalisées en fioles d'Erlen-meyer et les bactéries ont été adaptées à l'éthanol avant leur inoculation dans le milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche C. L'Optimalo® comme l'Optired® est un complément nutritionnel commercial fourni par Lallemand Inc., mais qui ne contient pas de mannoprotéines. Il est rajouté aux milieux préfermentés par les levures avant l'inoculation des bactéries. Son addition a pour but d'améliorer la FML par enrichissement du milieu en nutriments. Sa composition en nutriments ne nous a pas été fournie. En rajoutant des quantités identiques (200 mg/L) d'Optired®, d'Optimalo® et d'extrait de levure (le même extrait de levure employé dans la préparation des milieux de culture), au milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche C, nous avons voulu comparer l'effet de ces compléments nutritionnels sur la FML menée par *O. oeni* souche X.

## Résultats

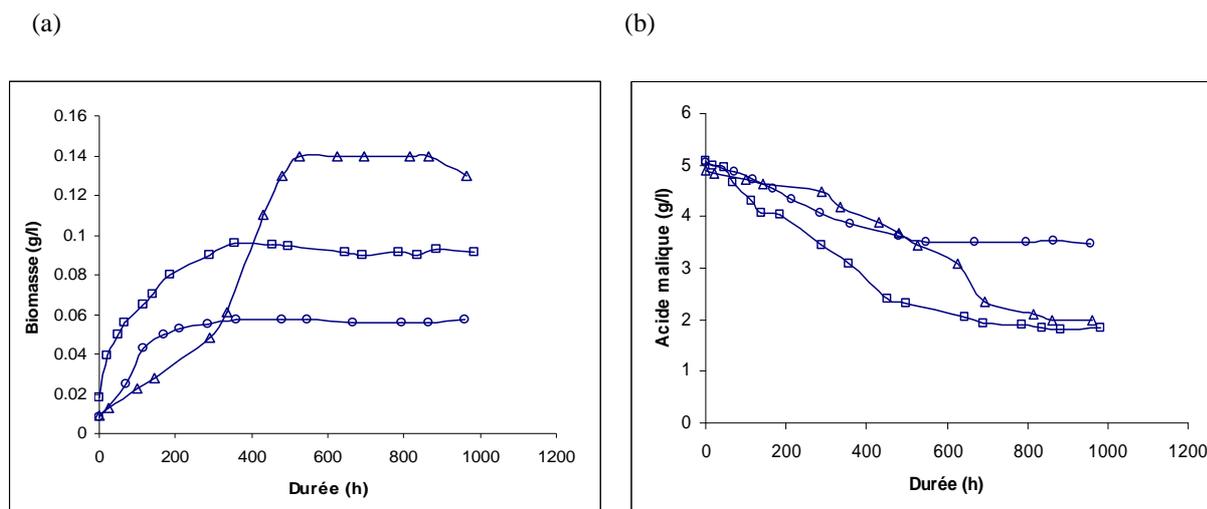


Fig. II-3 Evolution de la biomasse d'*O. oeni* souche X (a) et de sa consommation d'acide malique (b) dans le milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche C en présence de différents compléments nutritionnels. (○) Optired®, (Δ) Optimalo®, (□) Extrait de levure.

**Tableau II-2. Paramètres cinétiques des FML menées par *O. oeni* souche X dans le milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche C en présence de 200 mg/L d'Optired®, d'Optimalo® ou d'Extrait de levure.**

	Optired®	Optimalo®	Extrait de levure
Biomasse initiale (g/L)	0,008	0,009	0,018
Biomasse maximale (g/L)	0,057	0,14	0,095
Productivité (g/L/h)	$13,6 \times 10^{-5}$	$25 \times 10^{-5}$	$22 \times 10^{-5}$
Acide malique initial (g/L)	5,05	4,9	5,07
Acide malique final (g/L)	3,5	1,98	1,83
Vitesse globale de consommation de l'acide malique (g/L/h)	$2,83 \times 10^{-3}$	$3,4 \times 10^{-3}$	$3,9 \times 10^{-3}$
Vitesse spécifique moyenne de démalication (g/g/h)	$50 \times 10^{-3}$	$24 \times 10^{-3}$	$43 \times 10^{-3}$
Durée de la FML (h)	548	863	836

## Discussion

La croissance cellulaire et la démalication ont donné de meilleurs résultats en présence de 200 mg/L d'Optimalo® et d'extrait de levure par rapport à ceux obtenus en présence de la même quantité d'Optired®. Nous remarquons que la meilleure croissance cellulaire a été obtenue en présence d'Optimalo®. En effet, dans ce cas la biomasse maximale atteinte était 2,5 et 1,5 fois plus élevée que celles obtenues en présence d'Optired® et d'extrait de levure. La productivité était 1,83 fois

plus importante que celle obtenue en présence d'Optired<sup>®</sup>. Par contre elle était proche de celle obtenue en présence d'extrait de levure.

Alors que la croissance cellulaire était le plus favorisée en présence d'Optimalo<sup>®</sup>, la démalication a donné des résultats proches en présence d'Optimalo<sup>®</sup> et d'extrait de levure en termes de vitesse globale de démalication et de quantité d'acide malique consommée avec des valeurs un peu plus élevées en présence d'extrait de levure (Tableau II-2). La vitesse spécifique de démalication en présence d'extrait de levure était également 1,8 fois plus importante.

Malgré les différences cinétiques observées lors de l'utilisation de l'Optimalo<sup>®</sup> et de l'extrait de levure, ces deux compléments nutritionnels semblent favoriser la FML beaucoup plus que l'Optired<sup>®</sup>. Etant donné que les dosages effectués avaient montré que ces deux compléments nutritionnels ne contenaient pas de mannoprotéines, leur activation de la FML était donc probablement due à la présence dans leur composition de certains nutriments reconnus comme stimulateurs de la FML comme les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels minéraux, etc...En effet l'extrait de levure est une source riche en nutriments azotés puisque les 200 mg/L renferment 26,7 mg/L d'azote alpha-aminé et 61,4 mg/L de protéines. Cependant, la démalication est restée incomplète en présence de ces deux compléments nutritionnels. Ceci veut dire que le milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche C contenait des molécules inhibitrices synthétisées par cette levure dont l'effet inhibiteur ne peut pas être complètement levé par enrichissement du milieu en nutriments. Il ne s'agit donc pas uniquement d'une déficience en nutriments mais bien d'autres éléments pourraient être impliqués dans l'inhibition. L'étude de certains d'entre eux sera détaillée plus tard dans ce chapitre.

Finalement, malgré leurs effets positifs, l'Optired<sup>®</sup> sera définitivement retenu pour le reste des cultures séquentielles étudiées. D'une part parce que l'Optired<sup>®</sup> et l'Optimalo<sup>®</sup> ont été tous les deux fournis par Lallemand Inc. qui nous a recommandé de tester l'effet de l'Optired<sup>®</sup> sur les FML plutôt que celui de l'Optimalo<sup>®</sup> déjà connu. En effet, l'addition d'Optired<sup>®</sup> aux moûts de raisin n'avait pas initialement pour objectif d'améliorer la FML. Il devait plutôt assurer un rôle organoleptique grâce à ses polysaccharides capables de se complexer aux polyphénols empêchant ainsi leur précipitation et attribuant alors au vin une couleur plus intense. Ces polysaccharides améliorent également le goût en conférant une rondeur au vin. L'amélioration de la FML par addition d'Optired<sup>®</sup> a été donc validée grâce à nos essais sur les différentes fermentations séquentielles.

D'autre part la législation française interdit l'addition de l'extrait de levure au moût de raisin comme activateur des fermentations. Sa composition riche en acides aminés pourrait engendrer la formation d'amines biogènes toxiques pour l'homme (Santos, 1996, Soufleros *et al.* 1998) et ceci par décarboxylation des acides aminés par les bactéries (ex : l'histamine provenant de l'histidine

responsable de réactions allergiques) ainsi que d'autres molécules toxiques comme le carbamate d'éthyle qui est cancérigène et qui provient de la dégradation de l'arginine.

### II-1-3 Comparaison des résultats des FML menées par *O. oeni* souche X dans les milieux préfermentés par *S. cerevisiae* souches A, B, C et D en fioles d'Erlen-meyer.

Les milieux synthétiques jus de raisin préfermentés par *S. cerevisiae* souches A, B, C et D ont été préparés comme décrit dans la partie II-2-1-1 du chapitre II, paragraphe c, avant d'être inoculés par *O. oeni* souche X. Rappelons que pour ces cultures séquentielles, les bactéries ont été adaptées à l'éthanol avant inoculation dans les milieux préfermentés. Dans ce qui suit nous allons présenter les résultats des FML réalisées en présence de 200 mg/L d'Optired®. Les résultats de celles réalisées en l'absence d'Optired® avec ces mêmes milieux seront présentés dans l'annexe de la partie II-1-3. Comme référence pour les cinétiques de croissance cellulaire et de démalication, deux témoins seront utilisés comme déjà annoncé dans la partie I-2-2 de ce chapitre. Le premier est la culture pure d'*O. oeni* souche X dans le milieu synthétique jus de raisin et le deuxième est sa culture pure dans le milieu synthétique vin.

### Résultats

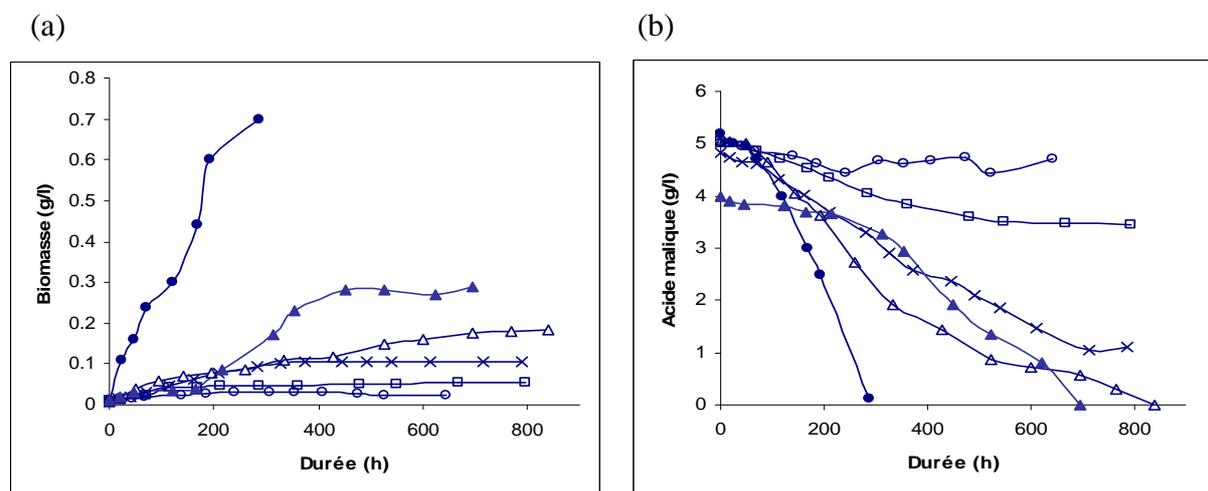


Fig. II-4 Evolution de la biomasse d'*O. oeni* souche X (a) et de sa consommation d'acide malique (b) dans les milieux préfermentés par quatre souches de *S. cerevisiae* ainsi que dans les milieux témoins. (△) milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche A, (x) milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche B, (□) milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche C, (○) milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche D, (●) Témoin 1 : milieu synthétique jus de raisin, (▲) Témoin 2 : milieu synthétique vin.

**Tableau II-3. Paramètres cinétiques des FML menées par *O. oeni* souche X dans les milieux préfermentés par *S. cerevisiae* souches A, B, C et D ainsi que dans les milieux témoins.**

	Témoin 1	Témoin 2	Milieu préfermenté par la souche A	Milieu préfermenté par la souche B	Milieu préfermenté par la souche C	Milieu préfermenté par la souche D
Biomasse initiale (g/L)	0,013	0,013	0,01	0,01	0,008	0,011
Biomasse maximale (g/L)	0,7	0,29	0,19	0,11	0,057	0,03
Acide malique initial (g/L)	5,2	4	5,05	4,82	5,05	5
Acide malique final (g/L)	0	0	0	1,1	3,5	4,63
Vitesse globale de démalication (g/L/h)	$18 \times 10^{-3}$	$6 \times 10^{-3}$	$6 \times 10^{-3}$	$5,2 \times 10^{-3}$	$2,8 \times 10^{-3}$	$2 \times 10^{-3}$
Pourcentage d'inhibition de la vitesse de démalication (%)	-	67	67	71	84	89
Vitesse spécifique moyenne de démalication (g/g/h)	$26 \times 10^{-3}$	$21 \times 10^{-3}$	$32 \times 10^{-3}$	$47 \times 10^{-3}$	$50 \times 10^{-3}$	$74 \times 10^{-3}$
Durée de la FML (h)	288	695	840	715	548	187

## Discussion

La figure II-4 nous permet de comparer l'évolution de la biomasse d'*O. oeni* souche X (a) et de sa consommation d'acide malique (b) dans les milieux préfermentés par *S. cerevisiae* souches A, B, C et D. Elle nous permet également de les comparer aux deux témoins utilisés : culture pure d'*O. oeni* souche X dans les milieux synthétiques jus de raisin et vin, ce qui nous permettra de quantifier l'interaction. Les résultats nous montrent une inhibition de la croissance bactérienne et de la démalication qui varie largement d'un milieu à l'autre et qui dépend étroitement de la souche de levure choisie. L'utilisation du témoin 2 (milieu synthétique vin), avait pour but principal de quantifier l'inhibition due à la présence de 10 % d'éthanol et ceci en comparant les résultats de la FML à ceux obtenus avec le témoin 1 (milieu synthétique jus de raisin). La plus grande inhibition de la croissance bactérienne et de la démalication observée dans les milieux préfermentés par *S. cerevisiae* souches A, B, C et D a été ainsi due en plus de l'éthanol à d'autres conditions inhibitrices que nous détaillerons par la suite. Cette figure nous permet aussi de constater que la démalication a été complètement achevée uniquement dans le milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche A.

D'après le tableau II-3, nous remarquons que partant d'un même inoculum initial, les biomasses maximales atteintes étaient différentes et réduites de 3,7, 6,4, 12,5 et 23,3 fois par rapport au témoin 1 en allant respectivement du milieu préfermenté par la souche A à celui préfermenté par la souche D. Dans le témoin 2, la biomasse maximale obtenue était plus élevée que ces dernières mais elle était toujours 2,4 fois inférieure à celle obtenue dans le témoin 1.

Les vitesses globales de consommation de l'acide malique étaient plus lentes que celle du témoin 1 et réduites à différents niveaux comme le montrent les pourcentages d'inhibition de la démalication dans le tableau II-3. Nous constatons également à ce niveau que les vitesses de démalication étaient les mêmes dans le milieu préfermenté par la souche A et le témoin 2 et qu'elles étaient 3 fois plus lentes que celle du témoin 1, cependant la démalication était complète.

Les résultats de ces FML nous montrent que l'inhibition de la croissance bactérienne a évolué de la même façon que celle de la démalication en allant du milieu préfermenté par la souche A à celui préfermenté par la souche D. En d'autres termes, plus la biomasse formée était faible et plus la quantité d'acide malique consommée ainsi que la vitesse globale de démalication étaient faibles. Par contre, les vitesses spécifiques de démalication ont augmenté quand la biomasse maximale formée a diminué. Ceci veut dire que la limitation dans la quantité d'acide malique consommée était en quelque sorte due à une limitation de la biomasse formée plutôt qu'à une inhibition de l'activité de démalication.

Pour mieux comprendre les résultats que nous venons d'exposer, le profil biochimique des milieux préfermentés par les 4 souches de levure a été établi à la fin de la FA (cf tableau I-2 de la partie I-1-2 de ce chapitre) en dosant certaines molécules inhibitrices de la FML comme l'éthanol, le SO<sub>2</sub> et les acides gras saturés à chaîne moyenne et en dosant également l'azote assimilable restant dans le milieu.

Comme déjà détaillé dans la partie I-2-2 de ce chapitre et repris dans la figure II-4 et le tableau II-3 ci-dessus, les 10 % d'éthanol (v/v) du témoin 2 ont entraîné une prolongation de la phase de latence, une diminution de la biomasse maximale formée et une réduction de la vitesse de démalication de 67 % mais ils n'ont pas empêché la consommation de la totalité de l'acide malique initialement présent dans le milieu. Le contenu en éthanol des milieux préfermentés par les quatre souches de levure était proche de celui du témoin 2 et variait entre 9,7 et 11 % (v/v), (77 à 86 g/L). Cependant les biomasses maximales obtenues étaient plus faibles, les vitesses globales de démalication plus lentes et réduites à des niveaux supérieurs à 67 % et les démalications étaient incomplètes à l'exception de celle réalisée dans le milieu préfermenté par la souche A. Ces résultats nous montrent que l'éthanol a contribué à l'inhibition observée dans ces milieux mais n'était pas à lui seul responsable des démalications incomplètes observées dans les milieux préfermentés par *S. cerevisiae* souches B, C et D. On peut donc penser à l'implication d'autres molécules inhibitrices qui vont agir de façon synergique avec l'éthanol comme le SO<sub>2</sub>.

L'action inhibitrice du SO<sub>2</sub> a été déjà détaillée dans la partie I-5-2 du chapitre I de ce manuscrit et les concentrations du SO<sub>2</sub> libre, moléculaire et combiné ont été données dans le tableau I-2 de la partie I-1-2 de ce chapitre. Nous rappelons que la forme la plus toxique du SO<sub>2</sub> est la forme moléculaire et que *S. cerevisiae* souches A, C et D ont produit des quantités identiques égales à 0,28

mg/L alors que la souche B a produit une quantité plus faible égale à 0,18 mg/L. Cependant ces valeurs sont inférieures aux concentrations inhibitrices retrouvées dans la littérature. En effet d'après Delfini et Morsiani (1992), il nous faut des concentrations comprises entre 0,5 et 0,84 mg/L suivant les souches et les espèces pour inhiber complètement la croissance bactérienne. De plus, la concentration du SO<sub>2</sub> moléculaire varie en fonction du pH. Hors, au cours des 4 FML, le pH a augmenté dans les milieux préfermentés par *S. cerevisiae* souches A, B, C et D de 3,5 à 3,9, 3,86, 3,6 et 3,55 respectivement ce qui a entraîné une diminution des concentrations de SO<sub>2</sub> moléculaire et les valeurs finales dans ces milieux étaient respectivement de 0,11, 0,08, 0,21 et 0,25 mg/L à la fin des FML.

En plus du SO<sub>2</sub> moléculaire, il ne faut pas négliger le SO<sub>2</sub> combiné dont l'effet antimicrobien est dû au catabolisme des substances auxquelles il est lié (acétaldéhydes et d'autres composés carbonylés) par les bactéries ce qui libère une partie du SO<sub>2</sub> combiné et le rend plus actif (Somers et Wescombe, 1987). A 20 mg/L de SO<sub>2</sub> combiné l'activité malolactique est réduite de 13 % (Lafon-Lafourcade, 1970). On peut donc penser à une participation des 20 mg/L de SO<sub>2</sub> combiné produits par *S. cerevisiae* souche C à la réduction de l'activité malolactique d'*O. oeni* souche X (84 %) dans le milieu préfermenté par cette souche de levure.

Nous pouvons conclure que malgré les faibles concentrations de SO<sub>2</sub> qui ne le rendent pas à lui seul extrêmement inhibiteur, son action inhibitrice a été sûrement amplifiée en présence de l'éthanol. L'action synergique de ces deux molécules a été déjà décrite (Carreté *et al.* 2002).

En plus de l'éthanol et du SO<sub>2</sub>, nous nous sommes également intéressés à la production d'acides gras par ces souches. Les concentrations totales et moléculaires des acides octanoïque, décanoïque et dodécanoïque produits par ces 4 souches sont représentées dans le tableau I-2 de la partie I-1-2 de ce chapitre. Leur action inhibitrice a été détaillée dans la partie I-5-2 du chapitre I de ce manuscrit. Elle est surtout due à la fraction moléculaire de ces acides qui constitue la forme prédominante dans notre cas car le pH des milieux est inférieur aux pK<sub>A</sub> de ces acides (cf partie II-3 du chapitre II). *S. cerevisiae* souches A et C ont produit les quantités les plus élevées d'acide octanoïque, décanoïque et dodécanoïque. Cependant, ces quantités restent inférieures aux concentrations inhibitrices retrouvées dans la littérature (cf partie I-1-2 de ce chapitre). De plus, nous rappelons que l'effet inhibiteur de ces acides gras a été probablement minimisé par adsorption aux mannoprotéines de l'Optired<sup>®</sup> ajouté. Donc finalement on peut penser que ces acides gras ont faiblement participé à l'inhibition.

En plus de la production de molécules inhibitrices par les levures, l'inhibition de la croissance bactérienne et de la démalication peut aussi résulter de la déficience du milieu en nutriments. En effet, à la fin de la FA, le vin peut être déficient en certains nutriments comme les vitamines et les acides aminés qui sont essentiels à la survie des bactéries et à leur métabolisme. Le tableau I-2 de la

partie I-1-2 de ce chapitre nous montre les concentrations en azote ammoniacal et alpha-aminé restantes dans le milieu à la fin des FA menées par les quatre souches de levure. L'azote ammoniacal a été complètement consommé par les levures mais comme on l'a déjà montré dans la partie I-2-1 de ce chapitre, les bactéries ne consomment pas l'azote ammoniacal et donc on peut exclure ce facteur des conditions défavorables par limitation nutritionnelle. D'autre part si nous comparons les concentrations restantes d'azote alpha-aminé dans les milieux à la fin de la FA à la faible quantité consommée par *O. oeni* souche X pendant sa culture pure dans le milieu synthétique jus de raisin (8,62 mg d'azote/L), nous constatons que d'un point de vue quantitatif, il n'y avait pas de carence à ce niveau. Remize *et al.* (2006) ont également montré qu'*O. oeni* avait besoin de très faibles concentrations d'azote alpha-aminé provenant d'acides aminés essentiels aussi faibles que 0,7 mg d'azote/L dans le cas de la tyrosine (9,1 mg/L de tyrosine) pour assurer une bonne croissance et une bonne activité métabolique. Cependant, les levures peuvent avoir consommé certains acides aminés essentiels en laissant des concentrations insuffisantes à la croissance et au métabolisme bactériens (Beelman *et al.* 1982). Donc d'un point de vue qualitatif nous ne pouvons pas exclure ce facteur des conditions inhibitrices. Nous pouvons également penser à un manque de vitamines ou de sels minéraux dont on n'a pas suivi la consommation. Rappelons aussi que l'Optired® peut avoir amélioré le contenu du milieu en nutriments si la souche X a pu efficacement utiliser son bagage enzymatique, chose que nous ne pouvons pas confirmer.

Finalement nous pouvons conclure que l'éthanol, le SO<sub>2</sub> et les acides gras produits ainsi que la composition réduite en nutriments des milieux préfermentés par les quatre souches de levure avaient un effet inhibiteur synergique qui explique partiellement l'inhibition de la FML observée dans ces milieux mais ne la clarifient pas complètement. En effet, *S. cerevisiae* souche D qui a été la plus inhibitrice envers *O. oeni* souche X n'a pas présenté un profil biochimique plus contraignant que les trois autres du point de vue production d'éthanol et de SO<sub>2</sub>. Elle a produit la plus faible quantité d'acides gras et elle a terminé la FA en laissant dans le milieu 13,4 mg/L d'azote alpha-aminé. De plus, le milieu MRS qui est un milieu particulièrement riche et adapté aux bactéries lactiques, a été reconstitué en utilisant le milieu préfermenté par la souche D à la place de l'eau. Le pH a été ajusté à 3,5 avant inoculation des bactéries et la FML a été suivie. Malgré cela l'inhibition n'a pas été levée (cf annexes de la partie II-1-3, tableau et figure c-3). Ceci confirme que l'inhibition dans ce milieu n'est pas due à une déficience en nutriments mais plutôt à la présence de certaines molécules inhibitrices jusqu'à présent non identifiées.

Enfin, *S. cerevisiae* souche C, qui elle aussi a été fortement inhibitrice, a présenté un profil biochimique comparable à celui de la souche A. Pourtant l'acide malique a été complètement consommé dans le milieu préfermenté par la souche A. Pour toutes ces raisons, nous avons pensé à

l'implication d'autres molécules inhibitrices dans les milieux préfermentés par *S. cerevisiae* souches C et D. Ces molécules pourraient être de nature protéique, piste peu exploitée jusqu'à présent, et que nous étudierons dans la partie III de ce chapitre.

## II-2 Cultures séquentielles réalisées avec *O. oeni* souche Y

Etant donné que les démalications ont été incomplètes dans les milieux synthétiques jus de raisin préfermentés par *S. cerevisiae* souches B, C et D, on a décidé de tester l'effet de ces milieux contraignants sur une autre souche de bactérie pour voir si cette dernière sera plus inhibée qu'*O. oeni* souche X ou au contraire plus résistante. Dans ce qui suit nous allons présenter les résultats des FML réalisées par *O. oeni* souche Y dans ces trois milieux. Nous rappelons que les bactéries ont été adaptées à l'éthanol et que les résultats présentés sont ceux résultant des FML réalisées en présence de 200 mg/L d'Optired®. Les résultats des FML réalisées en l'absence d'Optired® seront présentés dans l'annexe de cette partie.

### Résultats

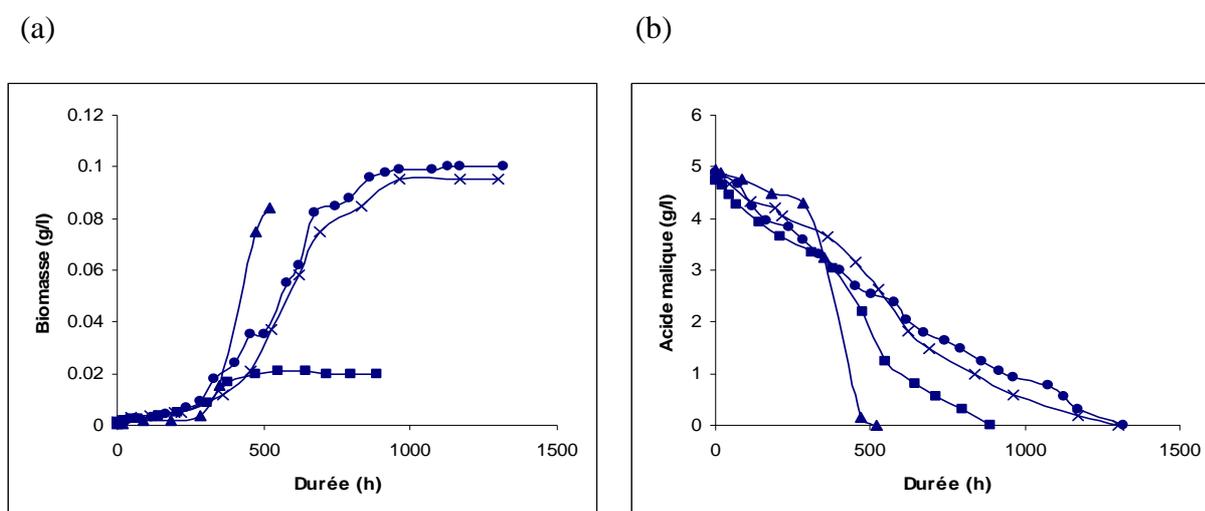


Fig. II-5 Evolution de la biomasse d'*O. oeni* souche Y (a) et de sa consommation d'acide malique (b) dans les milieux préfermentés par les trois souches de *S. cerevisiae* ainsi que dans le milieu témoin. (▲) milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche B, (■) milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche C, (x) milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche D, (●) témoin : culture pure d'*O. oeni* souche Y dans le milieu synthétique jus de raisin.

**Tableau II-4. Paramètres cinétiques des FML menées par *O. oeni* souche Y dans les milieux préfermentés par *S. cerevisiae* souches B, C et D ainsi que dans le milieu témoin.**

	Témoin	Milieu préfermenté par la souche B	Milieu préfermenté par la souche C	Milieu préfermenté par la souche D
Biomasse initiale (g/L)	0,0007	0,0006	0,0015	0,001
Biomasse maximale (g/L)	0,1	0,084	0,02	0,095
Productivité (g/L/h)	$1,34 \times 10^{-4}$	$3,4 \times 10^{-4}$	$0,4 \times 10^{-4}$	$1,21 \times 10^{-4}$
Acide malique initial (g/L)	4,88	4,96	4,72	4,84
Acide malique final (g/L)	0	0	0	0
Vitesse globale de démalication (g/L/h)	$3,7 \times 10^{-3}$	$9,6 \times 10^{-3}$	$5,3 \times 10^{-3}$	$3,7 \times 10^{-3}$
Pourcentage d'activation de la démalication (%)	-	160	43	0
Vitesse spécifique moyenne de démalication (g/g/h)	0,04	0,11	0,27	0,04
Durée de la FML (h)	1319	518	886	1300

## Discussion

La figure II-5 et le tableau II-4 nous montrent un effet stimulateur de *S. cerevisiae* souche B sur la croissance cellulaire d'*O. oeni* souche Y. En effet la productivité dans le milieu préfermenté par la souche B était 2,4 fois plus élevée que celle dans le milieu témoin. Nous remarquons aussi qu'*O. oeni* souche Y a présenté une longue phase de latence de 285 heures dans ces deux milieux avant de démarrer la phase active de croissance. Rappelons que toutes les fermentations ont été suivies jusqu'à l'arrêt de consommation de l'acide malique qui correspond dans le cas d'*O. oeni* souche Y à une consommation totale de cet acide. Par conséquent nous remarquons que la démalication dans le milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche B a été achevée avant qu'*O. oeni* souche Y n'atteigne la phase stationnaire contrairement au milieu témoin dans lequel il restait encore 1,25 g/L d'acide malique au début de la phase stationnaire. Contrairement au milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche B, la croissance cellulaire d'*O. oeni* souche Y a été inhibée dans le milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche C et la biomasse maximale obtenue ainsi que la productivité étaient respectivement 5 et 3,35 fois plus faibles que celles du témoin. Dans ce cas nous avons constaté que la phase de latence était plus courte (70 heures) et la phase stationnaire a été atteinte alors qu'il restait encore 2,2 g/L d'acide malique dans le milieu. Concernant le milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche D, le profil de croissance était presque identique à celui du témoin avec une phase de latence dans le milieu préfermenté par la souche D un peu plus courte (216 heures). De plus les biomasses maximales obtenues ainsi que les productivités étaient presque identiques (Tableau II-4) ce qui montre une neutralité de ce milieu vis-à-vis de la croissance cellulaire d'*O. oeni* souche Y.

Parallèlement à la croissance cellulaire, la démalication a été également stimulée dans le milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche B et la vitesse globale de démalication a été 2,6 fois plus rapide que dans le témoin. Nous avons aussi observé une phase de latence de 285 heures comme pour la croissance cellulaire alors que la démalication a été continue chez le témoin. Contrairement à la croissance cellulaire qui a été inhibée dans le milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche C, la démalication a été stimulée dans ce même milieu 378 heures après le démarrage de la fermentation et la vitesse globale de démalication a été 1,43 fois plus rapide que dans le témoin. Ceci nous montre que ces deux activités ont été non-corrélées dans ce cas.

Comme pour la croissance cellulaire, la démalication dans le milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche D n'a pas été affectée et la vitesse globale de démalication a été identique à celle du témoin soulignant ainsi la résistance d'*O. oeni* souche Y aux conditions contraignantes du milieu préfermenté par la souche D qui a été le plus inhibiteur envers *O. oeni* souche X.

Finalement nous remarquons que les valeurs des vitesses spécifiques de démalication accentuent la stimulation de la FML dans les milieux préfermentés par *S. cerevisiae* souches B et C et soulignent également la nette dissociation entre la croissance cellulaire et la démalication chez *O. oeni* souche Y.

D'après ces résultats nous constatons qu'*O. oeni* souche Y contrairement à *O. oeni* souche X a été plus résistante aux conditions inhibitrices des trois milieux testés et sa consommation d'acide malique a été complète et 2 fois plus rapide que chez *O. oeni* souche X si nous comparons les vitesses globales de démalication de ces 2 souches dans les trois milieux testés (cf tableaux II-3 et II-4).

Certains auteurs ont essayé d'expliquer la résistance de certaines souches d'*O. oeni* aux conditions stressantes du milieu en investiguant la présence chez ces souches de mécanismes de résistance impliquant des gènes dont l'expression est augmentée en réponse à différents stress comme l'éthanol, le SO<sub>2</sub>, les acides gras, la température, l'acidité, etc... Les mécanismes de résistance chez *O. oeni* ont été détaillés dans la partie I-5-3 du chapitre I de ce manuscrit. Ils impliquent des gènes codant pour des protéines de choc thermique (heat shock proteins) largement étudiées par différents auteurs (Lindquist et Craig, 1988, Craig *et al.* 1993, Guzzo *et al.* 1997 et Guzzo *et al.* 2000). Plus récemment, Bourdineaud *et al.* (2003, 2004) ont étudié l'implication d'autres mécanismes comme les transporteurs de substances toxiques « multidrug resistance transporters ou MDR ». Des mécanismes similaires ont pu être mieux exprimés chez *O. oeni* souche Y que chez *O. oeni* souche X ce qui lui a conféré une meilleure résistance aux conditions inhibitrices du milieu.

En plus de sa résistance, cette souche a été stimulée par les milieux préfermentés par *S. cerevisiae* souches B et C. En effet certaines molécules relarguées par les levures dans le milieu pendant la FA principalement les composés azotés comme les acides aminés (Fourcassier, 1992), les peptides

(Guilloux-Benatier et Chassagne, 2003) et même certaines macromolécules comme les mannoprotéines (Guilloux-Benatier *et al.* 1993, 1995) jouent un rôle activateur de la croissance cellulaire et de la démalication. D'autres composés peuvent également stimuler la FML comme les vitamines, les nucléotides et les lipides incluant les acides gras à longue chaîne dont l'effet stimulateur a été peu étudié jusqu'à présent (Alexandre *et al.* 2004). Dans notre cas nous pouvons suggérer l'implication de l'une ou de plusieurs de ces molécules dans l'activation de la FML chez *O. oeni* souche Y. Par contre, on n'a pas pu détecter le relargage de mannoprotéines dans le milieu au cours des FA menées par les souches de levure B et C. Cependant les mannoprotéines de l'Optired<sup>®</sup> ajouté aux milieux testés ont probablement joué un rôle activateur. En effet nous pouvons penser qu'*O. oeni* souche Y ayant résisté aux conditions inhibitrices du milieu, a pu mieux profiter de ces molécules d'un point de vue nutritionnel, beaucoup plus qu'*O. oeni* souche X. On peut supposer également que son bagage enzymatique a été mieux exprimé. Finalement, les concentrations en protéines et en azote alpha-aminé dans ces deux milieux à la fin de la FA ont été données dans le tableau I-2 de la partie I-1-2 de ce chapitre. Nous pouvons supposer que certains de ces composés ont participé à la stimulation de la FML. Cependant cette piste n'a pas été exploitée dans cette étude.

### II-3 Conclusion

Dans cette partie, nous avons, dans un premier temps, mis en évidence l'effet positif et cumulatif de l'adaptation des bactéries à l'éthanol et de l'addition d'un complément nutritionnel riche en mannoprotéines (Optired<sup>®</sup>) sur la croissance bactérienne et la démalication. Leur utilisation a été adoptée pour toutes les cultures séquentielles. Puis nous avons comparé les résultats des FML menées par *O. oeni* souche X dans les milieux préfermentés par *S. cerevisiae* souches A, B, C et D. Ceci nous a permis de constater qu'*O. oeni* souche X a été inhibée par tous ces milieux mais l'intensité de l'inhibition dépendait étroitement de la souche de levure en question. La souche la plus inhibitrice a été la souche D suivie par les souches C, B puis A. Les profils biochimiques des quatre milieux préfermentés par ces levures et préalablement établis dans la partie I nous ont montré que l'éthanol, le SO<sub>2</sub> et les acides gras produits par ces souches ainsi que l'azote alpha-aminé restant n'ont pu être responsables des différences d'inhibition observées. Nous avons notamment constaté que *S. cerevisiae* souche D qui était la plus inhibitrice a produit des quantités très proches d'éthanol et de SO<sub>2</sub> moléculaire que les autres souches ainsi que les plus faibles quantités d'acides gras. Quantitativement l'azote alpha-aminé restant n'était pas non plus limitant. Le milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche C qui a été aussi fortement inhibiteur a présenté un profil biochimique comparable à celui du milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche A au niveau duquel

l'acide malique a été complètement consommé. Ces résultats nous ont encouragés à exploiter la présence d'autres molécules inhibitrices synthétisées par ces deux souches comme les molécules de nature protéique.

Contrairement aux résultats obtenus avec *O. oeni* souche X, la souche Y testée dans les milieux préfermentés par *S. cerevisiae* souches B, C et D s'est révélée résistante aux conditions inhibitrices de ces milieux et sa croissance ainsi que son activité de démalication ont été toutes les deux stimulées dans le milieu préfermenté par la souche B alors que seule la démalication a été stimulée dans le milieu préfermenté par la souche C. Il serait donc intéressant pour la suite des recherches d'exploiter la présence de certains mécanismes de résistance chez cette souche et d'identifier la nature des molécules stimulatrices relarguées par ces levures.

Ces résultats nous poussent à conclure que le choix du couple levure-bactérie est très important vis-à-vis de l'échec ou de la réussite de la FML, bien qu'à ce jour nous n'ayons pas encore identifié toutes les molécules responsables de l'inhibition et de la stimulation de cette fermentation.

**Annexes de la partie II-1-1 : Optimisation des conditions de réalisation des cultures séquentielles : adaptation des bactéries à l'éthanol et emploi d'un complément nutritionnel.**

**a- Culture séquentielle réalisée avec le couple *S. cerevisiae* souche C/O. *oeni* souche X en présence d'Optired® et avec adaptation des bactéries à l'éthanol.**

**Tableau a-1. Suivi cinétique de la culture séquentielle réalisée par le couple *S. cerevisiae* souche C/O. *oeni* souche X, phase FML, en présence d'Optired® et avec adaptation des bactéries à l'éthanol.**

Durée (h)	D.O	Concentration cellulaire (cellules/mL) x 10 <sup>6</sup>	Poids sec (g/L)	acide malique (g/L)
0	0,027	1,8 (± 0,13)	0,008 (± 0,0006)	5,05 (± 0,035)
72	0,038	5,5 (± 0,49)	0,025 (± 0,002)	4,87 (± 0,06)
116	0,05	9,5 (± 0,9)	0,043 (± 0,004)	4,71 (± 0,087)
168	0,05	11,11 (± 1)	0,05 (± 0,0045)	4,53 (± 0,07)
212	0,052	11,8 (± 0,9)	0,053 (± 0,004)	4,34 (± 0,14)
286	0,052	12,22 (± 0,54)	0,055 (± 0,0024)	4,06 (± 0,2)
361	0,052	12,7 (± 1,55)	0,057 (± 0,007)	3,85 (± 0,2)
480	0,055	12,7 (± 1,6)	0,057 (± 0,007)	3,61 (± 0,11)
548	0,055	12,6 (± 0,54)	0,057 (± 0,0024)	3,51 (± 0,12)
668	0,055	12,44 (± 0,63)	0,056 (± 0,003)	3,5 (± 0,17)
796	0,058	12,43 (± 0,49)	0,056 (± 0,002)	3,5 (± 0,17)
866	0,058	12,5 (± 2,8)	0,0563 (± 0,013)	3,54 (± 0,16)
958	0,058	12,74 (± 1)	0,057 (± 0,005)	3,47 (± 0,03)
1053	0,058	12,7 (± 0,61)	0,057 (± 0,003)	3,5 (± 0,18)

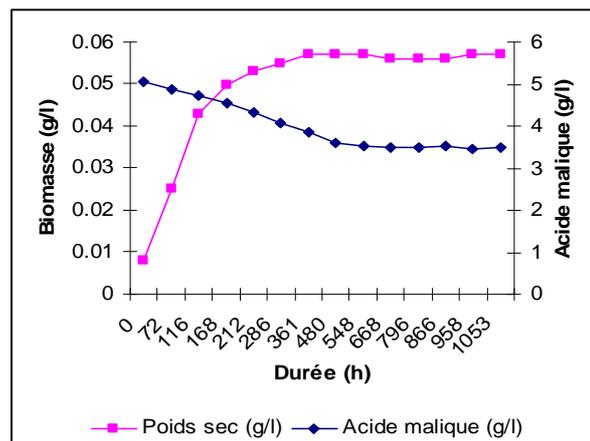


Fig. a-1 Evolution de la biomasse de la souche X et de sa consommation d'acide malique en présence d'Optired® et avec adaptation des bactéries à l'éthanol.

**b- Culture séquentielle réalisée avec le couple *S. cerevisiae* souche C/O. oeni souche X en présence d'Optired® mais sans adaptation des bactéries à l'éthanol.**

**Tableau b-1. Suivi cinétique de la culture séquentielle réalisée par le couple *S. cerevisiae* souche C/O. oeni souche X, phase FML, en présence d'Optired® mais sans adaptation des bactéries à l'éthanol.**

Durée(h)	D.O	Concentration cellulaire (cellules/mL) x 10 <sup>6</sup>	Poids sec (g/L)	acide malique (g/L)
0	0,029	2,11 (± 0,11)	0,01 (± 0,0005)	4,95 (± 0,04)
73	0,039	5,7 (± 0,63)	0,026 (± 0,003)	4,66 (± 0,094)
121	0,045	6,28 (± 0,49)	0,028 (± 0,002)	4,47 (± 0,18)
165	0,047	7 (± 0,98)	0,032 (± 0,005)	4,38 (± 0,12)
239	0,052	8,67 (± 0,73)	0,039 (± 0,003)	4,25 (± 0,12)
287	0,055	9,97 (± 0,49)	0,045 (± 0,002)	4,14 (± 0,13)
338	0,055	10 (± 1,04)	0,045 (± 0,005)	4,07 (± 0,094)
408	0,055	10,36 (± 0,98)	0,047 (± 0,004)	4 (± 0,15)
484	0,056	10,42 (± 1,1)	0,047 (± 0,005)	3,87 (± 0,061)
603	0,056	10,5 (± 0,49)	0,0473 (± 0,002)	3,8 (± 0,18)
671	0,048	10,57 (± 0,65)	0,0476 (± 0,003)	3,8 (± 0,17)
791	0,048	10,6 (± 0,4)	0,0477 (± 0,002)	3,83 (± 0,087)
919	0,051	10,75 (± 0,5)	0,0484 (± 0,002)	3,83 (± 0,085)
989	0,042	10,82 (± 0,63)	0,049 (± 0,003)	3,81 (± 0,11)
1081	0,048	10,97 (± 0,6)	0,0494 (± 0,003)	3,85 (± 0,037)

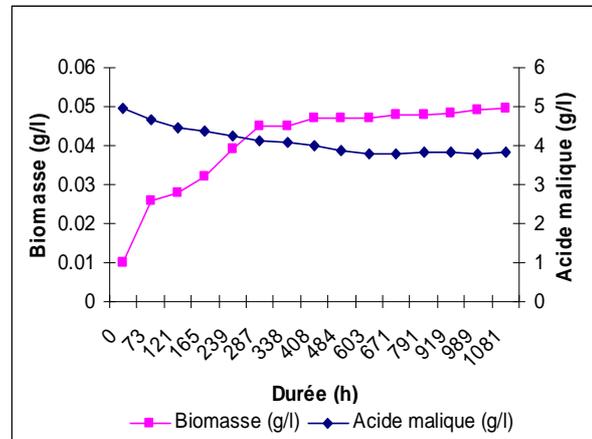
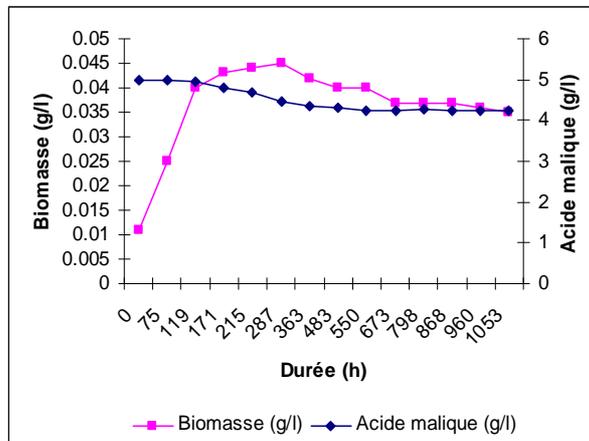


Fig. b-1 Evolution de la biomasse de la souche X et de sa consommation d'acide malique en présence d'Optired® mais sans adaptation des bactéries à l'éthanol.

**c- Culture séquentielle réalisée avec le couple *S. cerevisiae* souche C/O. oeni souche X en absence d'Optired<sup>®</sup> mais avec adaptation des bactéries à l'éthanol.**

**Tableau c-1. Suivi cinétique de la culture séquentielle réalisée par le couple *S. cerevisiae* souche C/O. oeni souche X, phase FML, en absence d'Optired<sup>®</sup> mais avec adaptation des bactéries à l'éthanol.**

Durée(h)	D.O	Concentration cellulaire (cellules/mL) x 10 <sup>6</sup>	Poids sec (g/L)	acide malique (g/L)
0	0,029	2,34 (± 0,49)	0,011 (± 0,0023)	5 (± 0,02)
75	0,046	5,5 (± 0,4)	0,025 (± 0,002)	5 (± 0,02)
119	0,05	9,16 (± 0,44)	0,04 (± 0,002)	4,94 (± 0,11)
171	0,052	9,5 (± 0,24)	0,043 (± 0,0011)	4,81 (± 0,11)
215	0,054	9,76 (± 0,61)	0,044 (± 0,0028)	4,68 (± 0,048)
287	0,054	9,92 (± 0,89)	0,045 (± 0,004)	4,47 (± 0,11)
363	0,056	9,36 (± 0,33)	0,042 (± 0,0015)	4,36 (± 0,07)
483	0,054	8,88 (± 0,76)	0,04 (± 0,0034)	4,3 (± 0,11)
550	0,053	8,85 (± 0,52)	0,04 (± 0,0024)	4,24 (± 0,18)
673	0,05	8,3 (± 0,37)	0,037 (± 0,0017)	4,24 (± 0,18)
798	0,049	8,6 (± 1,67)	0,039 (± 0,008)	4,26 (± 0,23)
868	0,048	8,3 (± 0,37)	0,037 (± 0,0017)	4,24 (± 0,27)
960	0,048	8 (± 0,23)	0,036 (± 0,001)	4,22 (± 0,33)
1053	0,048	7,8 (± 0,24)	0,035 (± 0,001)	4,22 (± 0,061)



**Fig. c-1 Evolution de la biomasse de la souche X et de sa consommation d'acide malique en absence d'Optired<sup>®</sup> mais avec adaptation des bactéries à l'éthanol.**

**d- Culture séquentielle réalisée avec le couple *S. cerevisiae* souche C/O. *oeni* souche X en absence d'Optired® et sans adaptation des bactéries à l'éthanol.**

**Tableau d-1. Suivi cinétique de la culture séquentielle réalisée par le couple *S. cerevisiae* souche C/O. *oeni* souche X, phase FML, en absence d'Optired® et sans adaptation des bactéries à l'éthanol.**

Durée(h)	D.O	Concentration cellulaire (cellules/mL) x 10 <sup>6</sup>	Poids sec (g/L)	acide malique (g/L)
0	0,029	2,4 (± 0,24)	0,011 (± 0,001)	5 (± 0,11)
73	0,041	3,44 (± 0,49)	0,016 (± 0,0023)	4,87 (± 0,11)
121	0,042	3,44 (± 0,73)	0,016 (± 0,0034)	4,72 (± 0,08)
165	0,043	4,84 (± 0,37)	0,022 (± 0,0017)	4,67 (± 0,073)
239	0,047	6,8 (± 0,49)	0,031 (± 0,002)	4,64 (± 0,11)
287	0,048	7,06 (± 0,49)	0,032 (± 0,002)	4,6 (± 0,15)
335	0,047	8,18 (± 0,23)	0,037 (± 0,001)	4,57 (± 0,073)
407	0,047	8,26 (± 0,8)	0,037 (± 0,004)	4,53 (± 0,095)
483	0,052	8,38 (± 0,6)	0,038 (± 0,003)	4,5 (± 0,05)
603	0,05	5,96 (± 1,1)	0,027 (± 0,005)	4,5 (± 0,11)
670	0,038	5,9 (± 0,73)	0,027 (± 0,0033)	4,48 (± 0,07)
793	0,038	5,7 (± 0,73)	0,026 (± 0,0033)	4,47 (± 0,066)
918	0,045	5,5 (± 0,24)	0,025 (± 0,0011)	4,44 (± 0,06)
988	0,044	5,42 (± 0,34)	0,024 (± 0,0015)	4,53 (± 0,18)
1080	0,054	3,87 (± 0,62)	0,017 (± 0,003)	4,48 (± 0,06)

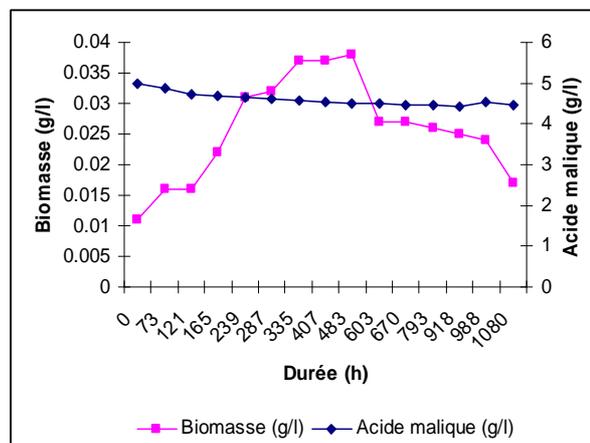


Fig. d-1 Evolution de la biomasse de la souche X et de sa consommation d'acide malique en absence d'Optired® et sans adaptation des bactéries à l'éthanol.

**Annexes de la partie II-1-2 : Comparaison des résultats des FML menées par *O. oeni* souche X dans le milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche C en présence de 200 mg/L d'Optired®, d'Optimalo® ou d'Extrait de levure.**

**a- FML menée par *O. oeni* souche X dans le milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche C en présence de 200 mg/L d'Optimalo®.**

**Tableau a-1. Suivi cinétique de la culture séquentielle réalisée par le couple *S. cerevisiae* souche C/*O. oeni* souche X, phase FML, en présence de 200 mg/L d'Optimalo®.**

Durée (h)	D.O	Concentration cellulaire (cellules/mL) x 10 <sup>6</sup>	Poids sec (g/L)	acide malique (g/L)
0	0,012	2 (±0,3)	0,009 (±0,0014)	4,9 (±0,08)
23	0,014	4,14 (±0)	0,013 (±0)	4,83 (±0,052)
98	0,016	5,13 (±0,46)	0,023 (±0,002)	4,73 (±0,032)
143	0,018	6,2 (±0,44)	0,028 (±0,002)	4,63 (±0,021)
288	0,022	10,65 (±0,31)	0,048 (±0,0014)	4,5 (±0,07)
335	0,025	13,46 (±0,31)	0,061 (±0,0014)	4,2 (±0,15)
431	0,028	24,75 (±1,64)	0,11 (±0,0073)	3,9 (±0,06)
480	0,03	29 (±0,38)	0,13 (±0,0017)	3,68 (±0,035)
527	0,032	30,33 (±1,54)	0,14 (±0,007)	3,45 (±0,047)
626	0,033	30,25 (±1,98)	0,14 (±0,009)	3,1 (±0,06)
696	0,035	30,2 (±1,18)	0,14 (±0,006)	2,35 (±0,09)
815	0,035	30,9 (±1,7)	0,14 (±0,008)	2,1 (±0,05)
863	0,031	30,6 (±0,52)	0,14 (±0,0024)	1,98 (±0,1)
963	0,033	28,9 (±0,8)	0,13 (±0,004)	1,98 (±0,035)

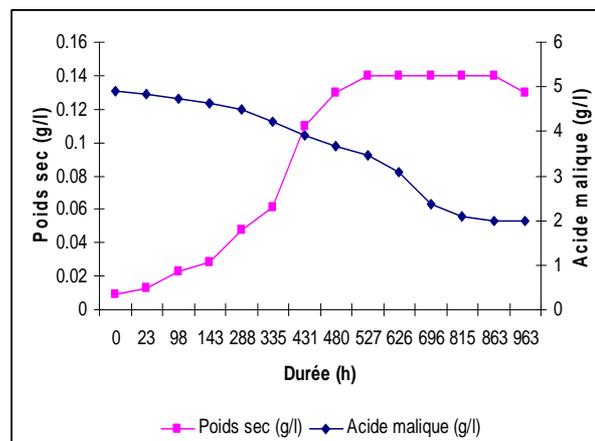


Fig. a-1 Evolution de la biomasse de la souche X et de sa consommation d'acide malique en présence de 200 mg/l d'Optimalo®.

**b- FML menée par *O. oeni* souche X dans le milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche C en présence de 200 mg/L d'Extrait de levure.**

**Tableau b-1. Suivi cinétique de la culture séquentielle réalisée par le couple *S. cerevisiae* souche C/*O. oeni* souche X, phase FML, en présence de 200 mg/L d'Extrait de levure.**

Durée (h)	D.O	Concentration cellulaire (cellules/mL) x 10 <sup>6</sup>	Poids sec (g/L)	acide malique (g/L)
0	0,014	4,06 (±0,3)	0,018 (±0.0013)	5,07 (±0,23)
19	0,025	8,7 (±0,27)	0,039 (±0.0012)	5 (±0,18)
48	0,026	11,2 (±0,27)	0,05 (±0.0012)	4,95 (±0,057)
68	0,031	12,42 (±1.23)	0,056 (±0.006)	4,65 (±0,16)
115	0,033	14,5 (±0,66)	0,065 (±0.003)	4,32 (±0,24)
139	0,033	15,8 (±0,95)	0,07 (±0.004)	4,08 (±0,14)
186	0,034	18 (±1.25)	0,08 (±0.006)	4,05 (±0,087)
290	0,035	20 (±2.95)	0,09 (±0.013)	3,45 (±0,13)
357	0,033	21,42 (±2.1)	0,096 (±0.009)	3,1 (±0,14)
454	0,033	21,1 (±1.53)	0,095 (±0.007)	2,42 (±0,11)
498	0,037	20,8 (±0.52)	0,094 (±0.0024)	2,32 (±0,06)
645	0,033	20,33 (±1.51)	0,091 (±0.007)	2,04 (±0,16)
691	0,037	20 (±0,43)	0,09 (±0.002)	1,92 (±0,13)
787	0,034	20,2 (±0.95)	0,091 (±0.0043)	1,91 (±0,03)
836	0,034	20,1 (±0.38)	0,09 (±0.002)	1,83 (±0,11)
884	0,034	20,7 (±0,58)	0,093 (±0.0025)	1,82 (±0,01)
983	0,034	20,33 (±0,3)	0,091 (±0.0013)	1,84 (±0,016)

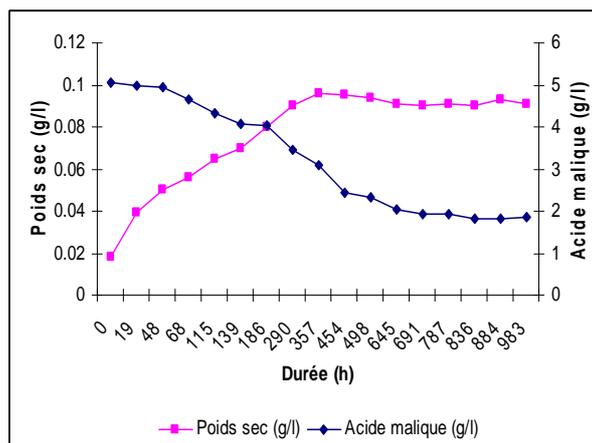


Fig. b-1 Evolution de la biomasse de la souche X et de sa consommation d'acide malique en présence de 200 mg/l d'Extrait de levure.

**Annexes de la partie II-1-3 : Comparaison des résultats des FML menées par *O. oeni* souche X dans les milieux préfermentés par *S. cerevisiae* souches A, B, C et D en fioles d'Erlen-meyer.**

**a- FML menée par *O. oeni* souche X dans le milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche A en présence et en absence de 200 mg/L d'Optired®.**

**Tableau a-1. Suivi cinétique de la culture séquentielle réalisée par le couple *S. cerevisiae* souche A/*O. oeni* souche X, phase FML, en absence d'Optired®.**

Durée (h)	D.O	Concentration cellulaire (cellules/mL) x 10 <sup>6</sup>	Poids sec (g/L)	Acide malique (g/L)
0	0,04	3	0,0135	5,22 (± 0,12)
19	0,077	5,6	0,025	5,22 (± 0,18)
49	0,08	6	0,027	5,22 (± 0,13)
93	0,1	7,34	0,033	5,06 (± 0,1)
143	0,12	8,9	0,04	4,88 (± 0,085)
194	0,18	12,96	0,058	4,81 (± 0,054)
261	0,185	13,44	0,061	4,26 (± 0,15)
333	0,22	16,17	0,073	3,56 (± 0,17)
429	0,22	18,24	0,082	3,25 (± 0,18)
525	0,28	20,75	0,093	2,69 (± 0,11)
600	0,28	21	0,095	2,2 (± 0,037)
696	0,28	21,5	0,097	1,8 (± 0,1)
768	0,28	22,4	0,1	1,3 (± 0,16)
840	0,26	23	0,104	1,2 (± 0,085)
900	0,27	22	0,1	1,22 (± 0,07)

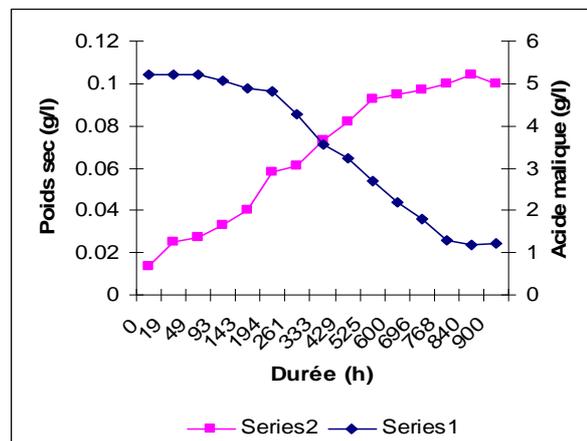


Fig. a-1 Evolution de la biomasse de la souche X et de sa consommation d'acide malique dans le milieu préfermenté par la souche A en l'absence d'Optired®.

**Tableau a-2. Suivi cinétique de la culture séquentielle réalisée par le couple *S. cerevisiae* souche A/*O. oeni* souche X, phase FML, en présence de 200 mg/L d'Optired®.**

Durée (h)	D.O	Concentration cellulaire (cellules/mL) x 10 <sup>6</sup>	Poids sec (g/L)	Acide malique (g/L)
0	0,029	2,11	0,0095	5,05 (± 0,18)
19	0,048	3,5	0,016	5,04 (± 0,12)
49	0,12	8,6	0,039	5,02 (± 0,15)
93	0,17	12,6	0,057	4,65 (± 0,13)
143	0,21	15,4	0,07	4,04 (± 0,1)
194	0,24	17,65	0,08	3,62 (± 0,061)
261	0,26	19,25	0,087	2,74 (± 0,087)
333	0,34	24,5	0,11	1,92 (± 0,11)
429	0,36	26	0,117	1,44 (± 0,12)
525	0,46	33,75	0,15	0,86 (± 0,15)
600	0,49	36	0,16	0,71 (± 0,17)
696	0,53	38,6	0,174	0,56 (± 0,13)
768	0,54	39	0,18	0,3 (± 0,054)
840	0,56	41	0,185	0 (± 0)

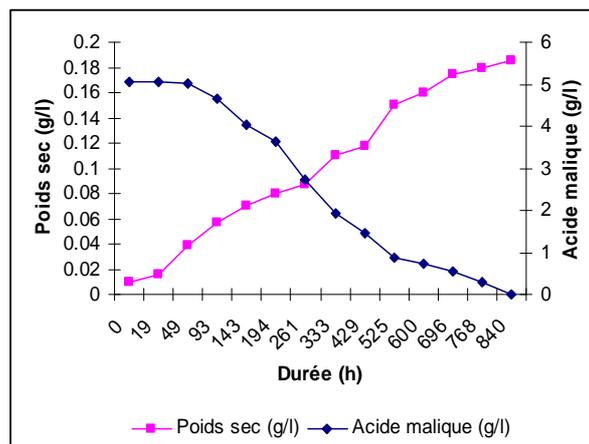
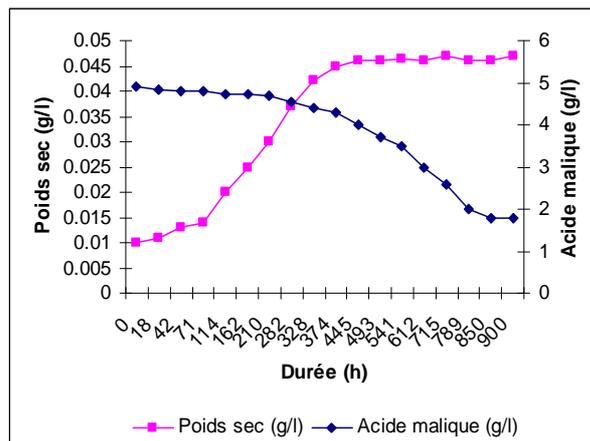


Fig. a-2 Evolution de la biomasse de la souche X et de sa consommation d'acide malique dans le milieu préfermenté par la souche A en présence d'Optired®.

**b- FML menée par *O. oeni* souche X dans le milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche B en présence et en absence de 200 mg/L d'Optired®.**

**Tableau b-1. Suivi cinétique de la culture séquentielle réalisée par le couple *S. cerevisiae* souche B/*O. oeni* souche X, phase FML, en absence d'Optired®.**

Durée (h)	D.O	Concentration cellulaire (cellules/mL) x 10 <sup>6</sup>	Poids sec (g/L)	acide malique (g/L)
0	0.013	2.16 (±0.085)	0.01 (±0.0004)	4.92 (±0.25)
18	0.015	2.5 (±0.23)	0.011 (±0.001)	4.82 (±0.15)
42	0.015	2.8 (±0.057)	0.013 (±0.0003)	4.8 (±0.22)
71	0.018	3 (±0.6)	0.014 (±0.003)	4.79 (±0.33)
114	0.023	4.44 (±0.39)	0.02 (±0.0018)	4.74 (±0.35)
162	0.026	5.6 (±0.2)	0.025 (±0.0009)	4.71 (±0.42)
210	0.03	6.7 (±0.046)	0.03 (±0.0002)	4.69 (±0.52)
282	0.036	8.2 (±0.2)	0.037 (±0.0009)	4.56 (±0.26)
328	0.04	9.3 (±0.39)	0.042 (±0.0018)	4.4 (±0.11)
374	0.044	10 (±0.04)	0.045 (±0.0002)	4.3 (±0.34)
445	0.044	10 (±0.36)	0.045 (±0.0016)	4 (±0.16)
493	0.045	10.2 (±0.36)	0.046 (±0.0016)	3.7 (±0.11)
541	0.045	10.3 (±0.08)	0.0463 (±0.0004)	3.5 (±0.023)
612	0.043	10 (±0.08)	0.046 (±0.0004)	3 (±0.16)
715	0.044	10.4 (±0.05)	0.047 (±0.0002)	2.6 (±0.11)
789	0.044	10 (±0.08)	0.046 (±0.0004)	2 (±0.16)
850	0.043	10 (±0.1)	0.046 (±0.0005)	1.8 (±0.2)
900	0.044	10 (±0.11)	0.046 (±0.0005)	1.8 (±0.2)



**Fig. b-1 Evolution de la biomasse de la souche X et de sa consommation d'acide malique dans le milieu préfermenté par la souche B en absence d'Optired®.**

**Tableau b-2. Suivi cinétique de la culture séquentielle réalisée par le couple *S. cerevisiae* souche B/*O. oeni* souche X, phase FML, en présence de 200 mg/L Optired®.**

Durée (h)	D.O	Concentration cellulaire (cellules/mL) x 10 <sup>6</sup>	Poids sec (g/L)	acide malique (g/L)
0	0.016	2.31 (±0.16)	0.01 (±0.0007)	4.82 (±0.15)
18	0.018	3.73 (±0.12)	0.017(±0.0006)	4.75 (±0.2)
42	0.02	4.61 (±0.45)	0.021(±0.002)	4.66 (±0.087)
71	0.024	6.87 (±0.8)	0.031(±0.004)	4.62 (±0.36)
114	0.026	10.6 (±0.6)	0.048(±0.003)	4.33 (±0.36)
162	0.028	14 (±0.66)	0.063(±0.003)	4.02 (±0.12)
210	0.03	17.83 (±0.9)	0.08 (±0.004)	3.7 (±0.07)
282	0.035	20.4 (±0.95)	0.092(±0.004)	3.29 (±0.33)
328	0.04	22.33 (±0.13)	0.1 (±0.0006)	2.9 (±0.18)
374	0.04	23.25 (±0.64)	0.105(±0.003)	2.57 (±0.11)
445	0.04	23.25 (±0.25)	0.105(±0.0012)	2.36 (±0.053)
493	0.041	23.25 (±0.46)	0.105(±0.002)	2.09 (±0.046)
541	0.045	23.25 (±1.3)	0.105(±0.006)	1.86 (±0.017)
612	0.04	23.25 (±0.25)	0.105(±0.0012)	1.47 (±0.074)
715	0.04	23.25 (±0.16)	0.105(±0.0008)	1.05 (±0.12)
789	0.044	23 (±0.16)	0.104 (±0.0008)	1.1 (±0.04)

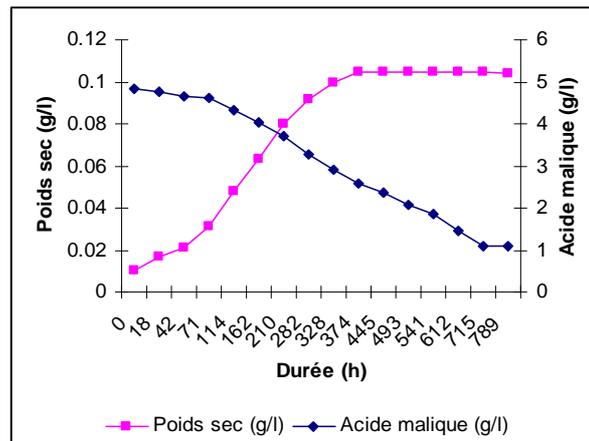


Fig. b-2 Evolution de la biomasse de la souche X et de sa consommation d'acide malique dans le milieu préfermenté par la souche B en présence d'Optired®.

c- FML menée par *O. oeni* souche X dans le milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche D en présence et en absence de 200 mg/L d'Optired® et en présence de MRS.

Tableau c-1. Suivi cinétique de la culture séquentielle réalisée par le couple *S. cerevisiae* souche D/*O. oeni* souche X, phase FML, en absence d'Optired®.

Durée (h)	D.O	Concentration cellulaire (cellules/mL) x 10 <sup>6</sup>	Poids sec (g/L)	Acide malique (g/L)
0	0,031	2,15 (±0,28)	0,01 (±0,0014)	5,01 (±0,023)
19	0,03	3,07 (±0,02)	0,014 (±0)	5,05 (±0,023)
43	0,026	3,47 (±0,28)	0,016 (±0,0014)	4,95 (±0,047)
67	0,029	4,04 (±0,36)	0,018 (±0,0016)	4,9 (±0,09)
139	0,031	4,22 (±0,24)	0,019 (±0,001)	4,83 (±0,012)
187	0,038	4,98 (±0,1)	0,022 (±0,0004)	4,68 (±0,07)
241	0,02	5,1 (±0,12)	0,023 (±0,0006)	4,75 (±0,05)
307	0,032	4,9 (±0)	0,022 (±0)	4,74 (±0,036)
355	0,038	4,92 (±0,43)	0,022 (±0,002)	4,71 (±0,046)
409	0,021	5,1 (±0,053)	0,023 (±0)	4,65 (±0,04)
476	0,034	4,91 (±0,17)	0,022 (±0,0008)	4,72 (±0,015)
525	0,031	4,92 (±0,31)	0,022 (±0,0014)	4,65 (±0,023)
645	0,035	4,45 (±0,41)	0,02 (±0,002)	4,74 (±0,031)

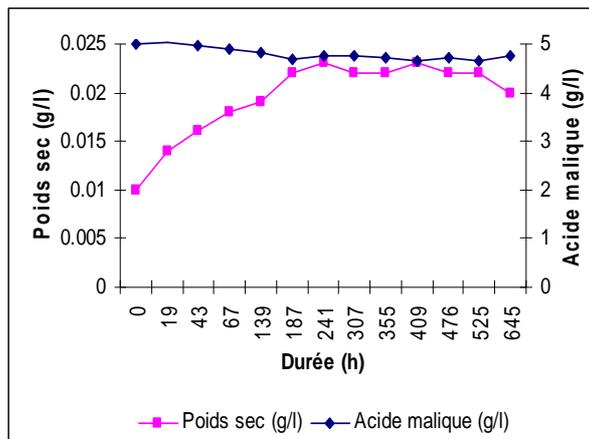


Fig. c-1 Evolution de la biomasse de la souche X et de sa consommation d'acide malique dans le milieu préfermenté par la souche D en absence d'Optired®.

**Tableau c-2. Suivi cinétique de la culture séquentielle réalisée par le couple *S. cerevisiae* souche D/*O. oeni* souche X, phase FML, en présence d'Optired®.**

Durée (h)	D.O	Concentration cellulaire (cellules/mL) x 10 <sup>6</sup>	Poids sec (g/L)	Acide malique (g/L)
0	0,033	2,43 (±0,33)	0,011 (±0,0016)	5 (±0,14)
19	0,027	3,07 (±0,014)	0,014 (±0)	5 (±0)
43	0,026	3,62 (±0,092)	0,016 (±0,0004)	4,94 (±0,012)
67	0,032	4,17 (±0,2)	0,019 (±0,001)	4,86 (±0,03)
139	0,036	5,21 (±0,25)	0,023 (±0,0012)	4,76 (±0,015)
187	0,042	6 (±0,19)	0,027 (±0,00086)	4,63 (±0)
241	0,024	6,51 (±0,25)	0,026 (±0,001)	4,44 (±0,12)
307	0,05	6,72 (±0,08)	0,03 (±0,0004)	4,69 (±0,042)
355	0,046	6,6 (±0,32)	0,03 (±0,0014)	4,62 (±0,046)
409	0,026	6,6 (±0,1)	0,03 (±0,00046)	4,67 (±0,03)
476	0,035	6,39 (±0,23)	0,029 (±0,001)	4,73 (±0,035)
525	0,032	5,47 (±0,14)	0,025 (±0,0006)	4,43 (±0,081)
645	0,042	5,6 (±0,32)	0,025 (±0,0014)	4,7 (±0,064)

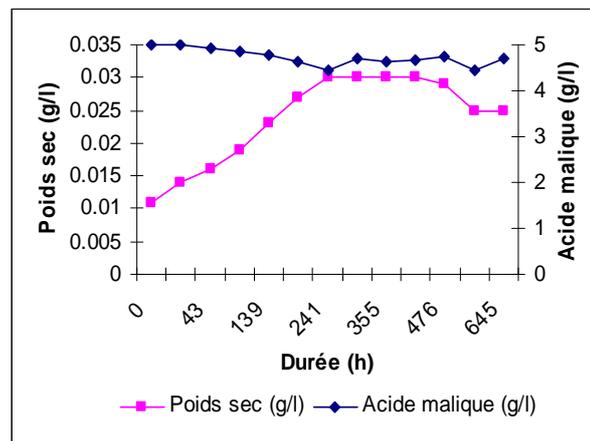


Fig. c-2 Evolution de la biomasse de la souche X et de sa consommation d'acide malique dans le milieu préfermenté par la souche D en présence d'Optired®.

**Tableau c-3. Suivi cinétique de la culture séquentielle réalisée par le couple *S. cerevisiae* souche D/*O. oeni* souche X, phase FML, en présence de MRS.**

Dans cette culture, l'Optired<sup>®</sup> a été remplacé par 55,3 g/L de MRS.

Durée (h)	Concentration cellulaire (cellule/mL) x 10 <sup>6</sup>	Poids sec (g/L)	Acide malique (g/L)
0	2,66 (±)	0,012 (±)	4,88 (±0,02)
23	3,86 (±0,078)	0,0174 (±0,0007)	4,76 (±0,042)
163	5,3 (±0,26)	0,024 (±0,0014)	4,78 (±0)
260	4,95 (±0,071)	0,022 (±0,0007)	4,64 (±0,092)
332	5,23 (±0,46)	0,024 (±0,002)	4,52 (±0,13)
432	5,3 (±0)	0,024 (±0)	4,41 (±0,036)
480	5,5 (±0,3)	0,025 (±0,0014)	4,47 (±0,03)
530	5,34 (±0,16)	0,024 (±0,0007)	4,5 (±0)
650	5,3 (±0,2)	0,024 (±0,0009)	4,51 (±0,02)

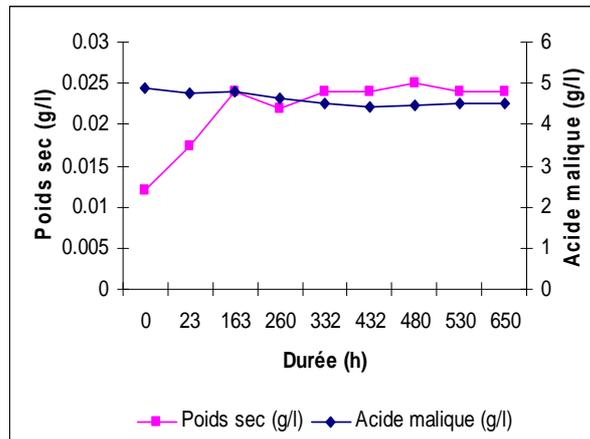


Fig. c-3 Evolution de la biomasse de la souche X et de sa consommation d'acide malique dans le milieu préfermenté par la souche D en présence de MRS.

Annexes de la partie II-2 : Cultures séquentielles réalisées avec *O. oeni* souche Y

a- FML menée par *O. oeni* souche Y dans le milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche B en présence et en absence de 200 mg/L d'Optired®.

Tableau a-1. Suivi cinétique de la culture séquentielle réalisée par le couple *S. cerevisiae* souche B/*O. oeni* souche Y, phase FML, en absence d'Optired®.

Durée (h)	D.O	Concentration cellulaire (cellules/mL) x 10 <sup>6</sup>	Poids sec (g/L)	Acide malique (g/L)
0	0,003	1,8 (±0,07)	0,00072 (±0)	4,98 (±0,17)
15	0,009	2,11 (±0,1)	0,00084 (±0,00004)	4,96 (±0,04)
87	0,013	3,6 (±0,11)	0,0014 (±0,00004)	4,93 (±0,076)
183	0,017	4,86 (±0,14)	0,002 (±0,00006)	4,87 (±0,11)
282	0,018	7,3 (±0,28)	0,0029 (±0,00012)	4,74 (±0,15)
351	0,024	15,5 (±0,71)	0,062 (±0,003)	4,4 (±0,12)
471	0,081	87,5 (±2,7)	0,035 (±0,001)	2,8 (±0,045)
518	0,1	106,5 (±4,95)	0,043 (±0,002)	0,78 (±0,072)
618	0,105	113,43	0,0454	0

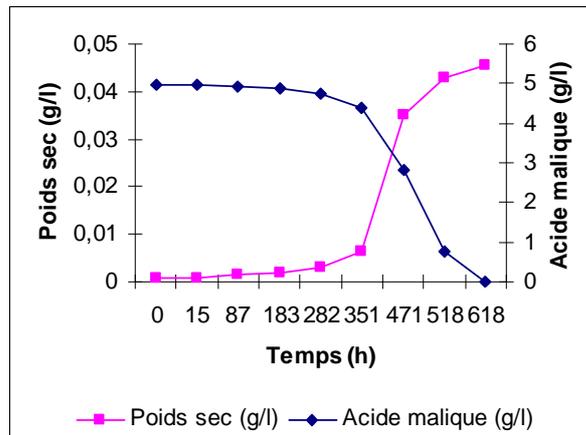


Fig. a-1 Evolution de la biomasse de la souche Y et de sa consommation d'acide malique dans le milieu préfermenté par la souche B en absence d'Optired®.

**Tableau a-2. Suivi cinétique de la culture séquentielle réalisée par le couple *S. cerevisiae* souche B/*O. oeni* souche Y, phase FML, en présence d'Optired®.**

Durée (h)	D.O	Concentration cellulaire (cellules/mL) x 10 <sup>6</sup>	Poids sec (g/L)	Acide malique (g/L)
0	0,003	1,6 (±0)	0,00064 (±0)	4,96 (±0,05)
15	0,009	2,3 (±0,06)	0,00092 (±0,000024)	4,9 (±0,13)
87	0,012	4,38 (±0,03)	0,0018 (±0)	4,77 (±0,16)
183	0,015	5,22 (±0,33)	0,002 (±0,00012)	4,47 (±0,13)
282	0,017	9,3 (±0,14)	0,0037 (±0,00006)	4,3 (±0,025)
351	0,024	38,5 (±2,47)	0,0154 (±0,001)	3,25 (±0,09)
471	0,094	187,5 (±14,14)	0,075 (±0,006)	0,15 (±0,03)
518	0,123	208,75 (±26,5)	0,084 (±0,01)	0 (±0)

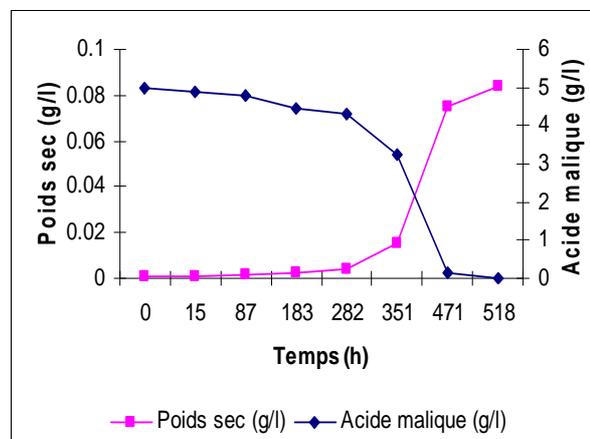


Fig. a-2 Evolution de la biomasse de la souche Y et de sa consommation d'acide malique dans le milieu préfermenté par la souche B en présence d'Optired®.

**b- FML menée par *O. oeni* souche Y dans le milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche C en présence de 200 mg/L d'Optired®.**

**Tableau b-1. Suivi cinétique de la culture séquentielle réalisée par le couple *S. cerevisiae* souche C/*O. oeni* souche Y, phase FML, en présence d'Optired®.**

Durée (h)	D.O	Concentration cellulaire (cellules/mL) x 10 <sup>6</sup>	Poids sec (g/L)	Acide malique (g/L)
0	0,01	3,75 (±0,36)	0,0015 (±0,00014)	4,72 (±0,032)
22	0,011	4,09 (±0,12)	0,0016 (±0,00004)	4,63 (±0,035)
46	0,018	5,76 (±0,2)	0,0023 (±0,00008)	4,46 (±0,086)
70	0,022	5,95 (±0,06)	0,0024 (±0)	4,26 (±0,01)
142	0,027	8,73 (±0,23)	0,0035 (±0,0001)	3,92 (±0,07)
209	0,026	12,75 (±0,25)	0,0051 (±0,0001)	3,65 (±0,09)
309	0,045	21,92 (±1)	0,0088 (±0,0004)	3,35 (±0,07)
378	0,07	42,75 (±3,2)	0,017 (±0,0013)	3,02 (±0,08)
474	0,17	51,2 (±6,3)	0,02 (±0,0024)	2,2 (±0,1)
551	0,057	51,7 (±3,13)	0,021 (±0,0013)	1,25 (±0,06)
645	0,042	51,72 (±2,53)	0,021 (±0,001)	0,8 (±0,023)
714	0,064	49,85 (±1,76)	0,02 (±0,0008)	0,57 (±0,035)
800	0,07	50 (±1,8)	0,02 (±0,0008)	0,3 (±0,05)
886	0,073	52 (±2,6)	0,02 (±0,001)	0 (±0)

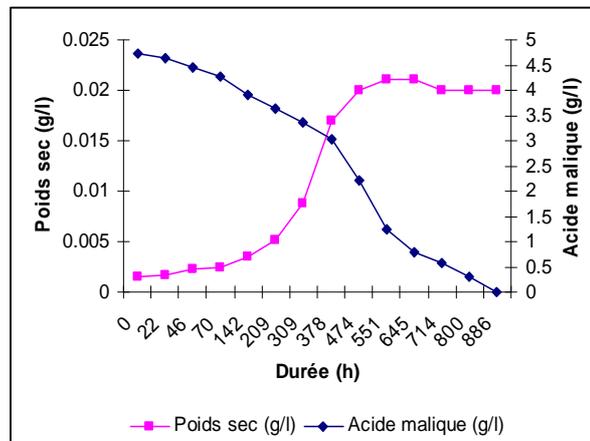


Fig. b-1 Evolution de la biomasse de la souche Y et de sa consommation d'acide malique dans le milieu préfermenté par la souche C en présence d'Optired®.

c- FML menée par *O. oeni* souche Y dans le milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche D en présence de 200 mg/L d'Optired®.

Tableau c-1. Suivi cinétique de la culture séquentielle réalisée par le couple *S. cerevisiae* souche D/*O. oeni* souche Y, phase FML, en présence d'Optired®.

Durée (h)	Concentration cellulaire (cellules/mL) x 10 <sup>6</sup>	Poids sec (g/L)	Acide malique (g/L)
0	2,42 (±0,085)	0,001 (±0,00004)	4,84 (±0,027)
17	4,96 (±0,17)	0,002 (±0,00008)	4,75 (±0,04)
46	8,22 (±0,12)	0,0033 (±0,00006)	4,67 (±0,012)
113	8,84 (±0,25)	0,0035 (±0,0001)	4,33 (±0,012)
192	12,2 (±1)	0,005 (±0,0004)	4,2 (±0,015)
216	13 (±1,1)	0,0052 (±0,0004)	4,06 (±0,021)
360	30,4 (±2,3)	0,012 (±0,001)	3,64 (±0,09)
452	51,4 (±0,18)	0,021 (±0,00008)	3,16 (±0,14)
524	92 (±0)	0,037 (±0)	2,62 (±0,023)
622	145 (±3,54)	0,058 (±0,0014)	1,84 (±0,02)
691	188 (±4,6)	0,075 (±0,002)	1,5 (±0,02)
835	212,5 (±3,7)	0,085 (±0,0014)	1 (±0,05)
962	238 (±4,3)	0,095 (±0,002)	0,6 (±0,07)
1172	240 (±4,54)	0,095 (±0,002)	0,2 (±0,04)
1300	242 (±5,7)	0,095 (±0,002)	0 (±0)

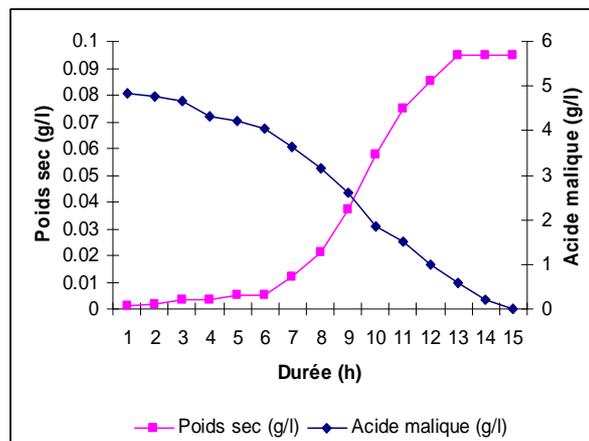


Fig. c-1 Evolution de la biomasse de la souche Y et de sa consommation d'acide malique dans le milieu préfermenté par la souche D en présence d'Optired®.



*Partie III. Caractérisation  
partielle d'un métabolite  
levurien inhibiteur de nature*



### **Partie III. Caractérisation partielle d'un métabolite levurien inhibiteur de nature protéique.**

Les milieux synthétiques jus de raisin préfermentés par *S. cerevisiae* souches D et C ont été fortement inhibiteurs vis-à-vis de la croissance bactérienne et de la démalication chez *O. oeni* souche X. Comme déjà expliqué dans la partie II-1-3 de ce chapitre, les molécules inhibitrices dosées (éthanol, SO<sub>2</sub> et acides gras) ainsi que la composition azotée des milieux à la fin de la FA n'expliquent que partiellement l'inhibition de la FML observée dans ces deux milieux. Pour cela, on a décidé d'investiguer la présence d'autres molécules inhibitrices et de vérifier si une molécule de nature protéique était impliquée dans l'inhibition. Dans ce qui suit nous procéderons à une caractérisation partielle de ces molécules protéiques.

#### **III-1 Etude faite sur le milieu synthétique jus de raisin préfermenté par *S. cerevisiae* souche D.**

##### **III-1-1 Traitements thermique et enzymatique.**

Un traitement thermique (100°C/30 minutes) et un traitement enzymatique avec des enzymes protéolytiques (10 µg/µL d'enzyme) ont été effectués sur le milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche D comme déjà décrit dans la partie II-2-2-11 du chapitre II, paragraphe a. Dans ce qui suit nous présenterons les résultats obtenus suite au traitement thermique et au traitement enzymatique à la pepsine. Les traitements enzymatiques utilisant la trypsine, la chymotrypsine et la protéase XIV ont conduit à des problèmes expérimentaux (précipitation) ce qui a perturbé le déroulement de la FML. Les résultats de ces manipulations seront tout de même donnés en annexes de la partie III-1-1.

Résultats

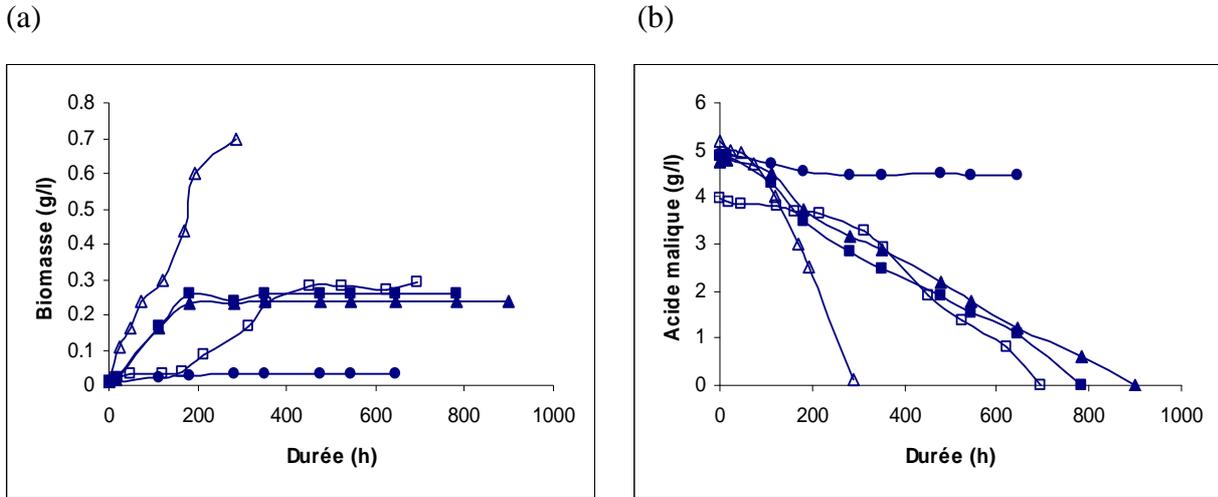


Fig. III-1 Evolution de la biomasse d’*O. oeni* souche X (a) et de sa consommation d’acide malique (b) dans le milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche D traité à la chaleur et à la pepsine ainsi que dans les milieux témoins. (■) traitement enzymatique : 10 µg/µL de pepsine, (▲) traitement thermique : 100°C/30 minutes, (Δ) témoin 1 : milieu synthétique jus de raisin, (□) témoin 2 : milieu synthétique vin, (●) témoin 3 : milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche D et non traité.

**Tableau III-1. Paramètres cinétiques des FML menées par *O. oeni* souche X dans le milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche D traité à la chaleur et à la pepsine et dans les milieux témoins.**

	Témoin 1	Témoin 2	Témoin 3	Traitement à la pepsine	Traitement à la chaleur
Biomasse initiale (g/L)	0,013	0,013	0,011	0,009	0,009
Biomasse maximale (g/L)	0,7	0,29	0,03	0,26	0,24
Productivité (g/L/h)	$240 \times 10^{-5}$	$85 \times 10^{-5}$	$8 \times 10^{-5}$	$137 \times 10^{-5}$	$121 \times 10^{-5}$
Acide malique initial (g/L)	5,2	4	5	4,85	4,75
Acide malique final (g/L)	0	0	4,63	0	0
Vitesse globale de démalication (g/L/h)	$18 \times 10^{-3}$	$6 \times 10^{-3}$	$2 \times 10^{-3}$	$6,2 \times 10^{-3}$	$5,3 \times 10^{-3}$
Pourcentage d’inhibition de la vitesse de démalication (%)	-	67	89	65	70
Vitesse spécifique moyenne de démalication (g/g/h)	$26 \times 10^{-3}$	$21 \times 10^{-3}$	$74 \times 10^{-3}$	$24 \times 10^{-3}$	$22 \times 10^{-3}$
Durée de la FML (h)	288	695	187	784	900

## Discussion

Les résultats illustrés dans la figure III-1 nous montrent une nette amélioration de la croissance bactérienne et une consommation complète de l'acide malique suite aux traitements thermique et enzymatique du milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche D. Ces résultats sont indicateurs de la nature protéique de la molécule inhibitrice en question. Cependant si nous comparons ces résultats à ceux obtenus dans le milieu synthétique jus de raisin (témoin 1), nous constatons que les biomasses maximales obtenues ainsi que les productivités et les vitesses globales de démalication dans les milieux traités restent plus faibles (cf tableau III-1). Ceci veut dire que l'agent protéique en question est responsable d'une partie de l'inhibition et qu'il agit de façon synergique avec les autres conditions inhibitrices du milieu pour amplifier l'inhibition. D'après le tableau III-1, nous remarquons que les biomasses maximales ainsi que les productivités obtenues dans les milieux traités à la chaleur et à la pepsine étaient proches et fortement améliorées par rapport à celles du milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche D mais non traité (témoin 3). En effet, les valeurs obtenues suite au traitement à la pepsine étaient respectivement 8,7 et 17 fois plus élevées que celles du témoin 3. Néanmoins elles restaient 2,7 et 1,75 fois inférieures à celles du témoin 1. Parallèlement à la croissance cellulaire, la démalication était complète et les vitesses globales de démalication étaient proches dans les deux milieux traités avec une valeur 1,2 fois plus élevée suite au traitement à la pepsine. Cette démalication était 3 fois plus rapide dans le milieu traité à la pepsine que dans le témoin 3 au niveau duquel 0,37 g/L d'acide malique ont été uniquement consommés. Cependant les vitesses globales de démalication dans les milieux traités à la pepsine et à la chaleur restaient toujours 2,9 et 3,4 fois plus lentes que celle du témoin 1.

D'autre part, la comparaison des résultats obtenus suite aux traitements à la pepsine et à la chaleur avec ceux obtenus dans le milieu synthétique vin (témoin 2) nous montre une certaine ressemblance dans le comportement d'*O. oeni* souche X. En effet, les biomasses maximales obtenues dans ces 3 milieux étaient très proches bien que la productivité dans le témoin 2 était respectivement 1,6 et 1,4 fois plus faible que dans les milieux traités à la pepsine et à la chaleur et ceci à cause de la longue phase de latence présente dans ce témoin. De plus, les vitesses globales de démalication étaient proches et la démalication était complète. Les pourcentages d'inhibition de la démalication étaient presque identiques ce qui suggère que l'inhibition restante dans le milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche D après traitements enzymatique et thermique, était surtout due à la présence de l'éthanol. Nous rappelons que ce dernier était responsable de la réduction de la vitesse de démalication de 67 %. La comparaison des pourcentages d'inhibition de la démalication des milieux traités à celui du milieu non traité (témoin 3), nous permet d'estimer la participation de l'agent protéique à l'inhibition à 22 %. On peut ainsi déduire que l'inhibition d'*O. oeni* souche X dans le

milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche D était principalement due à l'éthanol (75 % de l'inhibition totale) et à un métabolite de nature protéique (25 % de l'inhibition totale).

Finalement, les vitesses spécifiques de démalication dans les milieux traités et le témoin 2 étaient proches de celle du témoin 1 ce qui veut dire que la plus longue durée requise pour l'accomplissement de la FML dans ces milieux et par la suite la plus faible vitesse globale de démalication étaient dues à une limitation dans la biomasse formée plutôt qu'à une inhibition directe de la consommation de l'acide malique. Ceci est renforcé par l'augmentation de la vitesse spécifique dans le milieu non traité suite à une diminution importante de la biomasse.

L'implication de molécules protéiques dans l'inhibition de la FML a été peu exploitée jusqu'à présent. En plus de l'identification par Dick *et al.* (1992) de deux protéines cationiques synthétisées par *S. cerevisiae* souche R107, les travaux récents de Comitini *et al.* (2004) et Osborne et Edwards (2007) ont permis la caractérisation partielle de deux peptides inhibiteurs de la FML. Alors que le peptide étudié par Comitini *et al.* (2004) était synthétisé par *S. cerevisiae* souche F63 et présentait un poids moléculaire supérieur à 10 KDa, celui caractérisé par Osborne et Edwards (2007) était synthétisée par *S. cerevisiae* souche RUBY.ferm et présentait un poids moléculaire de 5,9 KDa (cf partie I-5-2 du chapitre I de ce manuscrit). D'après ces auteurs, il semble que la nature du peptide inhibiteur est étroitement liée à la souche de levure en question. Les résultats obtenus suite au fractionnement du milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche D par ultrafiltration et dialyse nous permettront d'avoir une idée sur la taille de la molécule produite par cette souche et de voir desquels des deux peptides identifiés par ces auteurs elle est le plus rapprochée.

Notons que la méthode des puits (cf partie II-2-2-11 du chapitre II, paragraphe b), réalisée par utilisation du surnageant du milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche D et de la bactérie *O. oeni* souche X n'a pas entraîné la formation d'un halo d'inhibition. En effet, ceci peut s'expliquer par le fait que même pendant la culture séquentielle dans le milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche D on n'a pas observé un déclin de la population bactérienne après inoculation des  $2 \times 10^6$  cellules/mL. Au contraire, on a observé une faible croissance cellulaire aboutissant à la formation de  $6,6 \times 10^6$  cellules/mL suivie d'une phase stationnaire et d'un début de déclin (cf annexes de la partie II-1-3, paragraphe c). Ce test n'est donc pas pertinent pour estimer l'effet inhibiteur de *S. cerevisiae* souche D sur la FML puisqu'il ne se base que sur l'inhibition de la croissance bactérienne. Nous rappelons que ces deux activités ne sont pas systématiquement corrélées.

Par ailleurs, on n'a pas non plus réussi à précipiter efficacement les protéines du milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche D au sulfate d'ammonium comme décrit dans la partie II-2-2-11 du chapitre II, paragraphe c. En effet, à 60 % de saturation en sulfate d'ammonium, le culot de protéines obtenu après centrifugation se détachait facilement en récupérant le surnageant. Même en

augmentant le pourcentage de saturation en sulfate d'ammonium à 75 %, le résultat n'était pas meilleur. On a donc finalement décidé de passer directement à l'ultrafiltration et à la dialyse (cf partie II-2-2-11 du chapitre II, paragraphes d et e).

### **III-1-2 Fractionnement du milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche D par ultrafiltration et dialyse.**

L'ultrafiltration et la dialyse nous ont permis de fractionner le milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche D et les fractions obtenues étaient les suivantes :

- Fraction 1 : poids moléculaire compris entre 3,5 et 5 KDa.
- Fraction 2 : poids moléculaire supérieure à 5 KDa et fraction 3,5 fois concentrée dans le milieu MRS.
- Fraction 3 : poids moléculaire supérieure à 10 KDa et fraction 3,5 fois concentrée dans le milieu MRS.

Dans ce qui suit nous présenterons les résultats des FML menées par *O. oeni* souche X dans les milieux MRS modifiés contenant les 3 fractions peptidiques citées ci-dessus ainsi que dans le milieu MRS témoin (milieu MRS modifié, cf composition partie II-1-2 du chapitre II de ce manuscrit). En annexes de la partie III-1-2 seront présentés les tableaux et les figures représentant le suivi cinétique de chacune de ces FML.

Résultats

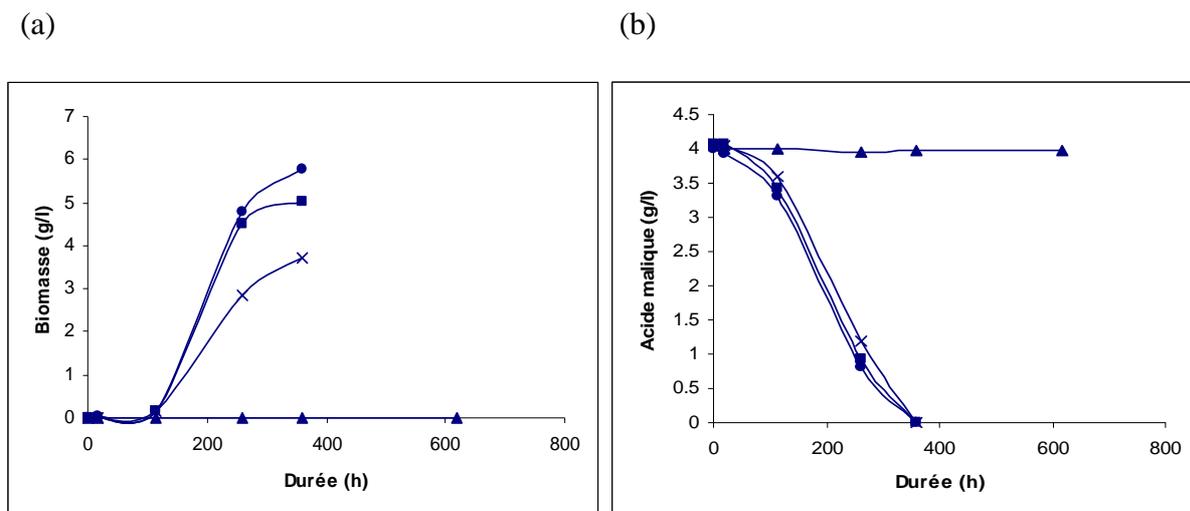


Fig. III-2 Evolution de la biomasse d’*O. oeni* souche X (a) et de sa consommation d’acide malique (b) dans les milieux MRS contenant les différentes fractions peptidiques du milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche D ainsi que dans le milieu MRS témoin. (●) témoin : milieu MRS modifié, (■) fraction peptidique entre 3,5 et 5 KDa, (▲) fraction peptidique supérieure à 5 KDa, (x) fraction peptidique supérieure à 10 KDa.

**Tableau III-2. Paramètres cinétiques des FML menées par *O. oeni* souche X dans les milieux MRS contenant les différentes fractions peptidiques du milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche D ainsi que dans le milieu témoin.**

	Témoin	Fraction peptidique entre 3,5 et 5 KDa	Fraction peptidique supérieure à 5 KDa	Fraction peptidique supérieure à 10 KDa
Biomasse initiale (g/L)	0,009	0,011	0,009	0,009
Biomasse finale (g/L)	5,76	5,04	0,0054	3,7
Productivité (g/L/h)	$23 \times 10^{-3}$	$20 \times 10^{-3}$	-	$14 \times 10^{-3}$
Acide malique initial (g/L)	4	4,07	4,04	4,07
Acide malique final (g/L)	0	0	4	0
Vitesse globale de démalication (g/L/h)	$11 \times 10^{-3}$	$11 \times 10^{-3}$	-	$11 \times 10^{-3}$
Vitesse spécifique moyenne de démalication (g/g/h)	$1,91 \times 10^{-3}$	$2,2 \times 10^{-3}$	-	$3 \times 10^{-3}$
Durée de la FML (h)	360	360	618	360

Discussion

La figure III-2 et le tableau III-2 nous montrent qu’*O. oeni* souche X a présenté le même profil cinétique de croissance et de démalication dans le milieu MRS contenant la fraction peptidique

comprise entre 3,5 et 5 KDa et dans le milieu témoin. Le profil de démalication dans le milieu contenant la fraction peptidique supérieure à 10 KDa était identique aux deux premiers mais la croissance cellulaire était légèrement plus faible. Par contre, le milieu contenant la fraction peptidique supérieure à 5 KDa a été fortement inhibiteur. En effet dans ce milieu il n'y a pas eu de croissance cellulaire ni de démalication. Au contraire on a observé une mort cellulaire après 260 heures qui n'est pas visible sur la figure III-2 mais qu'on peut visualiser sur la figure c de l'annexe III-1-2. Ces résultats nous mènent à la conclusion que le milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche D contient un peptide inhibiteur qui possède un poids moléculaire compris entre 5 et 10 KDa. Etant donné que la fraction peptidique supérieure à 5 KDa a été 3,5 fois concentrée suite à notre démarche expérimentale, et prenant en considération les 10 % d'éthanol présents dans le milieu MRS, on peut mieux comprendre cette inhibition drastique de la croissance cellulaire et de la démalication. Ce peptide inhibiteur, de part sa taille, semble être plus proche de celui identifié par Osborne et Edwards (2007) (5,9 KDa) que de celui identifié par Comitini *et al.* (2004) (supérieur à 10 KDa). Osborne et Edwards (2007) avaient proposé un mécanisme d'action de leur peptide semblable à celui des bactériocines vu sa petite taille alors que Comitini *et al.* (2004) avaient montré que leur peptide agissait vraisemblablement sur des récepteurs spécifiques de la membrane cellulaire qui se saturaient au fur et à mesure que la concentration du peptide augmentait ce qui expliquait l'augmentation de l'inhibition. Des mécanismes similaires pourraient être impliqués dans l'inhibition observée dans notre cas.

Finalement des tests supplémentaires sont encore nécessaires pour déterminer le poids moléculaire exact de ce peptide, son mode et son seuil d'action ainsi que le moment de son relargage dans le milieu par la levure au cours de la FA.

### **III-2 Etude faite sur le milieu synthétique jus de raisin préfermenté par *S. cerevisiae* souche C.**

#### **III-2-1 Traitements thermique et enzymatique.**

La même démarche expérimentale utilisée avec le milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche D a été adoptée pour tester la présence d'un agent protéique inhibiteur dans le milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche C. Dans ce cas, seule la pepsine a été utilisée pour le traitement enzymatique. Par contre, deux traitements thermiques ont été réalisés. En effet, après chauffage pendant 30 minutes dans un bain-marie thermostaté à 100°C, l'inhibition n'a pas été levée alors que l'activité enzymatique de la pepsine avait partiellement levée l'inhibition. Pour cela, on a autoclavé le milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche C (120°C /20 minutes). Les résultats des différentes FML

menées par *O. oeni* souche X dans les milieux traités et les milieux témoins sont donnés dans ce qui suit.

**Résultats**

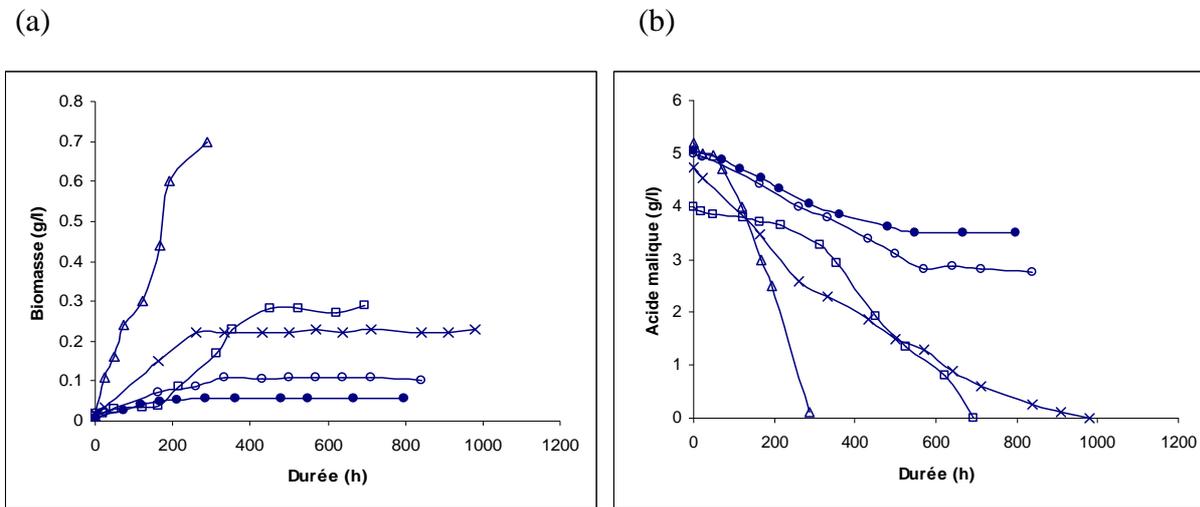


Fig. III-3 Evolution de la biomasse d’*O. oeni* souche X (a) et de sa consommation d’acide malique (b) dans le milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche C après traitements enzymatique et thermique ainsi que dans les milieux témoins. (x) 10µg/µL de pepsine, (o) autoclavage (120°C/20 minutes), (Δ) témoin 1 : milieu synthétique jus de raisin, (□) témoin 2 : milieu synthétique vin, (●) témoin 3 : milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche C et non-traité.

**Tableau III-3. Paramètres cinétiques des FML menées par *O. oeni* souche X dans le milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche C après traitement à la pepsine et autoclavage ainsi que dans les milieux témoins.**

	Témoin 1	Témoin 2	Témoin 3	Traitement à la pepsine	Autoclavage
Biomasse initiale (g/L)	0,013	0,013	0,008	0,018	0,018
Biomasse maximale (g/L)	0,7	0,29	0,057	0,22	0,11
Productivité (g/L/h)	240 x 10 <sup>-5</sup>	85 x 10 <sup>-5</sup>	13,6 x 10 <sup>-5</sup>	78 x 10 <sup>-5</sup>	28 x 10 <sup>-5</sup>
Acide malique initial (g/L)	5,2	4	5,05	4,73	5
Acide malique final (g/L)	0	0	3,5	0	2,8
Vitesse globale de démalication (g/L/h)	18 x 10 <sup>-3</sup>	6 x 10 <sup>-3</sup>	2,83 x 10 <sup>-3</sup>	4,83 x 10 <sup>-3</sup>	3,86 x 10 <sup>-3</sup>
Pourcentage d’inhibition de la vitesse de démalication (%)	-	67	84	73	79
Vitesse spécifique moyenne de démalication (g/g/h)	26 x 10 <sup>-3</sup>	21 x 10 <sup>-3</sup>	50 x 10 <sup>-3</sup>	21 x 10 <sup>-3</sup>	35 x 10 <sup>-3</sup>
Durée de la FML (h)	288	695	548	980	570

## Discussion

Le traitement à la pepsine a amélioré la croissance cellulaire et a entraîné une démalication complète. En effet, la biomasse maximale formée et la productivité ont été respectivement 3,86 et 5,74 fois plus élevées que dans le milieu préfermenté mais non traité (témoin 3). La démalication a été complètement achevée et la vitesse globale de démalication a été 1,71 fois plus rapide que celle du témoin 3 au niveau duquel 1,55 g/L d'acide malique ont été uniquement consommés. Cependant, la comparaison de ces résultats avec le témoin 1 montre bien que l'inhibition n'a été que partiellement levée. La biomasse maximale et la productivité étaient toujours 3,2 et 3,1 fois plus faibles que celles du témoin 1 et la vitesse globale de démalication était 3,73 fois plus lente. De même, si nous comparons les résultats à ceux du témoin 2 nous constatons que l'inhibition restante dans le milieu après traitement enzymatique était toujours plus élevée (cf tableau III-3). L'ensemble de ces résultats nous amènent à penser qu'une molécule de nature protéique pourrait être impliquée dans l'inhibition. La comparaison du pourcentage d'inhibition de la démalication du témoin 3 à celui du milieu traité à la pepsine nous laisse penser que cette molécule protéique serait responsable de 11 % de l'inhibition. De plus la comparaison avec le pourcentage d'inhibition du témoin 2 nous permet de dire qu'après traitement à la pepsine, l'inhibition restante n'était pas uniquement due à l'éthanol mais à d'autres molécules également impliquées.

Concernant le traitement thermique, deux étapes ont été réalisées. Dans un premier temps, un chauffage du milieu à 100°C pendant 30 minutes n'a pas levé l'inhibition (cf tableau a-1 et figure a-1, annexes de la partie III-2-1) ce qui peut être due à une thermostabilité de l'inhibiteur à cette température. Pour cela on a autoclavé le milieu. Bien que la biomasse formée, la productivité et la vitesse globale de démalication aient été améliorées respectivement de 1,93, 2,1 et 1,36 fois par rapport au milieu non traité (témoin 3), la démalication est restée incomplète et uniquement 2,2 g/L d'acide malique ont été consommés. La comparaison du pourcentage d'inhibition avec celui du témoin 2 nous montre qu'en plus de l'éthanol, il reste dans le milieu des molécules inhibitrices non sensibles à la chaleur et qui sont responsables d'au moins 12 % de la réduction de la démalication. D'autre part la comparaison avec celui du témoin 3 nous montre que l'inhibition levée constituait au maximum 5 % de l'ensemble de l'inhibition. Notons que l'autoclavage pourrait avoir entraîné une évaporation d'une certaine quantité d'éthanol.

Finalement, les résultats obtenus après traitements thermique et enzymatique nous amènent à 2 conclusions possibles :

- il existe une molécule protéique inhibitrice, thermostable à 100°C mais sensible à l'autoclavage, qui participe faiblement à l'inhibition en réduisant la vitesse de démalication de maximum 5 %. Suite à sa dénaturation par autoclavage, l'inhibition reste importante et la

démalication incomplète car d'autres molécules inhibitrices sont impliquées (éthanol, SO<sub>2</sub>, acides gras, molécules non identifiées, etc...). Le meilleur résultat obtenu suite à l'action de la pepsine pourrait être due en plus de l'élimination de la molécule protéique en question, à l'enrichissement du milieu en acides aminés stimulateurs de la FML par dégradation des protéines de ce milieu (1023 mg/L).

- la protéine en question est thermostable même après autoclavage et donc l'activité inhibitrice résiduelle dans ce cas est due entre autres à cette protéine. Elle a été uniquement dénaturée suite à l'action de la pepsine et avait participé à l'inhibition en réduisant la vitesse de démalication de maximum 11 %.

On a finalement décidé de fractionner le milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche C par ultrafiltration et dialyse comme on avait procédé avec le milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche D pour vérifier si effectivement une molécule de nature protéique était impliquée dans l'inhibition et pour essayer de déterminer son poids moléculaire.

### **III-2-2 Fractionnement du milieu synthétique jus de raisin préfermenté par *S. cerevisiae* souche C par ultrafiltration et dialyse.**

Dans ce qui suit nous présenterons les résultats des FML menées par *O. oeni* souche X dans les milieux MRS modifiés contenant les 3 fractions peptidiques provenant du milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche C (entre 3,5 et 5 KDa, supérieure à 5 KDa, supérieure à 10 KDa) ainsi que dans le milieu MRS témoin (milieu MRS modifié, cf composition partie II-1-2 du chapitre II de ce manuscrit). En annexes de la partie III-2-2 seront présentés les tableaux et les figures représentant le suivi cinétique de chacune de ces FML.

Résultats

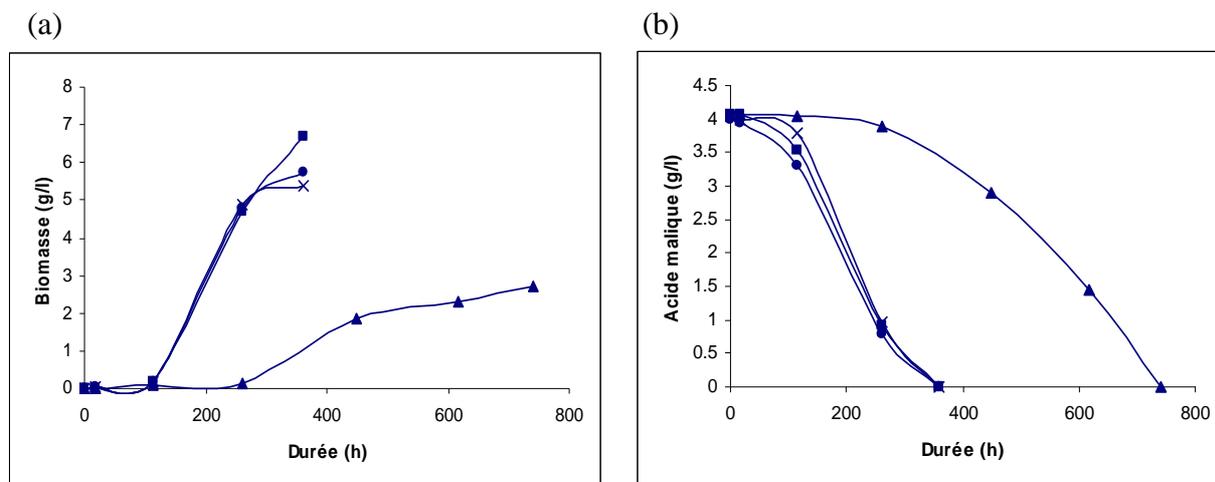


Fig. III-4 Evolution de la biomasse d’*O. oeni* souche X (a) et de sa consommation d’acide malique (b) dans les milieux MRS contenant les différentes fractions peptidiques du milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche C ainsi que dans le milieu MRS témoin. (●) témoin : milieu MRS modifié, (■) fraction peptidique entre 3,5 et 5 KDa, (▲) fraction peptidique supérieure à 5 KDa, (x) fraction peptidique supérieure à 10 KDa.

**Tableau III-4. Paramètres cinétiques des FML menées par *O. oeni* souche X dans les milieux MRS contenant les différentes fractions peptidiques du milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche C ainsi que dans le milieu témoin.**

	Témoin	Fraction peptidique entre 3,5 et 5 KDa	Fraction peptidique supérieure à 5 KDa	Fraction peptidique supérieure à 10 KDa
Biomasse initiale (g/L)	0,009	0,009	0,013	0,013
Biomasse maximale (g/L)	5,76	6,68	2,7	5,36
Productivité (g/L/h)	$23 \times 10^{-3}$	$27 \times 10^{-3}$	$5,4 \times 10^{-3}$	$21 \times 10^{-3}$
Acide malique initial (g/L)	4	4,07	4,07	4,04
Acide malique final (g/L)	0	0	0	0
Vitesse globale de démalication (g/L/h)	$11 \times 10^{-3}$	$11 \times 10^{-3}$	$5,5 \times 10^{-3}$	$11 \times 10^{-3}$
Vitesse spécifique moyenne de démalication (g/g/h)	$1,91 \times 10^{-3}$	$1,7 \times 10^{-3}$	$2 \times 10^{-3}$	$2,1 \times 10^{-3}$
Durée de la FML (h)	360	360	740	360

Discussion

Dans les milieux MRS contenant les fractions peptidiques comprises entre 3,5 et 5 KDa et supérieures à 10 KDa, *O. oeni* souche X a présenté des profils de croissance et de démalication identiques à ceux du témoin (Figure III-4 et tableau III-4). Une croissance légèrement plus élevée a

été détectée en présence de la fraction peptidique comprise entre 3,5 et 5 KDa. Par contre, dans le milieu contenant la fraction peptidique supérieure à 5 KDa, la croissance cellulaire était plus faible et la démalication plus lente à s'accomplir. En effet, la biomasse maximale obtenue et la productivité étaient respectivement 2 et 4,3 fois plus faibles que celles du témoin. De plus la démalication était complètement achevée mais 2 fois plus lente que celle du témoin. Ces résultats nous confirment la présence d'un peptide inhibiteur de poids moléculaire compris entre 5 et 10 KDa. Ce peptide, même lorsqu'il est 3,5 fois concentré, n'empêche pas l'obtention d'une bonne croissance cellulaire et la consommation complète de l'acide malique. On peut donc suggérer que ce peptide est faiblement produit par *S. cerevisiae* souche C ou bien qu'*O. oeni* souche X est peu sensible à son action inhibitrice. Ce peptide semble être différent de celui produit par *S. cerevisiae* souche D car contrairement à ce dernier, il est thermostable à 100°C et son action inhibitrice est moins importante (cf partie III-1). Nous pouvons donc conclure que ces peptides inhibiteurs sont spécifiques de la souche de levure en question. Comme pour le peptide produit par *S. cerevisiae* souche D, des tests supplémentaires sont encore nécessaires pour déterminer le poids moléculaire exact du peptide produit par *S. cerevisiae* souche C, son mode et son seuil d'action et le moment de son relargage dans le milieu par la levure au cours de la FA. Vu que la démalication peut être complètement achevée en présence de ce peptide (milieu MRS, peptide 3,5 fois concentré) et en son absence (milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche C traité à la pepsine), on peut suggérer que ce peptide n'a un effet que lorsqu'il est associé aux autres molécules inhibitrices du milieu. On peut donc supposer qu'il a une action semblable à celle des bactériocines comme dans le cas du peptide identifié par Osborne et Edwards (2007). Il formerait ainsi un pore membranaire et permettrait l'entrée des autres molécules inhibitrices entre autres le SO<sub>2</sub> (28,9 mg/L de SO<sub>2</sub> total dont 8,9 mg/L de SO<sub>2</sub> libre produits par *S. cerevisiae* souche C) d'où la forte action inhibitrice lorsqu'il est associé aux autres facteurs du milieu. Cependant ceci reste une hypothèse et d'autres modes d'action peuvent être impliqués.

### **III-3 Conclusion**

Dans cette partie, nous avons essayé de rechercher la présence de molécules inhibitrices de nature protéique dans les milieux préfermentés par *S. cerevisiae* souches C et D. Les résultats ont montré que l'inhibition exercée par la souche D était partiellement due à un peptide de poids moléculaire compris entre 5 et 10 KDa capable de réduire la vitesse de démalication de 25 %. Il agit principalement avec l'éthanol responsable de la réduction de la vitesse de démalication de 75 % mais sa présence semble être essentielle pour inhiber fortement la démalication. D'autre part les résultats obtenus avec *S. cerevisiae* souche C ont également montré la présence d'un peptide inhibiteur de poids moléculaire compris entre 5 et 10 KDa capable de réduire la vitesse de démalication de 5 à 11 %. Ces deux peptides ne semblent pas être les mêmes car celui synthétisé par la souche C est thermostable à 100°C contrairement au peptide synthétisé par la souche D. De plus son action inhibitrice sur la réalisation de la FML n'est pas aussi importante que celle exercée par le peptide synthétisé par la souche D. En effet, même quand il est 3,5 fois concentré, la démalication est 2 fois ralentie mais elle est entièrement achevée contrairement au peptide produit par la souche D qui inhibe complètement la démalication dans ce cas.

**Annexes de la partie III-1-1 : Traitements thermique et enzymatique du milieu synthétique jus de raisin préfermenté par *S. cerevisiae* souche D.**

**a-Traitement thermique du milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche D.**

**Tableau a-1. Suivi cinétique de la FML réalisée par *O. oeni* souche X dans le milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche D et traité à la chaleur (100°C/30 minutes).**

Durée (h)	Concentration cellulaire (cellules/mL) x 10 <sup>6</sup>	Poids sec (g/L)	Acide malique (g/L)
0	2 (±0,2)	0,009 (±0,001)	4,75 (±0,05)
16	4,09 (±0,2)	0,018 (±0,0009)	4,8 (±0,05)
113	35,13 (±1,24)	0,16 (±0,006)	4,5 (±0,06)
183	51,6 (±1,5)	0,23 (±0,007)	3,71 (±0,02)
281	51,83 (±1)	0,23 (±0,0044)	3,15 (±0,02)
352	53 (±2,3)	0,24 (±0,01)	2,86 (±0,06)
477	53,13 (±2)	0,24 (±0,009)	2,2 (±0,13)
545	54 (±2,7)	0,24 (±0,012)	1,8 (±0,08)
646	54,3 (±3,1)	0,24 (±0,014)	1,2 (±0,05)
784	53 (±2,3)	0,24 (±0,01)	0,6 (±0,07)
900	53,7 (±2)	0,24 (±0,009)	0 (±0)

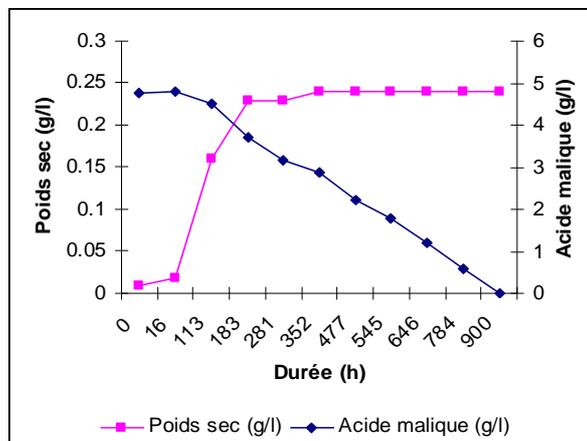


Fig. a-1 Evolution de la biomasse de la souche X et de sa consommation d'acide malique dans le milieu préfermenté par la souche D et traité à la chaleur.

**b-Traitements enzymatiques du milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche D.****b-1 Pepsine****Tableau b-1. Suivi cinétique de la FML réalisée par *O. oeni* souche X dans le milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche D et traité à la pepsine.**

Durée (h)	Concentration cellulaire (cellules/mL) x 10 <sup>6</sup>	Poids sec (g/L)	Acide malique (g/L)
0	2 (±0,06)	0,009 (±0,0003)	4,85 (±0,06)
16	4,89 (±0,044)	0,022 (±0,0002)	4,86 (±0,06)
113	37 (±3,36)	0,17 (±0,015)	4,3 (±0,11)
183	56,6 (±1,94)	0,26 (±0,009)	3,47 (±0,006)
281	53,7 (±3)	0,24 (±0,013)	2,84 (±0,044)
352	58,1 (±3,1)	0,26 (±0,014)	2,47 (±0,02)
477	58,4 (±2,8)	0,26 (±0,0125)	1,9 (±0,006)
545	58,4 (±2,3)	0,26 (±0,01)	1,53 (±0,07)
646	58,6 (±2,3)	0,26 (±0,01)	1,1 (±0,04)
784	58 (±2)	0,26 (±0,009)	0 (±0)

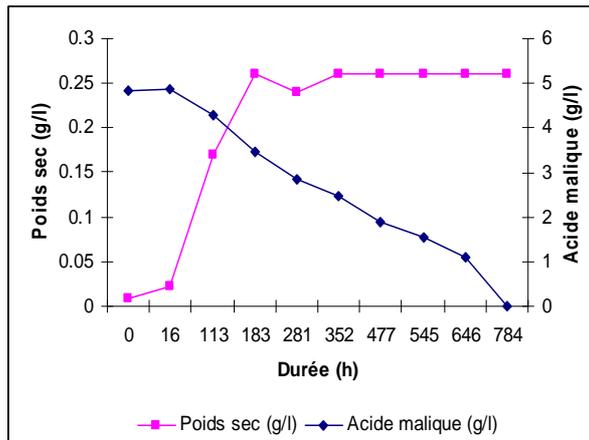


Fig. b-1 Evolution de la biomasse de la souche X et de sa consommation d'acide malique dans le milieu préfermenté par la souche D et traité à la pepsine.

**b-2 Trypsine**

**Tableau b-2. Suivi cinétique de la FML réalisée par *O. oeni* souche X dans le milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche D et traité à la trypsine.**

Durée (h)	Concentration cellulaire (cellules/mL) x 10 <sup>6</sup>	Poids sec (g/L)	Acide malique (g/L)
0	2,52 (±0,11)	0,011 (±0,0005)	4,76 (±0,06)
89	13,5 (±0,65)	0,061 (±0,003)	4,47 (±0,06)
159	25,25 (±2)	0,11 (±0,009)	4,05 (±0,015)
257	22,8 (±3,2)	0,1 (±0,01)	3,6 (±0,064)
329	19,75 (±0,9)	0,09 (±0,004)	3,43 (±0,05)
454	23,8 (±2,7)	0,11 (±0,012)	3,14 (±0,06)
522	21,15 (±1,5)	0,1 (±0,007)	2,97 (±0,07)
623	22 (±1,7)	0,1 (±0,008)	2,43 (±0,04)
784	20 (±0,7)	0,09 (±0,0032)	2,4 (±0,03)
900	22,23 (±2,3)	0,1 (±0,01)	2,42 (±0,04)

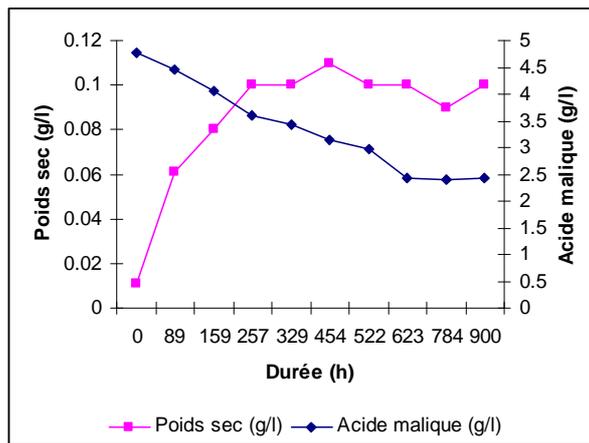


Fig. b-2 Evolution de la biomasse de la souche X et de sa consommation d'acide malique dans le milieu préfermenté par la souche D et traité à la trypsine.

### b-3 Chymotrypsine

**Tableau b-3. Suivi cinétique de la FML réalisée par *O. oeni* souche X dans le milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche D et traité à la chymotrypsine.**

Durée (h)	Concentration cellulaire (cellules/mL) x 10 <sup>6</sup>	Poids sec (g/L)	Acide malique (g/L)
0	2,66 (±0,23)	0,012 (±0,001)	4,77 (±0,08)
89	8,83 (±0,6)	0,04 (±0,003)	4,64 (±0,085)
159	14,5 (±0,43)	0,065 (±0,002)	4,3 (±0,06)
257	13,92 (±0,8)	0,063 (±0,004)	4,14 (±0,03)
329	13,2 (±0,72)	0,06 (±0,0033)	3,94 (±0,046)
454	13,25 (±0,6)	0,06 (±0,003)	3,81 (±0,023)
522	13,1 (±0,6)	0,06 (±0,003)	3,7 (±0,07)
623	13 (±0,4)	0,06 (±0,002)	3,75 (±0,04)

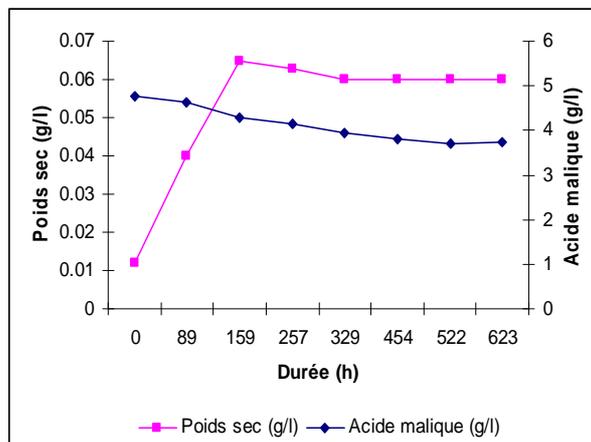


Fig. b-3 Evolution de la biomasse de la souche X et de sa consommation d'acide malique dans le milieu préfermenté par la souche D et traité à la chymotrypsine.

## b-4 Protéase XIV

Tableau b-4. Suivi cinétique de la FML réalisée par *O. oeni* souche X dans le milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche D et traité à la protéase XIV.

Durée (h)	Concentration cellulaire (cellules/mL) x 10 <sup>6</sup>	Poids sec (g/L)	Acide malique (g/L)
0	2 (±0)	0,009 (±0)	4,72 (±0,09)
16	3,4 (±0,2)	0,015 (±0,0009)	4,73 (±0,08)
113	8 (±0,4)	0,036 (±0,002)	4,62 (±0,11)
183	7,32 (±0,16)	0,033 (±0,0007)	4,26 (±0,064)
281	7,4 (±0,18)	0,033 (±0,0008)	4,05 (±0,09)
352	7,4 (±0)	0,033 (±0)	3,83 (±0,053)
477	7,55 (±0,35)	0,034 (±0,0016)	3,75 (±0,07)
545	7,4 (±0,42)	0,033 (±0,002)	3,58 (±0,05)
646	7,5 (±0,33)	0,034 (±0,0015)	3,6 (±0,03)

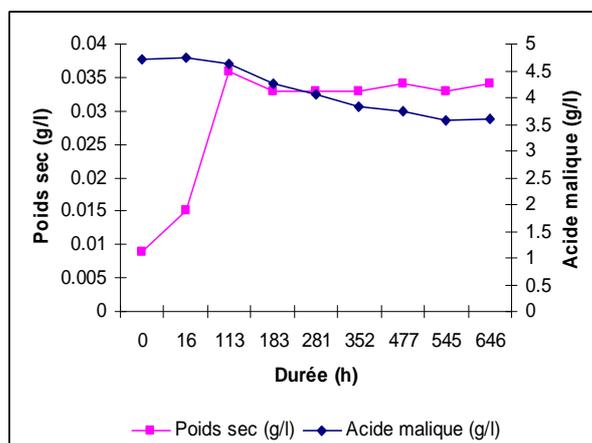


Fig. b-4 Evolution de la biomasse de la souche X et de sa consommation d'acide malique dans le milieu préfermenté par la souche D et traité à la protéase XIV.

**Annexes de la partie III-1-2 : Fractionnement du milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche D par ultrafiltration et dialyse.**

**a-Témoin**

**Tableau a. Suivi cinétique de la FML réalisée par *O. oeni* souche X dans le milieu témoin (milieu MRS modifié).**

Durée (h)	Concentration cellulaire (cellules/mL) x 10 <sup>6</sup>	Poids sec (g/L)	Acide malique (g/L)
0	2 (±0,2)	0.009 (±0,0009)	4 (±0,04)
18	9.6 (±0,8)	0.043 (±0,004)	3.93 (±0,07)
114	36 (±3,2)	0.16 (±0,0014)	3.3 (±0,02)
260	1067 (±8,5)	4.8 (±0,04)	0.8 (±0,04)
360	1280 (±12,7)	5.76 (±0,06)	0 (±0)

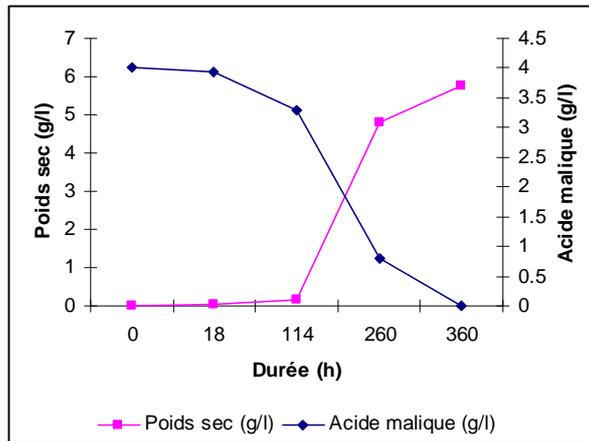


Fig. a Evolution de la biomasse de la souche X et de sa consommation d'acide malique dans le milieu témoin MRS.

**b- Milieu MRS contenant la fraction peptidique du milieu préfermenté par la souche D comprise entre 3,5 et 5 KDa.**

**Tableau b. Suivi cinétique de la FML réalisée par *O. oeni* souche X en présence de la fraction peptidique du milieu préfermenté par la souche D comprise entre 3,5 et 5 KDa.**

Durée (h)	Concentration cellulaire (cellules/mL) x 10 <sup>6</sup>	Poids sec (g/L)	Acide malique (g/L)
0	2.4 (±0,23)	0.011 (±0,001)	4.07 (±0,03)
18	3.33 (±0,4)	0.015 (±0,002)	4.07 (±0,07)
114	33 (±3,2)	0.15 (±0,015)	3.44 (±0,11)
260	1000 (±7,6)	4.5 (±0,034)	0.94 (±0,05)
360	1120 (±13,8)	5.04 (±0,062)	0 (±0)

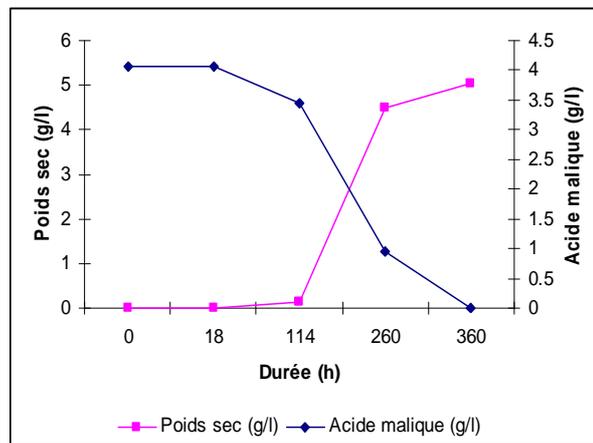


Fig. b Evolution de la biomasse de la souche X et de sa consommation d'acide malique en présence de la fraction peptidique du milieu préfermenté par la souche D comprise entre 3,5 et 5 KDa.

c- Milieu MRS contenant la fraction peptidique du milieu préfermenté par la souche D supérieure à 5 KDa.

Tableau c. Suivi cinétique de la FML réalisée par *O. oeni* souche X en présence de la fraction peptidique du milieu préfermenté par la souche D supérieure à 5 KDa.

Durée (h)	Concentration cellulaire (cellules/mL) x 10 <sup>6</sup>	Poids sec (g/L)	Acide malique (g/L)
0	2 (±0)	0.009 (±0)	4.04 (±0,08)
18	2,22 (±0,12)	0.01 (±0,00054)	4 (±0,03)
114	2,11 (±0)	0.0095 (±0)	4 (±0,05)
260	2,1 (±0,03)	0.0093 (±0,0001)	3.95 (±0,07)
360	1,8 (±0,06)	0.008 (±0,0003)	3.97 (±0,1)
618	1,2 (±0,01)	0.0054 (±0)	3.97 (±0,07)

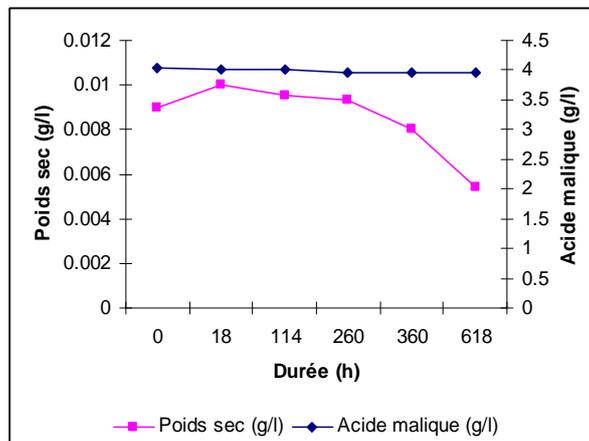


Fig. c Evolution de la biomasse de la souche X et de sa consommation d'acide malique en présence de la fraction peptidique provenant du milieu préfermenté par la souche D et supérieure à 5 KDa.

**d- Milieu MRS contenant la fraction peptidique du milieu préfermenté par la souche D supérieure à 10 KDa.**

**Tableau d. Suivi cinétique de la FML réalisée par *O. oeni* souche X en présence de la fraction peptidique du milieu préfermenté par la souche D supérieure à 10 KDa.**

Durée (h)	Concentration cellulaire (cellules/mL) x 10 <sup>6</sup>	Poids sec (g/L)	Acide malique (g/L)
0	2 (±0)	0.009 (±0)	4.07 (±0,1)
18	3.64 (±0,22)	0.016 (±0,001)	4.05 (±0,04)
114	38 (±2,7)	0.17 (±0,012)	3.6 (±0,08)
260	630 (±5,8)	2.84 (±0,026)	1.2 (±0,01)
360	820 (±10,4)	3.7 (±0,047)	0 (±0)

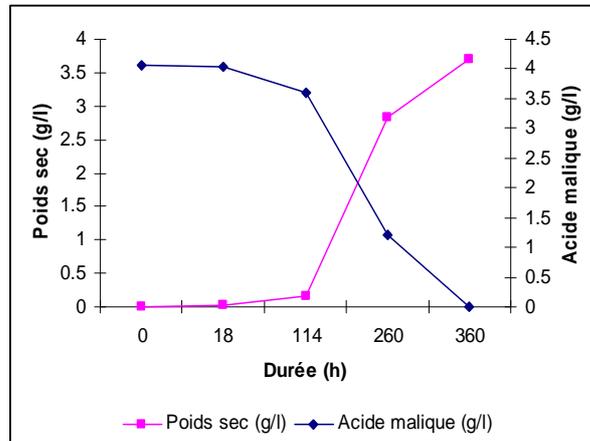


Fig. d Evolution de la biomasse de la souche X et de sa consommation d'acide malique en présence de la fraction peptidique provenant du milieu préfermenté par la souche D et supérieure à 10 KDa.

**Annexes de la partie III-2-1 : Traitements thermique et enzymatique du milieu synthétique jus de raisin préfermenté par *S. cerevisiae* souche C.**

**a-Traitement thermique du milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche C.**

**Tableau a-1. Suivi cinétique de la FML réalisée par *O. oeni* souche X dans le milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche C après chauffage de ce dernier à 100°C pendant 30 minutes.**

Durée (h)	Concentration cellulaire (cellules/mL) x 10 <sup>6</sup>	Poids sec (g/L)	Acide malique (g/L)
0	2 (±0,22)	0.009 (±0,001)	5 (±0,04)
23	2.22 (±0,12)	0.01 (±0,0005)	4.95 (±0,06)
163	12.2 (±0,16)	0.055 (±0,0007)	4.4 (±0,13)
260	14 (±0,08)	0.063 (±0,0004)	4.1 (±0,054)
332	15.6 (±0,43)	0.07 (±0,002)	3.8 (±0,16)
432	15.8 (±0,55)	0.071 (±0,0025)	3.6 (±0,08)
500	15 (±0,7)	0.067 (±0,003)	3.53 (±0,04)
570	16 (±0,4)	0.071 (±0,0018)	3.47 (±0,022)
640	16.4 (±0,32)	0.074 (±0,0014)	3.43 (±0,01)
712	15.6 (±0,25)	0.07 (±0,001)	3.45 (±0,07)
840	16.3 (±0,4)	0.073 (±0,0018)	3.46 (±0,11)
900	16 (±0,7)	0.071 (±0,003)	3.42 (±0,04)

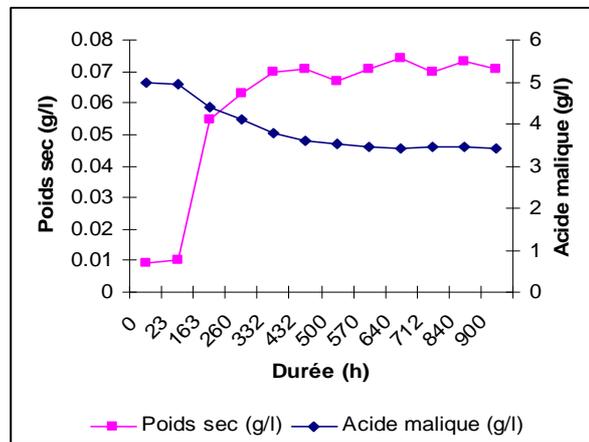


Fig. a-1 Evolution de la biomasse de la souche X et de sa consommation d'acide malique dans le milieu préfermenté par la souche C et chauffé à 100°C pendant 30 minutes.

**Tableau a-2. Suivi cinétique de la FML réalisée par *O. oeni* souche X dans le milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche C et autoclavé (120°C/20 minutes).**

Durée (h)	Concentration cellulaire (cellules/mL) x 10 <sup>6</sup>	Poids sec (g/L)	Acide malique (g/L)
0	3,98 (±0,24)	0,018 (±0,001)	5 (±0,06)
23	5 (±0,12)	0,023 (±0,0006)	4,95 (±0,11)
163	15,6 (±0,07)	0,07 (±0,0003)	4,43 (±0,03)
260	19 (±0,35)	0,085 (±0,0016)	4 (±0,025)
332	24,4 (±0,42)	0,11 (±0,002)	3,8 (±0,027)
432	23,3 (±0)	0,105 (±0)	3,4 (±0,1)
500	24 (±0,7)	0,108 (±0,0032)	3,1 (±0,06)
570	24,3 (±0,9)	0,11 (±0,004)	2,8 (±0,11)
640	24,5 (±0,14)	0,11 (±0,00063)	2,86 (±0,14)
712	24,7 (±0,43)	0,11 (±0,002)	2,82 (±0,08)
840	23 (±0,64)	0,103 (±0,003)	2,76 (±0,08)
900	22,7 (±0,7)	0,1 (±0,003)	2,82 (±0,1)

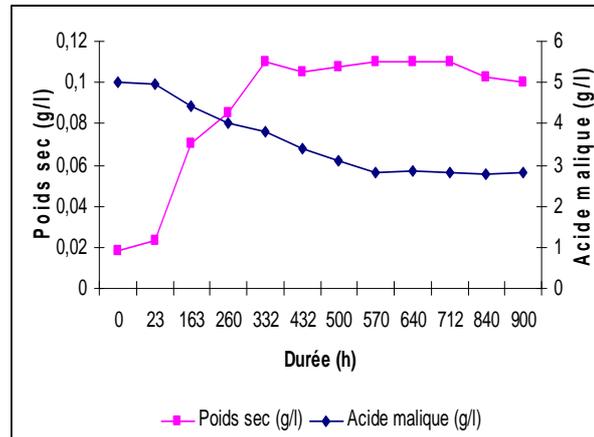


Fig. a-2 Evolution de la biomasse de la souche X et de sa consommation d'acide malique dans le milieu préfermenté par la souche C et autoclavé.

**b- Traitement enzymatique du milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche C.**

**Tableau b. Suivi cinétique de la FML réalisée par *O. oeni* souche X dans le milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche C et traité à la pepsine.**

Durée (h)	Concentration cellulaire (cellules/mL) x 10 <sup>6</sup>	Poids sec (g/L)	Acide malique (g/L)
0	3,98 (±0,4)	0,018 (±0,002)	4,73 (±0,027)
23	7,26 (±0,21)	0,033 (±0,001)	4,53 (±0,12)
163	33 (±0,35)	0,15 (±0,0016)	3,47 (±0,027)
260	49,1 (±2,26)	0,22 (±0,01)	2,59 (±0,025)
332	48,13 (±1,24)	0,22 (±0,006)	2,3 (±0,021)
432	49 (±0,8)	0,22 (±0,004)	1,86 (±0,006)
500	49,7 (±1,6)	0,22 (±0,007)	1,5 (±0,02)
570	50 (±0,76)	0,23 (±0,0035)	1,3 (±0,06)
640	49,6 (±1,2)	0,22 (±0,005)	0,9 (±0,004)
712	50,4 (±1,6)	0,23 (±0,007)	0,6 (±0)
840	49,4 (±0,7)	0,22 (±0,003)	0,25 (±0,02)
910	49,7 (±1,1)	0,22 (±0,005)	0,12 (±0,007)
980	50,7 (±1,4)	0,23 (±0,0064)	0 (±0)

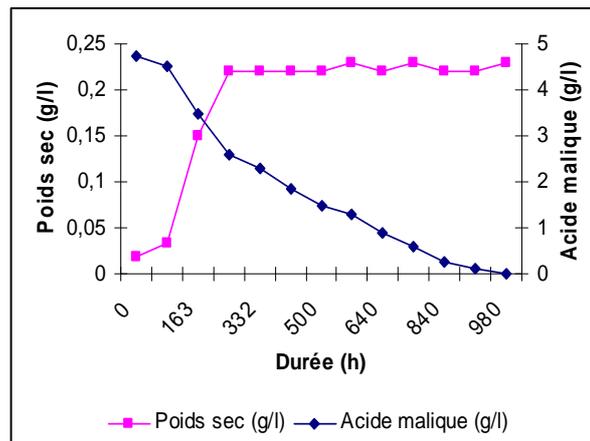


Fig. b Evolution de la biomasse de la souche X et de sa consommation d'acide malique dans le milieu préfermenté par la souche C et traité à la pepsine.

**Annexes de la partie III-2-2 : Fractionnement du milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche C par ultrafiltration et dialyse.**

**a- Milieu MRS contenant la fraction peptidique du milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche C comprise entre 3,5 et 5 KDa.**

**Tableau a. Suivi cinétique de la FML réalisée par *O. oeni* souche X en présence de la fraction peptidique du milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche C comprise entre 3,5 et 5 KDa.**

Durée (h)	Concentration cellulaire (cellules/mL) x 10 <sup>6</sup>	Poids sec (g/L)	Acide malique (g/L)
0	2,07 (±0,13)	0,0093 (±0,0006)	4,07 (±0,03)
18	2,86 (±0,22)	0,013 (±0,001)	4,07 (±0,03)
114	35 (±0,57)	0,16 (±0,0026)	3,54 (±0,07)
260	1040 (±16,4)	4,68 (±0,074)	0,92 (±0,08)
360	1485 (±22)	6,68 (±0,1)	0 (±0)

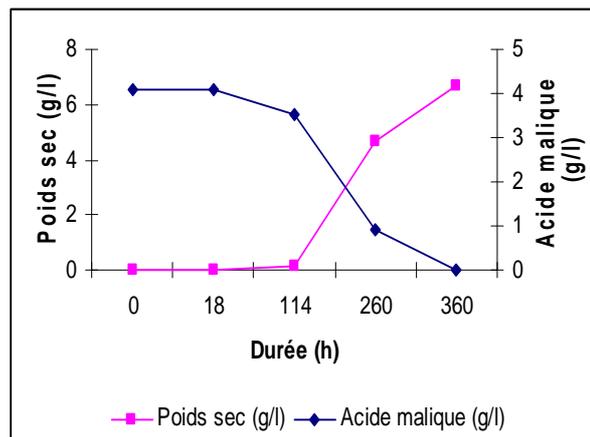


Fig. a Evolution de la biomasse de la souche X et de sa consommation d'acide malique en présence de la fraction peptidique du milieu préfermenté par la souche C comprise entre 3,5 et 5 KDa.

**b- Milieu MRS contenant la fraction peptidique du milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche C supérieure à 5 KDa.**

**Tableau b. Suivi cinétique de la FML réalisée par *O. oeni* souche X en présence de la fraction peptidique du milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche C supérieure à 5 KDa.**

Durée (h)	Concentration cellulaire (cellules/mL) x 10 <sup>6</sup>	Poids sec (g/L)	Acide malique (g/L)
0	2,93 (±0,16)	0,013 (±0,0007)	4,07
18	3,73 (±0,05)	0,017 (±0,0003)	4,07
114	19,45 (±1,2)	0,088 (±0,005)	4,03
260	28,41 (±2,7)	0,13 (±0,012)	3,9
450	410 (±8,6)	1,85 (±0,04)	2,9
618	510 (±7,5)	2,3 (±0,034)	1,45
740	600 (±15)	2,7 (±0,07)	0

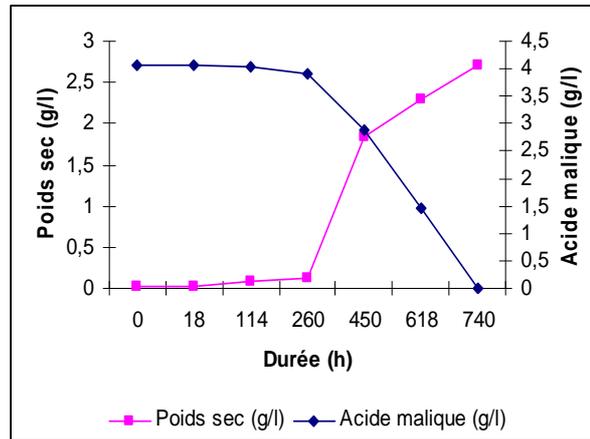


Fig. b Evolution de la biomasse de la souche X et de sa consommation d'acide malique en présence de la fraction peptidique du milieu préfermenté par la souche C supérieure à 5 KDa.

c- Milieu MRS contenant la fraction peptidique du milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche C supérieure à 10 KDa.

Tableau c. Suivi cinétique de la FML réalisée par *O. oeni* souche X en présence de la fraction peptidique du milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche C supérieure à 10 KDa.

Durée (h)	Concentration cellulaire (cellules/mL) x 10 <sup>6</sup>	Poids sec (g/L)	Acide malique (g/L)
0	2,85 (±0,16)	0,013 (±0,0007)	4,04 (±0,02)
18	5,55 (±0,11)	0,025 (±0,0005)	4 (±0)
114	36 (±0,74)	0,16 (±0,0033)	3,8 (±0,12)
260	1087 (±12,7)	4,9 (±0,06)	0,96 (±0,08)
360	1190 (±20)	5,36 (±0,09)	0 (±0)

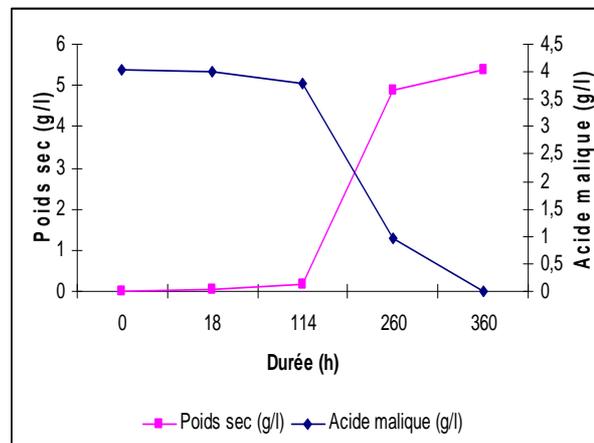


Fig. c Evolution de la biomasse de la souche X et de sa consommation d'acide malique en présence de la fraction peptidique du milieu préfermenté par la souche C supérieure à 10 KDa.

*Partie IV. Etude d'une nouvelle stratégie d'inoculation : cultures mixtes, et comparaison avec la stratégie classique de cultures séquentielles.*



#### **Partie IV. Etude d'une nouvelle stratégie d'inoculation : cultures mixtes, et comparaison avec la stratégie classique de cultures séquentielles.**

Dans la partie II de ce chapitre, différents couples *S. cerevisiae/O. oeni* ont été étudiés en appliquant la stratégie classique de cultures séquentielles. *O. oeni* souche X a été testée avec *S. cerevisiae* souches A, B, C et D et a été plus ou moins inhibée suivant la souche de levure choisie. Par contre *O. oeni* souche Y qui a été testée avec *S. cerevisiae* souches B, C et D, a été plus résistante aux conditions inhibitrices et même stimulée par les milieux préfermentés par les souches B et C. Ces résultats nous montrent que la réalisation de la FML dépend fortement du choix des souches de levure et de bactérie dans un couple. Parmi les quatre souches de levure testées avec *O. oeni* souche X, *S. cerevisiae* souches C et D ont été les plus inhibitrices. Dans cette partie de notre étude, nous avons décidé d'étudier à nouveau les couples *S. cerevisiae* souche C/*O. oeni* souche X et *S. cerevisiae* souche D/*O. oeni* souche X en testant cette fois une nouvelle stratégie d'inoculation qui est la culture mixte dans le but d'évaluer son effet sur la réalisation de la FML. La comparaison des résultats de la FML obtenus pour un même couple lors de sa culture mixte et de sa culture séquentielle nous permettra de déduire laquelle des deux stratégies est la plus avantageuse en termes de croissance bactérienne et de démalication. Contrairement aux cultures séquentielles pendant lesquelles la FML est démarrée après achèvement de la FA, ces deux fermentations sont déclenchées en même temps lors d'une culture mixte par inoculation simultanée des levures et des bactéries dans un bioréacteur à membrane (BRM) (cf partie II-2-1-2 du chapitre II de ce manuscrit). Nous rappelons que dans la partie I-2-3 de ce chapitre, 3 gaz ont été testés sur des cultures pures d'*O. oeni* souche X en BRM (air, CO<sub>2</sub> et azote) dans le but de choisir le gaz le plus convenable à la réalisation de la FML dans des conditions proches de celles rencontrées pendant le procédé naturel de vinification. Suite aux résultats obtenus, l'azote a été retenu pour la réalisation des cultures mixtes. Notons qu'un bullage d'air de 30 minutes par jour a été réalisé les 3 premiers jours de toutes les cultures mixtes sous azote dans le réservoir contenant les levures avec un débit d'air de 1,8 vvm (volume d'air/volume de liquide/minute), étape qui rappelle la pratique de remontage utilisée pendant le processus de vinification et qui vise entre autres à oxygéner les levures pour améliorer la teneur en acides gras insaturés et la biomasse formée.

Dans ce qui suit nous présenterons en premier lieu les résultats obtenus pendant la culture mixte du couple *S. cerevisiae* souche D/*O. oeni* souche X dans le BRM sous air et sous azote dans le but de souligner encore une fois l'importance du gaz choisi sur la réalisation de la FML et d'étudier aussi son effet sur le déroulement de la FA. Ensuite nous étudierons le couple *S. cerevisiae* souche C/*O. oeni* souche X en culture mixte dans le BRM sous azote en séparant dans un premier temps les deux micro-organismes (levures dans le réservoir avec membrane et bactéries dans l'autre) puis en les

mélangeant dans chacun des deux réservoirs dans le but de voir si un contact direct entre les cellules des deux populations de micro-organismes induirait une inhibition de la croissance et de l'activité métabolique de l'une ou l'autre des deux populations. Pour chacun des deux couples, nous comparerons les résultats de la FML obtenus en culture mixte à ceux obtenus pendant la culture séquentielle correspondante dans le but d'évaluer l'importance de la stratégie d'inoculation choisie. Notons que toutes les cultures mixtes ont été réalisées dans le milieu synthétique jus de raisin en BRM et ont été suivies jusqu'à l'arrêt de consommation de l'acide malique.

#### IV-1. Cultures mixtes réalisées avec le couple *S. cerevisiae* souche D/*O. oeni* souche X dans le milieu synthétique jus de raisin en BRM.

##### IV-1-1. Comparaison des résultats des FML et des FA obtenus pendant les cultures mixtes du couple *S. cerevisiae* souche D/*O. oeni* souche X sous air et sous azote.

###### a- Fermentation malolactique (FML)

#### Résultats

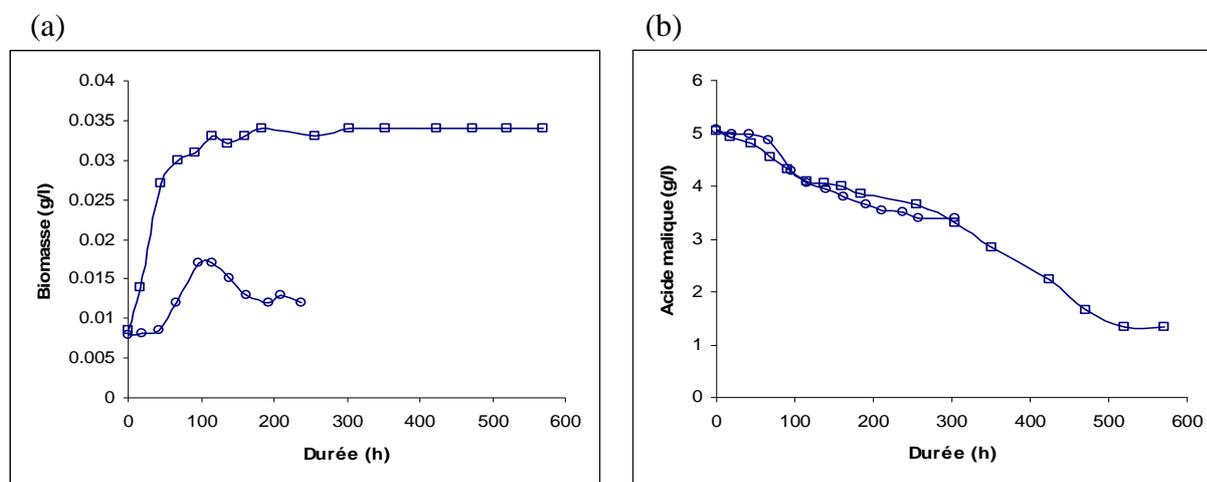


Fig. IV-1 Evolution de la biomasse d'*O. oeni* souche X (a) et de sa consommation d'acide malique (b) au cours des cultures mixtes avec *S. cerevisiae* souche D dans le BRM sous air et sous azote. (□) azote, (○) air.

**Tableau IV-1. Paramètres cinétiques des FML menées par *O. oeni* souche X pendant les cultures mixtes avec *S. cerevisiae* souche D dans le BRM sous air et sous azote.**

	Azote	Air
Biomasse initiale (g/L)	0,009	0,008
Biomasse maximale (g/L)	0,034	0,017
Productivité (g/L/h)	$2,07 \times 10^{-4}$	$1,51 \times 10^{-4}$
Acide malique initial (g/L)	5,03	5,07
Acide malique final (g/L)	1,34	3,4
Vitesse globale de démalication (g/L/h)	$7,1 \times 10^{-3}$	$6,5 \times 10^{-3}$
Vitesse spécifique moyenne de démalication (g/g/h)	$209 \times 10^{-3}$	$542 \times 10^{-3}$
Durée de la FML (h)	520	257

## Discussion

La figure IV-1 et le tableau IV-1 nous montrent une nette amélioration de la croissance cellulaire d'*O. oeni* souche X et de sa consommation d'acide malique quand on utilise l'azote à la place de l'air. En effet, l'utilisation de l'azote a augmenté de deux fois la biomasse maximale formée et de 1,4 fois la productivité. Le profil de croissance sous air montre une courte phase de latence de 43 heures non observée sous azote, suivie d'une courte phase de croissance de 53 heures. Ensuite nous distinguons le début d'une phase de déclin qui commence à 116 heures et pendant laquelle la démalication se poursuit. En effet, à son début il restait encore dans le milieu 4,06 g/L d'acide malique mais la démalication va continuer et va finalement durer 257 heures et s'arrêter en laissant dans le milieu 3,4 g/L d'acide malique. Par contre, sous azote on n'observe pas de phase de déclin. La phase de croissance est suivie d'une phase stationnaire qui est maintenue tout au long de la démalication qui a duré 520 heures et s'est arrêtée en laissant dans le milieu 1,34 g/L d'acide malique. Nous remarquons que les vitesses globales de démalication étaient très proches sous air et sous azote et que les profils de démalication étaient semblables jusqu'à 300 heures. A partir de ce moment, la démalication sous air s'est arrêtée alors que celle sous azote s'est poursuivie. Ces résultats soulignent l'importance du gaz choisi et rejoignent ceux obtenus avec les cultures pures d'*O. oeni* souche X sous air et sous azote et qui avaient montré que l'utilisation de l'azote était avantageuse (cf partie I-2-3 de ce chapitre). Nous rappelons qu'*O. oeni* est une bactérie anaérobie facultative qui se développe mieux en l'absence d'oxygène. L'utilisation de l'azote a assuré des conditions anaérobies et un environnement plus proche de celui qu'on retrouve pendant le processus naturel de vinification au cours duquel le milieu est rapidement saturé en CO<sub>2</sub>.

Malgré l'amélioration de la croissance bactérienne et de la démalication sous azote, l'acide malique n'a pas été complètement consommé. Nous rappelons que le milieu fermenté par *S. cerevisiae* souche D s'est révélé fortement inhibiteur vis-à-vis d'*O. oeni* souche X (cf partie II-1-3 de ce chapitre) et que cette souche de levure produit un peptide inhibiteur dont l'élimination par

traitements enzymatique et thermique entraîne une consommation complète de l'acide malique (cf partie III-1 de ce chapitre). Nous détaillerons plus tard dans cette partie l'importance de cette culture mixte sous azote et ses avantages par rapport à la culture séquentielle réalisée avec ce même couple.

## b-Fermentation alcoolique (FA)

### Résultats

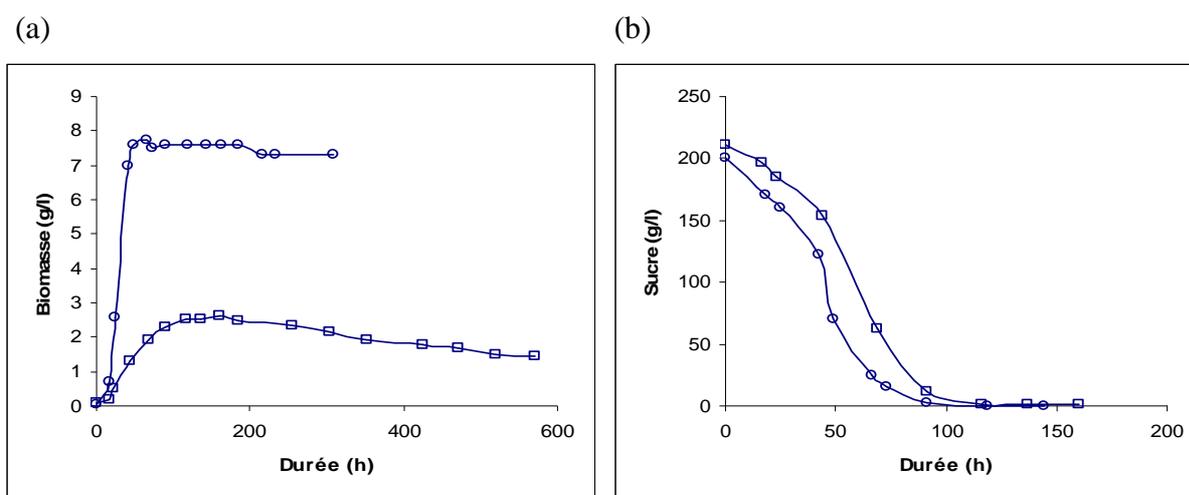


Fig. IV-2 Evolution de la biomasse de *S. cerevisiae* souche D (a) et de sa consommation de sucre (b) au cours de la culture mixte avec *O. oeni* souche X dans le BRM sous air et sous azote. (□) azote, (○) air.

**Tableau IV-2. Paramètres cinétiques des FA menées par *S. cerevisiae* souche D pendant les cultures mixtes avec *O. oeni* souche X dans le BRM sous air et sous azote.**

	Air	Azote
Biomasse initiale (g/L)	0,063	0,08
Biomasse maximale (g/L)	7,6	2,61
Productivité (g/L/h)	$154 \times 10^{-3}$	$21 \times 10^{-3}$
Sucre initial (g/L)	200	211
Sucre final (g/L)	0,6	1,2
Vitesse globale de consommation du sucre (g/L/h)	1,7	1,53
Durée de la FA (h)	119	137

### Discussion

Alors que l'utilisation de l'azote a été avantageuse pour la croissance cellulaire et la démalication chez *O. oeni* souche X, elle a considérablement réduit la biomasse de levure formée malgré le

bullage réalisé mais n'a que peu affecté la consommation du sucre. La biomasse formée et la productivité ont été 2,9 et 7,3 fois plus élevées sous air que sous azote (cf tableau IV-2). La formation de biomasse chez les levures a été suivie jusqu'à l'arrêt de consommation de l'acide malique qui correspond au critère principal utilisé au cours des cultures séquentielles et mixtes et qui détermine la fin de ces cultures. Ceci nous a menés à l'observation d'un début de déclin chez les levures après 160 heures du début de la culture mixte sous azote qui s'est poursuivi jusqu'à l'arrêt de cette culture et qui était accompagné d'une diminution du pourcentage de viabilité jusqu'à 15 % (cf tableau b-2 de l'annexe de la partie IV-1). Par contre, sous air la phase stationnaire a été maintenue jusqu'à l'arrêt de la culture mixte et le taux de viabilité est resté élevé (70%) (cf tableau a-2 de l'annexe de la partie IV-1). La plus grande biomasse formée sous air s'explique par une activation du cycle de Krebs et de la chaîne respiratoire. La respiration d'une même quantité de sucre produit 18 à 19 fois plus d'énergie (molécules d'ATP) que la fermentation, biologiquement utilisable, d'où la production d'une plus grande quantité de biomasse.

Concernant la consommation du sucre, les vitesses globales de consommation étaient très proches avec une valeur légèrement plus élevée sous air que sous azote (cf tableau IV-2) et le sucre a été presque entièrement consommé dans les deux cas.

Finalement, les conditions de co-culture sous azote avec apport ponctuel d'air ont été retenues car elles se rapprochent le plus des conditions réelles de vinification.

Notons que le couple *S. cerevisiae* souche A/O. *oeni* souche X a été aussi étudié en culture mixte dans le BRM mais uniquement sous air. Seule l'évolution de la consommation du sucre et de l'acide malique a été suivie au cours de cette culture. Les résultats sont rapportés dans la partie c de l'annexe de la partie IV-1. Les 5,04 g/L d'acide malique ont été complètement consommés en 18 jours. Nous rappelons qu'avec ce couple, la démalication a été également complète pendant la culture séquentielle. L'avantage de la culture mixte a été d'avoir accélérer la vitesse de démalication de 1,9 fois.

#### **IV-1-2 Etude du comportement de *S. cerevisiae* souche D et d'*O. oeni* souche X pendant leur culture mixte dans le BRM sous azote**

Dans ce qui suit nous étudierons dans un premier temps le comportement de *S. cerevisiae* souche D pendant sa culture mixte avec *O. oeni* souche X et ceci en le comparant à sa culture pure dans le BRM réalisée dans les mêmes conditions (azote et bullage ponctuel d'air). Ceci nous aidera à voir si la présence de la bactérie pendant la culture mixte affecte le déroulement de la FA. Ensuite nous

comparerons les résultats de la FML menée par *O. oeni* souche X pendant sa culture mixte avec *S. cerevisiae* souche D à ceux obtenus pendant sa culture pure dans le BRM sous azote. Ceci nous permettra d'évaluer l'effet inhibiteur de *S. cerevisiae* souche D sur la croissance cellulaire d'*O. oeni* souche X et sa démalication. Ces résultats seront aussi comparés à ceux obtenus pendant sa culture séquentielle réalisée dans le milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche D ce qui nous permettra d'évaluer l'importance de la stratégie d'inoculation choisie sur la réalisation de la FML.

#### IV-1-2-1 Comparaison des résultats de la FA menée par *S. cerevisiae* souche D pendant sa culture pure et sa culture mixte avec *O. oeni* souche X dans le BRM sous azote.

##### a- Etude cinétique

##### Résultats

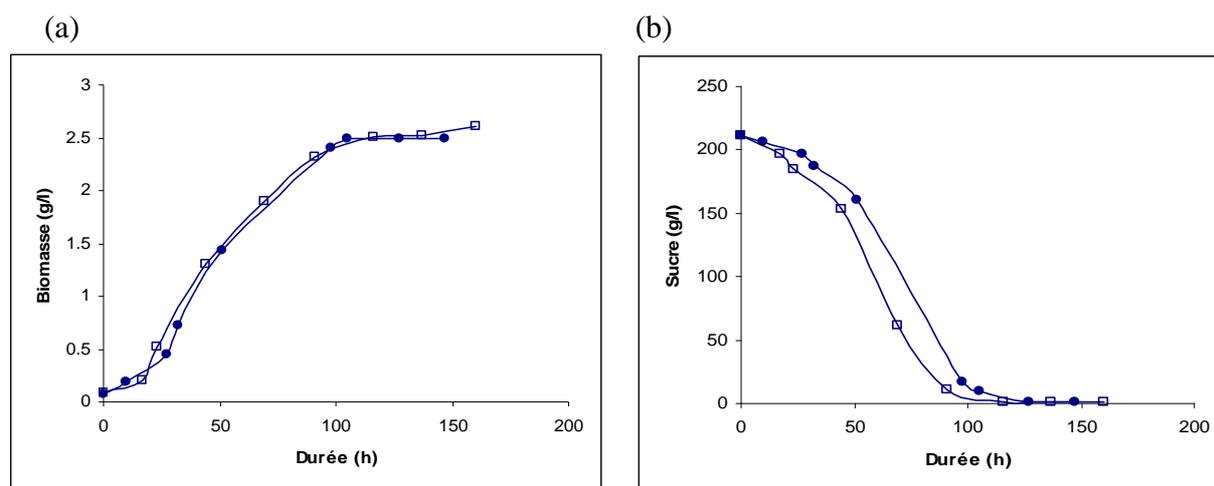


Fig. IV-3 Evolution de la biomasse de *S. cerevisiae* souche D (a) et de sa consommation de sucre (b) pendant sa culture pure et sa culture mixte avec *O. oeni* souche X dans le BRM sous azote. (●) culture pure, (□) culture mixte.

##### Discussion

Nous constatons d'après la figure IV-3 que les profils cinétiques de croissance et de consommation de sucre chez *S. cerevisiae* souche D sont identiques pendant sa culture pure et sa culture mixte en présence d'*O. oeni* souche X. Nous pouvons donc conclure que *S. cerevisiae* souche D n'est pas du tout affectée par la présence de la bactérie au cours de leur culture mixte.

## b- Etude biochimique

Le tableau IV-3 suivant présente certains paramètres biochimiques mesurés à la fin de la culture mixte de *S. cerevisiae* souche D/*O. oeni* souche X et à la fin de la culture pure de *S. cerevisiae* souche D.

### Résultats

**Tableau IV-3. Quelques paramètres biochimiques des milieux fermentés à la fin de la culture mixte de *S. cerevisiae* souche D/*O. oeni* souche X et de la culture pure de *S. cerevisiae* souche D dans le BRM sous azote.**

	Culture mixte de <i>S. cerevisiae</i> souche D/ <i>O.</i> <i>oeni</i> souche X	Culture pure de <i>S. cerevisiae</i> souche D
Sucre consommé (g/L)	210	210
Ethanol produit (g/L)	86	86
Glycérol produit (g/L)	6	6
Acide acétique produit (g/L)	0,97	0,96
Azote alpha-aminé initial (mg/L)	67,8	72,6
Azote alpha-aminé consommé (mg/L)	58,1	61,6
Azote ammoniacal initial (mg/L)	466	436,3
Azote ammoniacal consommé (mg/L)	330,5	330

### Discussion

Le tableau IV-3 nous montre que le profil biochimique du milieu synthétique jus de raisin fermenté par *S. cerevisiae* souche D à la fin de sa culture pure dans le BRM sous azote est presque identique à celui obtenu à la fin de la culture mixte de cette souche de levure avec *O. oeni* souche X. Ceci nous confirme encore une fois que le métabolisme de la levure n'est pas affecté par la présence de la bactérie. Notons que l'évolution de la consommation de l'azote alpha-aminé et de l'azote ammoniacal se trouvent dans les tableaux b-3 et b-4 de l'annexe de la partie IV-1 pour la culture mixte et dans les tableaux d-2 et d-3 de l'annexe de la partie IV-1 pour la culture pure.

**IV-1-2-2 Comparaison des résultats de la FML menée par *O. oeni* souche X pendant sa culture mixte avec *S. cerevisiae* souche D à ceux obtenus pendant sa culture pure dans le BRM sous azote et pendant sa culture séquentielle dans le milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche D.**

Dans cette partie nous allons évaluer l'importance de la stratégie d'inoculation choisie sur l'amélioration du rendement de la FML et ceci en comparant les résultats de la FML menée par *O.*

*oeni* souche X pendant les cultures mixte et séquentielle réalisées avec *S. cerevisiae* souche D. On évaluera également l'inhibition exercée par *S. cerevisiae* souche D sur *O. oeni* souche X au cours de la culture mixte en utilisant comme témoin, la culture pure d'*O. oeni* souche X dans le BRM sous azote.

### a- Etude cinétique

### Résultats

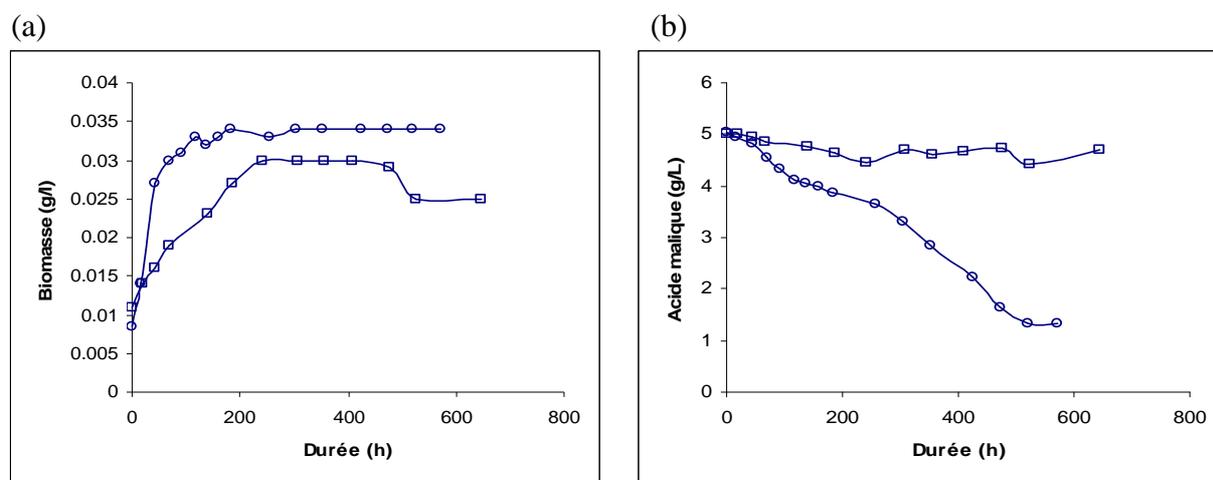


Fig. IV-4 Evolution de la biomasse d'*O. oeni* souche X (a) et de sa consommation d'acide malique (b) au cours de la culture mixte avec *S. cerevisiae* souche D et la culture séquentielle réalisée dans le milieu préfermenté par cette même souche de levure. (○) culture mixte, (□) culture séquentielle.

**Tableau IV-4. Paramètres cinétiques de la FML menée par *O. oeni* souche X pendant ses cultures mixte et séquentielle avec *S. cerevisiae* souche D et pendant sa culture pure dans le BRM sous azote (témoin).**

	Témoin	Culture mixte de <i>S. cerevisiae</i> souche D/ <i>O. oeni</i> souche X, phase FML	Culture séquentielle de <i>S. cerevisiae</i> souche D/ <i>O. oeni</i> souche X, phase FML
Biomasse initiale (g/L)	0,01	0,009	0,011
Biomasse maximale (g/L)	0,9	0,034	0,03
Productivité (g/L/h)	$33,6 \times 10^{-4}$	$2,07 \times 10^{-4}$	$0,8 \times 10^{-4}$
Acide malique initial (g/L)	4,95	5,03	5
Acide malique final (g/L)	0	1,34	4,63
Vitesse globale de démalication (g/L/h)	$17,5 \times 10^{-3}$	$7,1 \times 10^{-3}$	$2 \times 10^{-3}$
Vitesse spécifique moyenne de démalication (g/g/h)	$19,4 \times 10^{-3}$	$209 \times 10^{-3}$	$74 \times 10^{-3}$
Durée de la FML (h)	283	520	187

## Discussion

La figure IV-4 nous montre une nette amélioration de la croissance bactérienne et surtout de la démalication quand la culture mixte est appliquée. En effet la productivité pendant la culture mixte est 2,6 fois plus importante que celle obtenue pendant la culture séquentielle (cf tableau IV-4). Cependant les biomasses maximales formées sont très proches. De plus, la démalication est 3,55 fois plus rapide mais malgré cette amélioration, l'acide malique n'est pas complètement consommé. La vitesse spécifique de démalication est 2,82 fois plus élevée pendant la culture mixte ce qui montre que les bactéries se trouvent dans des conditions plus favorables à leur activité métabolique. Ces résultats nous montrent que pour le couple levure/bactérie en question, la stratégie de co-culture est avantageuse puisqu'elle permet la consommation d'une plus grande quantité d'acide malique (3,69 g/L contre 0,37 g/L pendant la culture séquentielle) en un temps relativement court (520 heures soit 22 jours). Ceci s'explique par la présence des bactéries dès le début avec les levures dans un milieu riche en nutriments (milieu synthétique jus de raisin) et ne contenant pas les métabolites levuriens inhibiteurs. Ces derniers sont au contraire déjà présents dans le milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche D lorsqu'il est utilisé pour la culture séquentielle. Certains de ces métabolites ont été mesurés comme l'éthanol, le SO<sub>2</sub> et les acides gras (cf tableau I-2 de la partie I de ce chapitre). De plus le contenu en nutriments du milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche D était réduit, notamment la quantité d'azote alpha-aminé, substrat indispensable à la bactérie (cf tableau I-2 de la partie I de ce chapitre). On a également identifié la synthèse par cette souche de levure d'un peptide de poids moléculaire compris entre 5 et 10 KDa dont la présence inhibe fortement la croissance bactérienne d'*O. oeni* souche X et sa démalication pendant la culture séquentielle. Par contre, sa dénaturation par traitements enzymatique et thermique entraîne une amélioration de la croissance bactérienne et permet l'achèvement de la démalication (cf partie III-1 de ce chapitre). Pour mieux comprendre le meilleur résultat de la FML obtenu avec la culture mixte de ces mêmes micro-organismes, et prenant en considération que la présence de ce peptide semble affecter considérablement l'accomplissement de la démalication pendant la culture séquentielle, on peut supposer que ce dernier n'était pas suffisamment accumulé dans le milieu au début de la culture mixte. En effet on peut penser que sa concentration a augmenté progressivement au cours de la FA (la FA a duré 137 heures pendant la culture mixte). A la fin de la FA, vu que les bactéries s'étaient développées (0,034 g/L formée ou  $7,5 \times 10^6$  cellules/mL) et avaient déjà entamé la démalication (1 g/L déjà consommé) on peut supposer que la quantité de ce peptide n'était pas assez suffisante pour exercer une inhibition aussi importante que celle observée pendant la culture séquentielle pour laquelle on avait au départ 0,011 g/L de bactéries soit  $2,4 \times 10^6$  cellules/mL.

Malgré les avantages de la culture mixte, nous remarquons que l'inhibition de la croissance bactérienne et de la démalication reste importante si nous les comparons à la culture pure d'*O. oeni* souche X dans le BRM (témoin). En effet, la biomasse bactérienne formée et la productivité sont 26,5 et 16,2 fois inférieures à celles du témoin. De plus la démalication est incomplète et 2,5 fois plus lente que celle du témoin (cf tableau IV-4). Ceci s'explique par l'apparition progressive dans le milieu des métabolites inhibiteurs synthétisés par *S. cerevisiae* souche D.

Nous avons aussi montré dans la partie I-2-3 de ce chapitre qu'*O. oeni* souche X a consommé uniquement 10,7 mg/L d'azote alpha-aminé pendant les premières 48 heures de sa culture pure dans le BRM sous azote et a pu consommer entièrement les 4,95 g/L d'acide malique initialement présents dans le milieu en formant une biomasse de 0,9 g/L et ceci en 12 jours. Par conséquent on peut supposer que les besoins en azote alpha-aminé de la bactérie étaient couverts au début de la culture mixte (cf tableau IV-3). Cependant, 48 heures après le début de la culture mixte, les levures étaient au milieu de leur phase active de croissance (cf figure IV-3) tandis que les bactéries avaient atteint la fin de cette phase (cf figure IV-4) alors qu'il restait encore dans le milieu 11 mg/L d'azote alpha-aminé (cf tableau b-3 de l'annexe de la partie IV-1). Ces résultats nous montrent que l'incapacité des bactéries à consommer les 10,7 mg/L d'azote alpha-aminé nécessaires pour leur croissance et leur activité optimales n'était pas due à un manque de nutriments mais plutôt à une apparition progressive des métabolites levuriens inhibiteurs qui les ont empêchées de profiter de ces nutriments.

Finalement, malgré l'inhibition observée par comparaison au témoin, on peut conclure que pour le couple *S. cerevisiae* souche D/*O. oeni* souche X, la culture mixte reste la stratégie d'inoculation la plus avantageuse puisqu'elle assure une amélioration de la FML.

## **b- Etude biochimique**

Malgré les avantages que peut présenter la culture mixte, cette stratégie n'a pas encore été adoptée par les viticulteurs et ceci pour éviter tout risque d'acidification du vin pouvant résulter d'une consommation importante de sucre par *O. oeni* entraînant ainsi une production élevée d'acide D-Lactique et d'acide acétique. De plus, nous avons déjà présenté la quantité d'acide L-malique consommée au cours de la culture mixte (3,69 g/L) mais nous n'avons pas déterminé la quantité consommée par la bactérie et celle consommée par la levure. Pour expliciter ces deux points, nous présenterons dans le tableau IV-5 suivant les concentrations de sucre et d'acide L-malique consommés ainsi que les concentrations des acides L-Lactique, D-Lactique et acétique produits,

mesurées à la fin de la culture mixte de *S. cerevisiae* souche D/*O. oeni* souche X et à la fin des cultures pures de ces souches dans le BRM sous azote.

## Résultats

**Tableau IV-5. Composition du milieu à la fin de la culture mixte de *S. cerevisiae* souche D/*O. oeni* souche X et à la fin des cultures pures de ces souches dans le BRM sous azote, en sucre et en acides L-malique, L-Lactique, D-Lactique et acétique.**

	Culture mixte de <i>S. cerevisiae</i> souche D/ <i>O. oeni</i> souche X	Culture pure d' <i>O. oeni</i> souche X	Culture pure de <i>S. cerevisiae</i> souche D
Sucre consommé (mM)	1167	67	1167
Acide L-malique consommé (mM)	27,5	37	2,54
Acide L-lactique produit (mM)	25	37	-
Acide acétique produit (mM)	16,2	1,5	16
Acide D-lactique produit (mM)	6	21	-

## Discussion

D'après le tableau IV-5, nous remarquons que les quantités d'acide acétique et d'acide D-Lactique produites au cours de la culture mixte de *S. cerevisiae* souche D/*O. oeni* souche X sont faibles et acceptables par rapport aux critères œnologiques et organoleptiques. L'acide acétique produit dans ce cas, constitue principalement un métabolite secondaire de la FA puisqu'on a retrouvé pratiquement les mêmes concentrations pendant la culture mixte et la culture pure de *S. cerevisiae* souche D (16 mM ou 0,97 g/L). Ces résultats rejoignent les travaux de Beelman et Kunkee (1985), qui avaient constaté que dans le cas de certains couples levure-bactérie, lorsque la FML et la FA sont menées simultanément, la production d'acide acétique par la bactérie est faible et même inexistante. De plus, nous rappelons que le métabolisme du glucose par *O. oeni* se fait suivant la voie hétérofermentaire des pentoses phosphates et que dans ce cas, une mole de glucose consommée entraîne la formation d'une mole de D-Lactate. Pendant la culture mixte, nous avons détecté la formation de 6 mM de D-Lactate (0,53 g/L) qui correspondent donc à la consommation de 6 mM de glucose par la bactérie, soit 1,08 g/L. Nous pouvons donc conclure que la quantité de sucre consommée par cette souche est faible et par la suite exclure tout risque d'acidification pendant les cultures mixtes, du moins quand *O. oeni* souche X est employée. D'ailleurs les concentrations de sucre consommées au cours de la culture mixte et de la culture pure de *S. cerevisiae* souche D, nous montrent que le sucre a été principalement consommé par la levure. De plus, nous avons déjà constaté au niveau des différentes cultures pures d'*O. oeni* souche X que les quantités de sucre consommées ainsi que les quantités d'acide acétique et d'acide D-Lactique

produites étaient toujours faibles malgré la présence d'une concentration initiale de sucre de 200 g/L (cf partie I-2 de ce chapitre) comme dans le cas de la culture pure de cette souche dans le BRM sous azote représentée dans le tableau IV-5.

Concernant la consommation d'acide malique, la concentration de L-Lactate mesurée à la fin de la culture mixte nous permet de déduire que la démalication a été principalement réalisée par *O. oeni* et qu'une faible quantité a été consommée par les levures. Nous rappelons que la décarboxylation de l'acide L-malique en acide L-Lactique par *O. oeni* se fait mole à mole (cf partie I-4-1 du chapitre I de ce manuscrit). Dans notre cas, les 27,5 mM d'acide L-malique consommé (3,69 g/L) ont donné 25 mM d'acide L-Lactique. Ceci signifie qu'*O. oeni* souche X a consommé 25 mM d'acide L-malique (3,35 g/L) et que les 2,5 mM restants (0,34 g/L) ont été consommés par *S. cerevisiae* souche D ce qui correspond effectivement à la quantité qu'elle avait consommée au cours de sa culture pure dans le BRM (tableau IV-5).

#### **IV-2. Cultures mixtes réalisées avec le couple *S. cerevisiae* souche C/*O. oeni* souche X.**

La culture mixte de *S. cerevisiae* souche C/*O. oeni* souche X a été réalisée dans le milieu synthétique jus de raisin en BRM sous azote en séparant dans un premier temps les micro-organismes comme pour la culture mixte de *S. cerevisiae* souche D/*O. oeni* souche X (levures dans le réservoir avec membrane et bactéries dans l'autre) puis en les mélangeant dans chacun des deux réservoirs tout en respectant les mêmes conditions de travail. En d'autres termes les levures ont été inoculées dans les deux réservoirs en partant d'une concentration initiale de  $3 \times 10^6$  cellules/mL dans chacun des deux et les bactéries ont elles aussi été inoculées en partant d'une concentration initiale de  $2 \times 10^6$  cellules/mL dans chaque réservoir. Le bullage d'air a été également pratiqué mais cette fois au niveau des deux réservoirs (15 minutes/réservoir) les 3 premiers jours de la culture. Le but de la culture mixte réalisée en mélangeant les deux micro-organismes était de voir si le contact direct entre les cellules des deux populations serait responsable d'une inhibition de la croissance cellulaire ou du métabolisme de l'une ou l'autre des deux populations. On s'intéresse surtout dans notre cas à une inhibition des bactéries par les levures puisque le cas inverse n'a pas été constaté jusqu'à présent dans notre étude. Un tel mécanisme reconnu également sous le nom de « cell-cell contact-mediated mechanism » a déjà été impliqué dans l'inhibition de levures non-*Saccharomyces* comme les espèces *Kluyveromyces thermotolerans* et *Torulaspora delbrueckii* par *Saccharomyces cerevisiae* en cultures mixtes (Nissen *et al.* 2003). Ce mécanisme a requis la présence de cellules viables de *Saccharomyces cerevisiae* à des concentrations cellulaires assez élevées ( $5 \times 10^7$  cellules/mL dans leurs conditions de travail). Cependant la compréhension de ce mécanisme à l'échelle moléculaire et sa relation avec la densité cellulaire restent à expliciter. Nous rappelons

également que dans notre étude nous avons déjà constaté une inhibition des bactéries par les levures due à des métabolites levuriens extracellulaires solubles dont on a identifié certains (éthanol,  $\text{SO}_2$ , acides gras et peptides) et qui sont donc capables de traverser la membrane du BRM pendant les cultures mixtes pour exercer leur effet inhibiteur. Dans ce qui suit nous verrons si en plus de ces médiateurs chimiques extracellulaires, un contact direct entre les cellules doit être pris en considération dans les causes de l'inhibition.

#### IV-2-1. Comparaison des résultats des deux cultures mixtes réalisées avec le couple *S. cerevisiae* souche C/*O. oeni* souche X avec et sans séparation des deux micro-organismes dans les deux réservoirs du BRM sous azote.

##### a- Etude cinétique

##### Résultats

##### a- Fermentation alcoolique (FA)

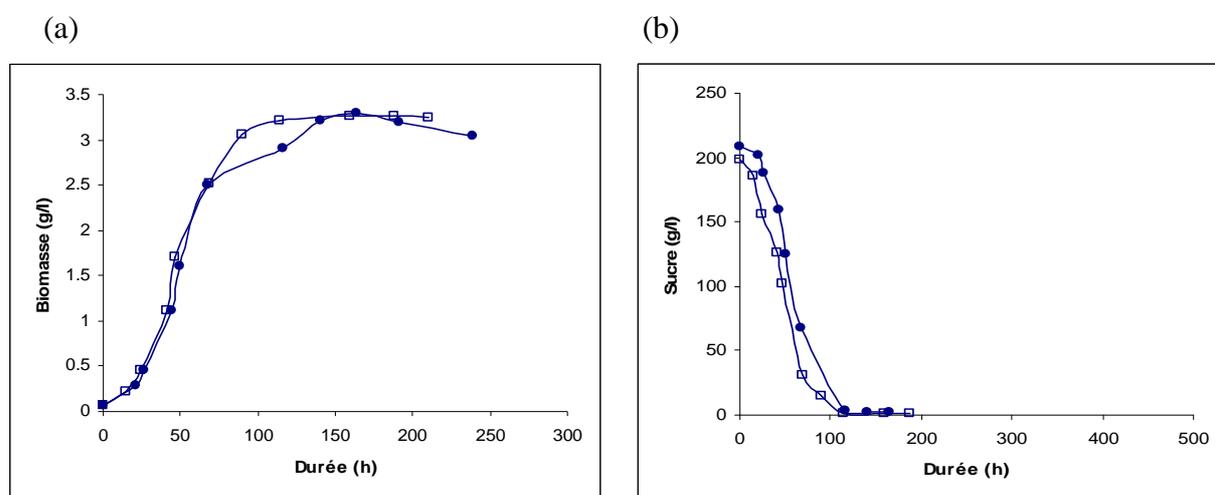


Fig. IV-5 Evolution de la biomasse de *S. cerevisiae* souche C (a) et de sa consommation de sucre (b) au cours des cultures mixtes en présence d'*O. oeni* souche X avec et sans séparation des deux micro-organismes dans les deux réservoirs du BRM. (●) micro-organismes séparés, (□) micro-organismes mélangés.

## b- Fermentation malolactique (FML)

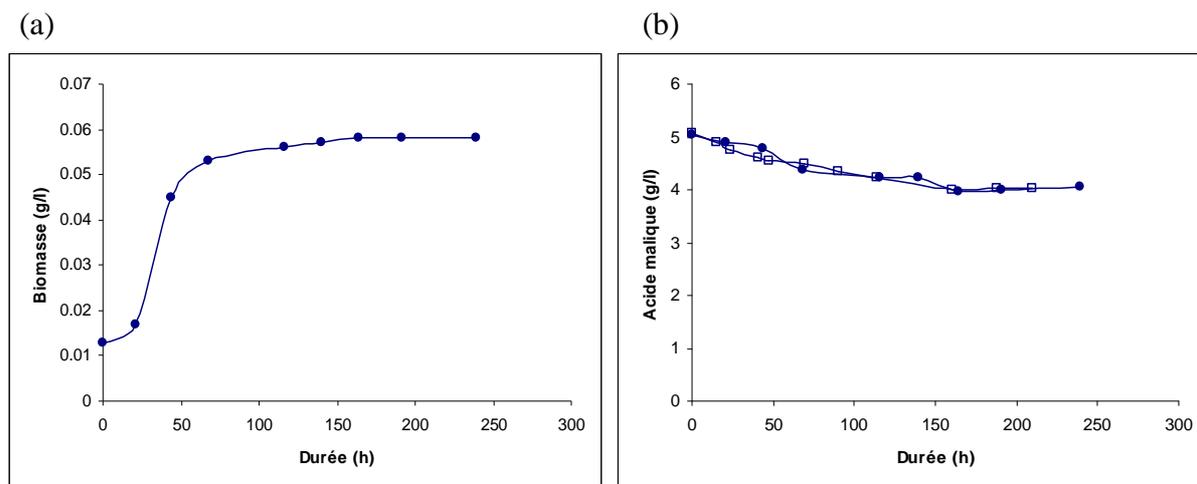


Fig. IV-6 Evolution de la biomasse d'*O. oeni* souche X (a) et de sa consommation d'acide malique (b) au cours des cultures mixtes en présence de *S. cerevisiae* souche C avec et sans séparation des deux micro-organismes dans les deux réservoirs du BRM. (●) micro-organismes séparés, (□) micro-organismes mélangés.

## Discussion

Les figures IV-5 et IV-6 nous montrent que les deux micro-organismes ont gardé les mêmes profils cinétiques de croissance cellulaire et de consommation de sucre et d'acide malique dans les deux cas. Nous rappelons que ces deux cultures mixtes ont été suivies jusqu'à l'arrêt de consommation de l'acide malique qui correspond à une consommation de 1,1 g/L dans les deux cas et qui s'est arrêtée après 164 heures. L'évolution de la biomasse bactérienne a été difficile à suivre par comptage sur le Petit Salumbeni quand les deux micro-organismes étaient mélangés. On a suivi uniquement dans ce cas la démalication. La fermentation alcoolique a été achevée en 140 heures laissant dans le milieu une concentration de sucre inférieure à 2 g/L.

Les résultats de ces deux cultures nous permettent de conclure qu'une inhibition de l'une ou de l'autre de ces deux populations par contact direct entre les cellules est à exclure. En d'autres termes le bioréacteur à membrane reste dans notre cas un outil pertinent pour l'étude des interactions entre les micro-organismes puisqu'il prend en considération tous les facteurs qui peuvent être impliqués dans ces interactions et qui se résument aux médiateurs chimiques extracellulaires solubles et à une éventuelle compétition pour les nutriments. Cependant il serait intéressant de valider ce résultat avec d'autres souches de levures et de bactéries. Par exemple Nissen *et al.* (2003) ont étudié l'effet de différentes souches de *S. cerevisiae* sur l'inhibition de la croissance cellulaire de *T. delbrueckii* en cultures mixtes et ils ont constaté qu'il y avait toujours une inhibition due à un contact cellulaire

direct quelque soit la souche de *S. cerevisiae* utilisée. Ceci veut dire que c'est une caractéristique de l'espèce en général et qu'elle n'est pas spécifique à une souche donnée. Dans notre cas ceci reste à valider.

## b- Etude biochimique

### Résultats

**Tableau IV-6. Caractéristiques biochimiques des milieux fermentés à la fin des deux cultures mixtes de *S. cerevisiae* souche C/O. *oeni* souche X.**

	Micro-organismes séparés	Micro-organismes mélangés
Sucre consommé (g/L)	207	197
Ethanol produit (g/L)	81	81
Glycérol produit (g/L)	6,3	6
Acide acétique produit (g/L)	0,6	0,45
Azote alpha-aminé initial (mg/L)	68	69
Azote alpha-aminé consommé (mg/L)	59	60
Azote ammoniacal initial (mg/L)	425	431
Azote ammoniacal consommé (mg/L)	307	312
Acide L-malique consommé (g/L)	1,1	1,1
Acide L-Lactique produit (g/L)	0,59	0,54
Acide D-Lactique produit (g/L)	0,26	0,28

### Discussion

Le tableau IV-6 nous montre que les milieux fermentés à la fin des deux cultures mixtes ont présenté une composition biochimique semblable ce qui prouve encore une fois que le métabolisme des deux micro-organismes n'a pas été affecté par un contact direct entre les cellules bactériennes et levuriennes. Les mêmes quantités d'acide L-malique ont été consommées dans les deux cas. De plus les quantités d'acide L-Lactique produites étaient très proches et correspondaient en molarité, avec et sans séparation des micro-organismes, à 6,6 et 6 mM respectivement. Etant donné que chaque mole d'acide L-malique donne une mole d'acide L-Lactique nous pouvons déduire que les bactéries dans les deux cas ont consommé à peu près les mêmes quantités d'acide L-malique, soit 0,88 et 0,8 g/L respectivement. Le reste, soit 0,22 et 0,3 g/L, a été consommé par la levure ce qui correspond effectivement à la quantité d'acide L-malique consommée par *S. cerevisiae* souche C pendant sa culture pure dans le BRM sous azote (cf tableau IV-7). Les quantités d'acide D-Lactique produites étaient également très proches ce qui reflète aussi un comportement similaire de la

bactérie dans les deux cas. Ces quantités étaient faibles et correspondaient en molarité, avec et sans séparation des micro-organismes, à 2,9 et 3,11 mM respectivement. Etant donné qu'une mole de glucose donne une mole de D-Lactate par la voie hétérofermentaire des pentoses phosphates, nous pouvons déduire que les quantités de glucose consommées par *O. oeni* souche X au cours de ces deux cultures mixtes sont faibles et correspondent à une valeur moyenne de 0,54 g/L.

Nous constatons également que les quantités d'acide acétique produites étaient faibles avec une valeur un peu plus élevée quand les micro-organismes sont séparés qui peut être expliquée par la quantité totale de sucre consommée et qui est plus élevée dans ce cas. Notons que la quantité d'acide acétique produite au cours de la culture pure de *S. cerevisiae* souche C dans le BRM sous azote était proche de celle produite au cours des deux cultures mixtes et a présenté une valeur de 0,53 g/L. Etant donné qu'*O. oeni* souche X au cours de sa culture pure dans le BRM sous azote n'a produit que 0,09 g/L d'acide acétique à partir des 12 g/L de sucre consommés, nous pouvons déduire que l'acide acétique produit au cours de ces deux cultures mixtes est surtout un métabolite secondaire de la fermentation alcoolique.

Finalement nous pouvons conclure comme pour la culture mixte de *S. cerevisiae* souche D/*O. oeni* souche X que l'acide L-malique est surtout consommé par la bactérie et que les quantités de D-lactate et d'acétate produites sont faibles et acceptables ce qui écarte tout risque d'acidification.

#### **IV-2-2. Etude du comportement de *S. cerevisiae* souche C et d'*O. oeni* souche X au cours de leur culture mixte dans le BRM sous azote.**

Dans ce qui suit nous étudierons le comportement de *S. cerevisiae* souche C et d'*O. oeni* souche X au cours de leur culture mixte dans le BRM sous azote, réalisée en séparant les deux micro-organismes. On comparera dans un premier temps les résultats de la FA avec ceux obtenus pendant la culture pure de *S. cerevisiae* souche C dans le BRM sous azote. Ensuite nous comparerons les résultats de la FML pendant la culture mixte à ceux obtenus pendant la culture pure d'*O. oeni* souche X dans le BRM sous azote (témoin) et à ceux obtenus au cours de la culture séquentielle de cette bactérie dans le milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche C. Ceci nous aidera à évaluer l'utilité de la stratégie de co-culture dans le cas de ce couple.

**IV-2-2-1. Comparaison des résultats de la FA menée par *S. cerevisiae* souche C au cours de sa culture mixte avec *O. oeni* souche X à ceux obtenus au cours de sa culture pure dans le BRM sous azote.**

### a- Etude cinétique

#### Résultats

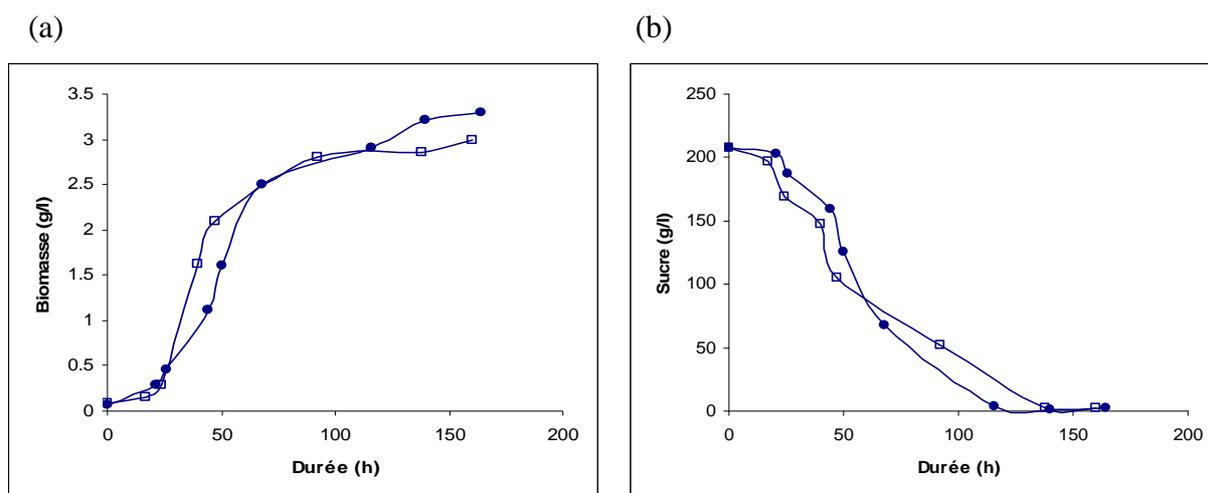


Fig. IV-7 Evolution de la biomasse de *S. cerevisiae* souche C (a) et de sa consommation de sucre (b) au cours de sa culture mixte avec *O. oeni* souche X et pendant sa culture pure dans le BRM sous azote. (●) culture mixte, (□) culture pure.

### b- Etude biochimique

**Tableau IV-7. Caractéristiques biochimiques des milieux fermentés à la fin de la culture mixte de *S. cerevisiae* souche C/ *O. oeni* souche X et de la culture pure de *S. cerevisiae* souche C dans le BRM sous azote.**

	Culture mixte de <i>S. cerevisiae</i> souche C/ <i>O. oeni</i> souche X	Culture pure de <i>S. cerevisiae</i> souche C
Sucre consommé (g/L)	207	205
Ethanol produit (g/L)	81	81
Glycérol produit (g/L)	6,3	5,94
Acide acétique produit (g/L)	0,6	0,53
Azote alpha-aminé initial (mg/L)	68	75,2
Azote alpha-aminé consommé (mg/L)	59	65
Azote ammoniacal initial (mg/L)	425	437
Azote ammoniacal consommé (mg/L)	307	317
Acide L-malique consommé (g/L)	1,1	0,22
Acide L-Lactique produit (g/L)	0,59	-

## Discussion

La figure IV-7 et le tableau IV-7 nous montrent que *S. cerevisiae* souche C présente un comportement cinétique et biochimique similaire quand elle est en culture pure et en culture mixte avec *O. oeni* souche X. Comme dans le cas de *S. cerevisiae* souche D, la présence de la bactérie n'affecte pas la levure. L'évolution de la consommation de l'azote alpha-aminé et de l'azote ammoniacal se trouvent dans les tableaux a-3 et a-4 de l'annexe de la partie IV-2 pour la culture mixte et dans les tableaux c-2 et c-3 de l'annexe de la partie IV-2 pour la culture pure.

**IV-2-2-2. Comparaison des résultats de la FML menée par *O. oeni* souche X au cours de sa culture mixte avec *S. cerevisiae* souche C à ceux obtenus au cours de sa culture pure dans le BRM sous azote (témoin) et au cours de sa culture séquentielle dans le milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche C.**

## Résultats

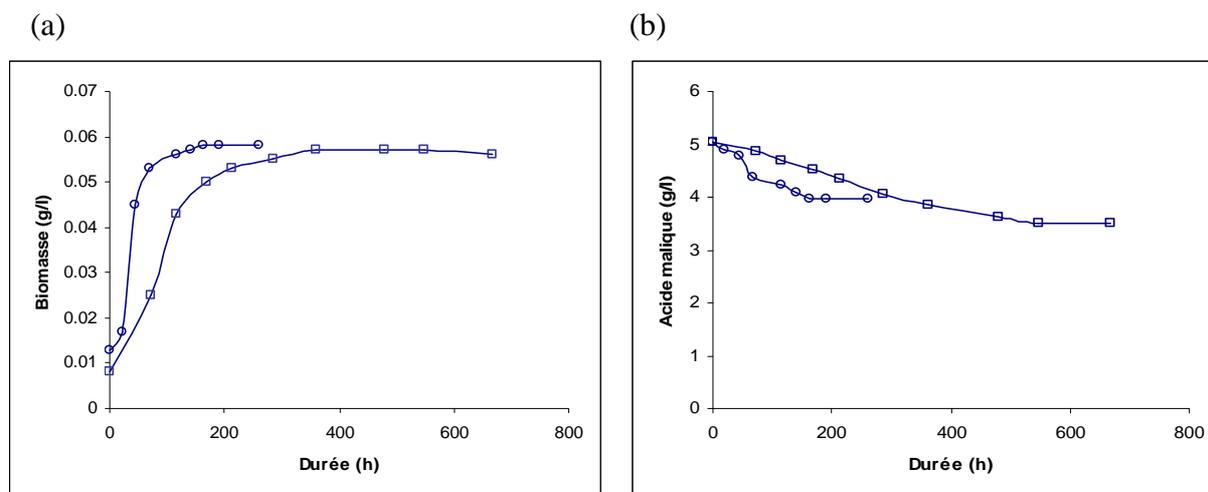


Fig. IV-8 Evolution de la biomasse d'*O. oeni* souche X (a) et de sa consommation d'acide malique (b) au cours de la culture mixte avec *S. cerevisiae* souche C et au cours de la culture séquentielle dans le milieu préfermenté par cette même souche de levure. (○) culture mixte, (□) culture séquentielle.

**Tableau IV-8. Paramètres cinétiques de la FML menée par *O. oeni* souche X pendant ses cultures mixte et séquentielle avec *S. cerevisiae* souche C et pendant sa culture pure dans le BRM sous azote (témoin).**

	Témoin	Culture mixte de <i>S. cerevisiae</i> souche C/ <i>O. oeni</i> souche X, phase FML	Culture séquentielle de <i>S. cerevisiae</i> souche C/ <i>O. oeni</i> souche X, phase FML
Biomasse initiale (g/L)	0,01	0,013	0,008
Biomasse maximale (g/L)	0,9	0,058	0,057
Productivité (g/L/h)	$33,6 \times 10^{-4}$	$6 \times 10^{-4}$	$2,12 \times 10^{-4}$
Acide malique initial (g/L)	4,95	5,05	5,05
Acide malique final (g/L)	0	3,95	3,5
Vitesse globale de démalication (g/L/h)	$17,5 \times 10^{-3}$	$6,7 \times 10^{-3}$	$2,8 \times 10^{-3}$
Vitesse spécifique moyenne de démalication (g/g/h)	$19,4 \times 10^{-3}$	$116 \times 10^{-3}$	$50 \times 10^{-3}$
Durée de la FML (h)	283	164	548

## Discussion

La figure IV-8 et le tableau IV-8 nous montrent une amélioration de la productivité au cours de la culture mixte qui a été 2,83 fois plus élevée que celle obtenue pendant la culture séquentielle. Par contre, les biomasses maximales atteintes étaient les mêmes. Concernant la démalication, on observe également une augmentation des vitesses globale et spécifique de démalication qui ont été 2,4 et 2,32 fois plus rapide pendant la culture mixte. Cependant on n'a pas constaté une augmentation de la quantité d'acide malique consommée. Au contraire, alors que 1,55 g/L ont été consommés pendant la culture séquentielle, seuls 1,1 g/L ont été consommés pendant la culture mixte dont 0,88 g/L par la bactérie et le reste par la levure (cf tableaux IV-6 et IV-7). Ces résultats nous amènent à la conclusion que pour ce couple levure/bactérie, le seul avantage de la culture mixte a été l'amélioration de la vitesse de démalication. Cependant, l'inhibition d'*O. oeni* souche X est restée importante. En effet, comparées au témoin, la biomasse maximale formée et la productivité sont restées 15,52 et 5,6 fois plus faibles. De même, la vitesse globale de démalication était 2,6 fois plus lente. Nous rappelons que certaines molécules inhibitrices synthétisées par *S. cerevisiae* souche C ont été mesurées comme l'éthanol, le SO<sub>2</sub> et les acides gras saturés à chaîne moyenne dont les concentrations sont rapportées dans le tableau I-2 de la partie I de ce chapitre. Cette souche avait produit les concentrations d'acides gras les plus élevées. On peut suggérer que l'addition de 200 mg/L d'Optired® au milieu préfermenté par cette souche avait minimisé l'effet inhibiteur de ces molécules par adsorption aux mannoprotéines ce qui n'est pas le cas dans la culture mixte d'où la plus faible consommation d'acide malique. On a également identifié la

synthèse par cette souche de levure d'un peptide inhibiteur de poids moléculaire compris entre 5 et 10 KDa. On peut également supposer que ce peptide est relargué dans le milieu au début de la fermentation alcoolique. Ces deux facteurs associés à l'éthanol et au SO<sub>2</sub> ainsi qu'à d'autres facteurs non identifiés peuvent expliquer l'inhibition importante observée même pendant la culture mixte. Concernant les besoins en nutriments notamment en azote alpha-aminé (10,7 mg/L), ils étaient couverts au début de la culture mixte, mais apparemment *O. oeni* souche X n'a pas pu en profiter à cause de son inhibition précoce par *S. cerevisiae* souche C.

### IV-3. Conclusion

Les cultures mixtes ont été étudiées comme alternative à la stratégie classique de cultures séquentielles dans le cas de levures fortement inhibitrices. Elles ont été réalisées dans le milieu synthétique jus de raisin en BRM sous azote avec apport ponctuel d'air pour se rapprocher le plus possible des conditions réelles de vinification. Les résultats obtenus avec les couples *S. cerevisiae* souche D/*O. oeni* souche X et *S. cerevisiae* souche C/*O. oeni* souche X, nous ont permis de conclure que la stratégie de co-inoculation peut être intéressante et peut améliorer le rendement de la FML mais ceci dépend également du choix des souches de levure et de bactérie dans un couple donné qui reste un facteur important à contrôler. De plus nous avons montré que le BRM constitue un outil pertinent pour l'étude des interactions levure-bactérie au cours de la culture mixte car seuls des métabolites levuriens extracellulaires et solubles sont impliqués dans l'inhibition et une inhibition par contact direct entre les cellules levuriennes et bactériennes est à exclure.

**Annexes de la partie IV-1: Cultures mixtes réalisées avec le couple *S. cerevisiae* souche D/*O. oeni* souche X dans le milieu synthétique jus de raisin en BRM.**

**a- Culture mixte du couple *S. cerevisiae* souche D/*O. oeni* souche X sous air.**

**Tableau a-1. Suivi cinétique de la FML menée par *O. oeni* souche X pendant sa culture mixte avec *S. cerevisiae* souche D sous air.**

Durée (h)	*D.O	*Concentration (cellules/mL) x 10 <sup>6</sup>	*Poids sec (g/L)	Acide malique restant (g/L)
0	0,003	3,6	0,016	5,07
19	0,003	3,64	0,0164	4,98
43	0,003	3,8	0,017	4,98
67	0,004	5,3	0,024	4,87
96	0,005	7,6	0,034	4,3
116	0,0053	7,6	0,034	4,06
139	0,005	6,7	0,03	3,95
162	0,005	5,8	0,026	3,8
192	0,0054	5,3	0,024	3,65
210	0,0055	5,8	0,026	3,54
237	0,0054	5,8	0,026	3,5
257	0,0056	Rupture des fibres de la membrane		3,4
305				3,4

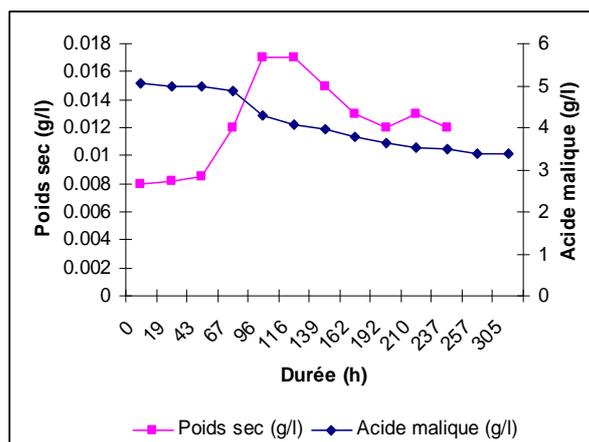


Fig. a-1 Evolution du poids sec de la souche X et de sa consommation d'acide malique pendant sa culture mixte avec la souche D sous air.

\*: Les valeurs de ces paramètres correspondent à un volume de 2 L (volume du réservoir contenant les bactéries). On doit donc les diviser par 2 pour les ramener au volume total du BRM soit 4 L. Ceci s'applique également pour les valeurs de D.O, les concentrations et les poids sec des levures et des bactéries pendant toutes les cultures mixtes.

**Tableau a-2. Suivi cinétique de la FA menée par *S. cerevisiae* souche D pendant sa culture mixte avec *O. oeni* souche X sous air.**

Durée (h)	D.O	Concentration (cellules/mL) x 10 <sup>6</sup>	Viabilité (%)	Poids sec (g/L)	Sucre restant (g/L)
0	0,062	7,22		0,13	200,4
18	0,7	78		1,4	170
25	2,5	289		5,2	160
42	6,7	778		14	122
49	7,24	844	83	15,2	70
66	7,4	860	81,8	15,48	25
73	7,4	833	78,6	15	16
119	7,4	844,4	72	15,2	2
139	7,8	844	71,5	15,2	0,6
144	7,6	844	71,3	15,2	0,6
162	7,5	843	70	15,2	
185	7,4	844	70	15,2	
215	7	811	70	14,6	
233	7,1	811	70	14,6	
308	7,1	809	69	14,6	
329	7	789	68	14,2	
377	7	790	68	14,2	

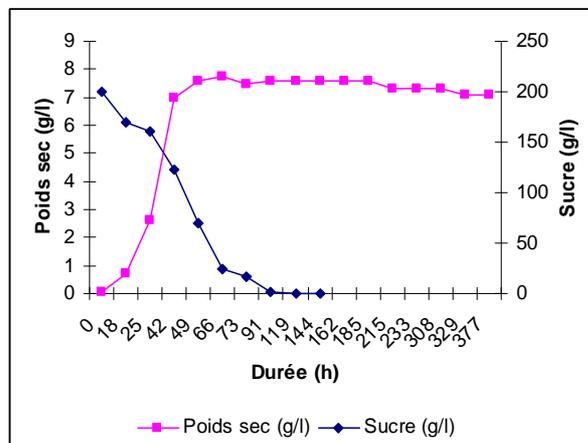


Fig. a-2 Evolution du poids sec de la souche D et de sa consommation de sucre au cours de sa culture mixte avec la souche X sous air.

**b- Culture mixte du couple *S. cerevisiae* souche D/*O. oeni* souche X sous azote.****Tableau b-1. Suivi cinétique de la FML menée par *O. oeni* souche X pendant sa culture mixte avec *S. cerevisiae* souche D sous azote.**

Durée (h)	D.O	Concentration cellulaire (cellules/mL) x 10 <sup>6</sup>	Poids sec (g/L)	Acide malique (g/L) dans le réservoir avec membrane	Acide malique (g/L) dans le réservoir sans membrane
0	0,007	3,8 (±0,2)	0,017 (±0,001)	5,01 (±0,12)	5,04 (±0,09)
17	0,01	6,17 (±0,28)	0,028 (±0,0015)	4,97 (±0,13)	4,91 (±0,2)
44	0,016	12 (±0,3)	0,054 (±0,0012)	4,78 (±0,076)	4,84 (±0,092)
69	0,018	12,8 (±0,72)	0,058 (±0,0035)	4,54 (±0,22)	4,56 (±0,26)
91	0,016	13,53 (±0,21)	0,061 (±0,001)	4,34 (±0,035)	4,32 (±0,03)
116	0,02	14,42 (±0,38)	0,065 (±0,0015)	4,06 (±0,29)	4,13 (±0,12)
137	0,016	14,08 (±0,14)	0,063 (±0,0006)	4,02 (±0,14)	4,07 (±0,1)
160	0,018	14,42 (±0,63)	0,065 (±0,0028)	3,98 (±0,05)	4,03 (±0,15)
184	0,02	14,85 (±0,41)	0,067 (±0,0021)	3,85 (±0,042)	3,86 (±0,036)
256	0,02	14,7 (±0,12)	0,066 (±0,0006)	3,66 (±0,17)	3,62 (±0,13)
304	0,02	15,1 (±0,53)	0,068 (±0,0027)	3,35 (±0,15)	3,25 (±0,3)
352	0,022	15 (±0,53)	0,068 (±0,0024)	2,93 (±0,06)	2,75 (±0,015)
424	0,022	15,2 (±0,47)	0,068 (±0,002)	2,13 (±0,082)	2,32 (±0,06)
472	0,023	15 (±0,55)	0,068 (±0,0025)	1,58 (±0,1)	1,7 (±0,05)
520	0,024	15,2 (±0,36)	0,068 (±0,0016)	1,27 (±0,038)	1,41 (±0,015)
570	0,024	15,1 (±0,5)	0,068 (±0,0023)	1,34 (±0,03)	1,34 (±0)

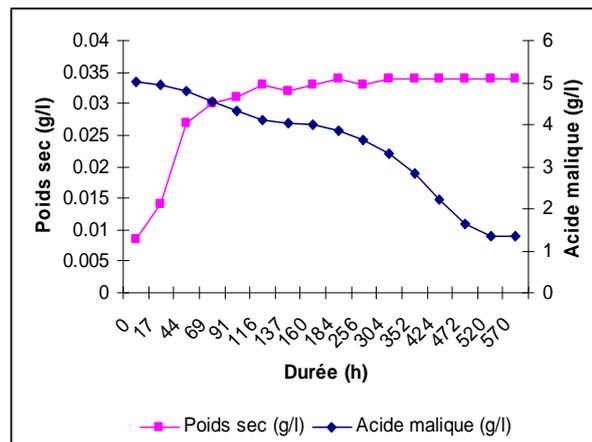


Fig. b-1 Evolution du poids sec de la souche X et de sa consommation d'acide malique pendant sa culture mixte avec la souche D sous azote.

**Tableau b-2. Suivi cinétique de la FA menée par *S. cerevisiae* souche D pendant sa culture mixte avec *O. oeni* souche X sous azote.**

Durée (h)	D.O	Concentration cellulaire (cellules/mL) x 10 <sup>6</sup>	Poids sec (g/L)	Viabilité (%)	Sucre (g/L) dans le réservoir avec membrane	Sucre (g/L) dans le réservoir sans membrane
0	0,07	8,6 (±0,5)	0,155 (±0,011)		208,2	213
17	0,2	21,7 (±0,79)	0,39 (±0,015)		193	199,9
23	0,5	57,47 (±0,75)	1,04 (±0,015)		185	185
44	1,41	142,8 (±1,6)	2,57 (±0,03)		149,2	157,3
69	1,8	210,23 (±1,7)	3,78 (±0,03)		60,2	64
91	2,2	258 (±1,73)	4,64 (±0,03)	78	9,7	12,8
116	2,4	278,7 (±3,51)	5,02 (±0,06)	78	1,81	1,56
137	2,4	280 (±3)	5,04 (±0,05)	62,4	1,09	1,25
160	2,7	290 (±0,58)	5,22 (±0,01)	50,2	1,2	1,2
184	2,7	274 (±3,6)	4,93 (±0,073)	50		
256	2,2	260 (±3,5)	4,68 (±0,06)	42		
304	2	237 (±2,4)	4,27 (±0,05)	33		
352	2	215 (±1,5)	3,87 (±0,11)	31,5		
424	1,8	200 (±1,73)	3,6 (±0,07)	18,4		
472	1,83	185 (±3,14)	3,33 (±0,043)	15,2		
520	1,8	167 (±0,9)	3 (±0,03)	14,7		
570	1,8	159 (±1,2)	2,86 (±0,02)	14,8		

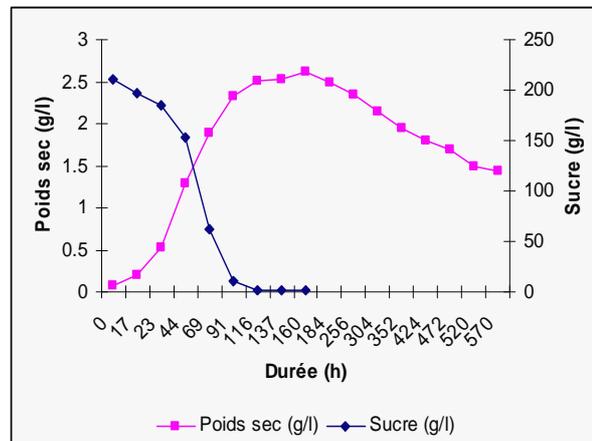


Fig. b-2 Evolution du poids sec de la souche D et de sa consommation de sucre au cours de sa culture mixte avec la souche X sous azote.

**Tableau b-3. Evolution de la consommation de l'azote alpha-aminé au cours de la culture mixte de *S. cerevisiae* souche D/O. oeni souche X dans le BRM sous azote.**

Durée (h)	Azote alpha-aminé (mg/L) Réservoir avec membrane	Azote alpha-aminé (mg/L) Réservoir sans membrane	Valeurs moyennes (mg/L)
0	66,3	69,23	67,8
17	32,44	33,44	33
23	23,16	-	23,16
44	11,47	10,44	11
69	9,92	9,46	9,7
91	18,69	14,74	16,72
116	15,94	20,58	18,3
137	20,75	24,19	22,5
160	29,17	26,94	28
184	34,16	29,69	32
256	40,35	41,21	41
304	45,16	45,33	45,25
352	52,04	55,13	53,6
424	56,68	64,93	61
472	60,8	61,84	61,32

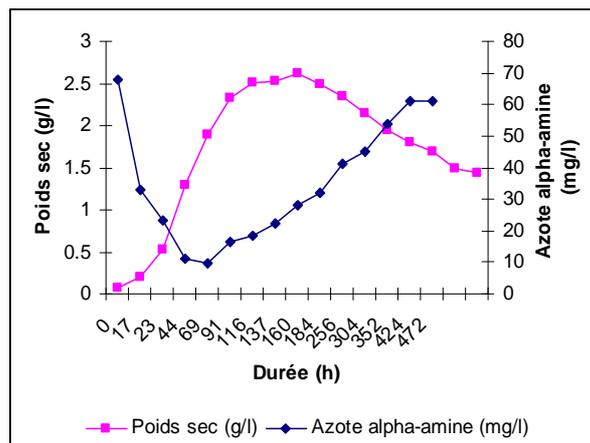


Fig. b-3 Evolution du poids sec de la souche D et de la consommation d'azote alpha-aminé au cours de sa culture mixte avec la souche X sous azote.

**Tableau b-4. Evolution de la consommation de l'azote ammoniacal au cours de la culture mixte de *S. cerevisiae* souche D/O. oeni souche X dans le BRM sous azote.**

Durée (h)	Azote ammoniacal (mg/L) Réservoir avec membrane	Azote ammoniacal (mg/L) Réservoir sans membrane	Valeurs moyennes (mg/L)
0	464	467,6	466
17	469,8	465,5	468
23	377,7	-	377,7
44	273,7	283,2	279
69	168,8	182,2	176
91	142,5	138,3	140
116	133,25	137,7	135,5
137	138,6	144,8	141,7
160	148,8	143,5	146,2
184	157,3	140,25	149
256	146,15	140,4	143,3
304	139,6	137	138,3
352	149,4	141,15	145,3
424	152,55	144,2	148,4
472	142	144,9	143,5
520	142,4	133,8	138,1

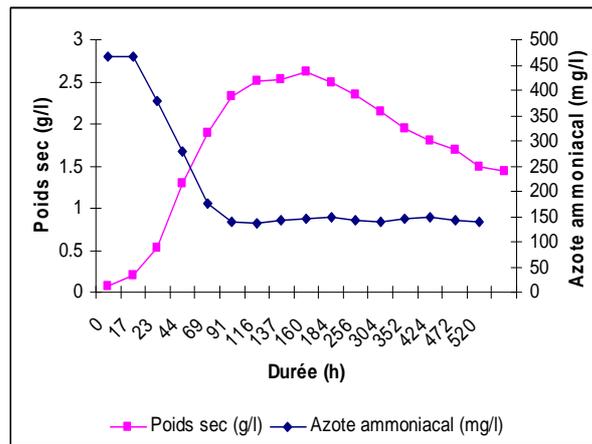


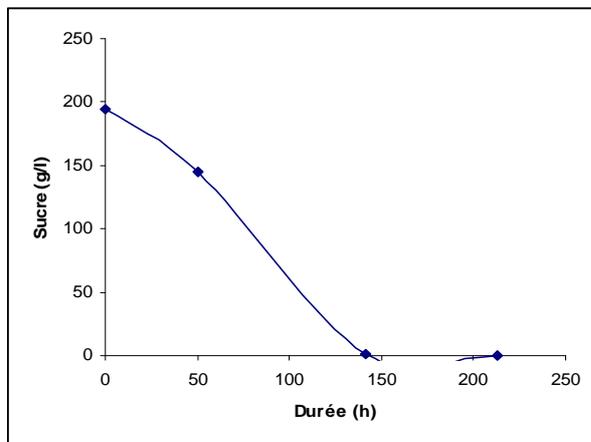
Fig. b-4 Evolution du poids sec de la souche D et de la consommation d'azote ammoniacal au cours de sa culture mixte avec la souche X sous azote.

**c- Culture mixte du couple *S. cerevisiae* souche A/O. *oeni* souche X sous air.**

**Tableau c. Suivi cinétique de la consommation du sucre et de l'acide malique au cours de la culture mixte de *S. cerevisiae* souche A/O. *oeni* souche X sous air.**

Durée (h)	Sucre (g/L)	Acide malique (g/L)
0	195	5.04
50	144.5	4.36
141	1.2	2.69
213	0	1.84
441	0	0

(a)



(b)

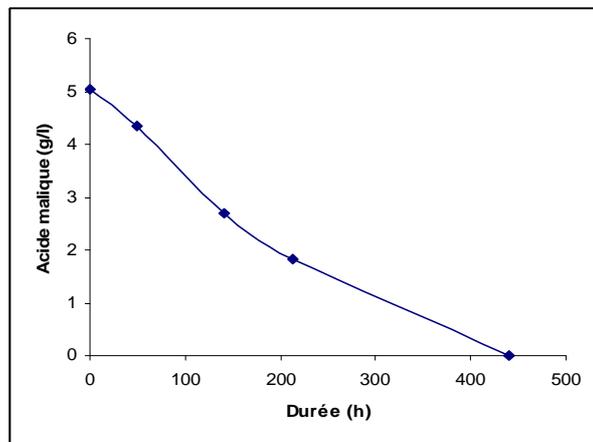


Fig. c Evolution de la consommation du sucre (a) et de l'acide malique (b) au cours de la culture mixte de *S. cerevisiae* souche A/O. *oeni* souche X dans le BRM sous air.

**d- Culture pure de *S. cerevisiae* souche D dans le BRM sous azote.****Tableau d-1. Suivi cinétique de la FA menée par *S. cerevisiae* souche D pendant sa culture pure dans le BRM sous azote.**

Durée (h)	D.O	Concentration cellulaire (cellules/mL) x 10 <sup>6</sup>	Poids sec (g/L)	Sucre (g/L) Réservoir avec membrane	Sucre (g/L) Réservoir sans membrane
0	0.07	8.2	0.145	210.6	211.5
10	0.18	20.55	0.37	205.3	207.4
27	0.44	51	0.9	195.1	197.6
32	0.69	96.2	1.43	183.6	189.7
51	1.38	157.8	2.86	161.5	160.3
98	2.3	267	4.8	45.5	47.2
105	2.4	275	5	6.9	11.5
127	2.53	277	5	1.38	1.32
147	2.4	276	5	1.31	1.42

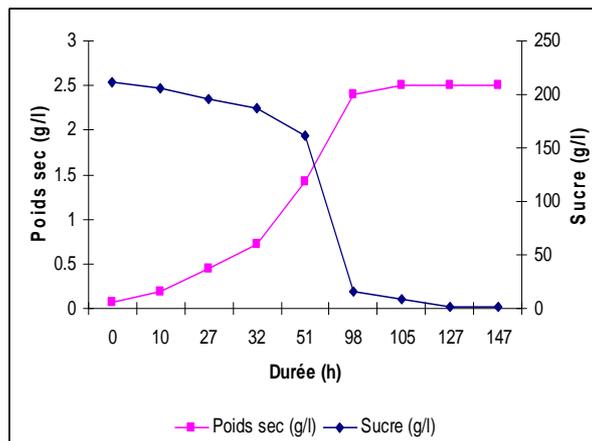


Fig. d-1 Evolution du poids sec de la souche D et de sa consommation de sucre au cours de sa culture pure dans le BRM sous azote.

**Tableau d-2. Evolution de la consommation de l'azote alpha-aminé au cours de la culture pure de *S. cerevisiae* souche D dans le BRM sous azote.**

Durée (h)	Azote alpha-aminé (mg/L) Réservoir avec membrane	Azote alpha-aminé (mg/L) Réservoir sans membrane	Valeurs moyennes (mg/L)
0	72,6	72,6	72,6
10	27	27	27
27	17	17	17
32	11	10,7	11
51	15,68	12,67	14,2
98	18,43	14	16,2
105	17,07	18,7	18
127	16,6	18,26	17,43

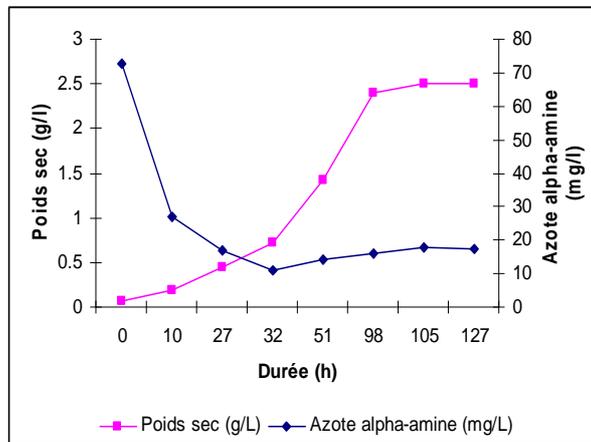


Fig. d-2 Evolution du poids sec de la souche D et de sa consommation d'azote alpha-aminé au cours de sa culture pure sous azote.

**Tableau d-3. Evolution de la consommation de l'azote ammoniacal au cours de la culture pure de *S. cerevisiae* souche D dans le BRM sous azote.**

Durée (h)	Azote ammoniacal (mg/L) Réservoir avec membrane	Azote ammoniacal (mg/L) Réservoir sans membrane	Valeurs moyennes (mg/L)
0	436,3	436,3	436,3
10	375,7	430	403
27	373,7	384	379
32	291,3	338	315
51	205	206	206
98	119	103,1	111,1
105	111,4	101,2	106,3
127	105	106	106

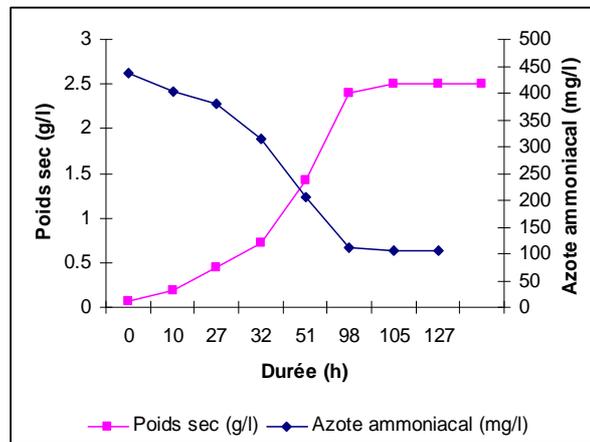


Fig. d-3 Evolution du poids sec de la souche D et de sa consommation d'azote ammoniacal au cours de sa culture pure sous azote.

**Annexe de la partie IV-2: Cultures mixtes réalisées avec le couple *S. cerevisiae* souche C/O. *oeni* souche X.**

**a- Culture mixte du couple *S. cerevisiae* souche C/O. *oeni* souche X dans le BRM sous azote avec séparation des deux micro-organismes.**

**Tableau a-1. Suivi cinétique de la FML menée par *O. oeni* souche X pendant sa culture mixte en présence de *S. cerevisiae* souche C avec séparation des deux micro-organismes.**

Durée (h)	D.O	Concentration cellulaire (cellules/mL) x 10 <sup>6</sup>	Poids sec (g/L)	Acide malique (g/L) réservoir sans membrane	Acide malique (g/L) réservoir avec membrane
0	0,003	5,625 (±0,15)	0,025 (±0,005)	5,02 (±0,13)	5,05 (±0,083)
21	0,005	7,6 (±0,23)	0,034 (±0,001)	4,95 (±0,01)	4,87 (±0,015)
44	0,039	20,08 (±1,51)	0,09 (±0,006)	4,83 (±0,08)	4,72 (±0,13)
68	0,014	23,6 (±1,01)	0,106 (±0,005)	4,38 (±0,15)	4,38 (±0,092)
116	0,032	25 (±0,63)	0,112 (±0,003)	4,24 (±0,1)	4,22 (±0,072)
140	0,026	25,33 (±0,25)	0,114 (±0,0006)	4,17 (±0,035)	4,29 (±0,021)
164	0,033	25,8 (±0,5)	0,116 (±0,0036)	3,97 (±0,071)	3,97 (±0,086)
191	0,037	26 (±0,14)	0,116 (±0,0006)	3,97 (±0,017)	4 (±0,03)
239	0,034	25,9 (±0,58)	0,116 (±0,0036)	4,08 (±0,22)	4,03 (±0,09)
284	0,048	25,8 (±0,63)	0,116 (±0,0025)	4,02 (±0,16)	4,05 (±0,17)
356	0,03	25,5 (±0,25)	0,116 (±0,001)	4,05 (±0,042)	4 (±0,2)

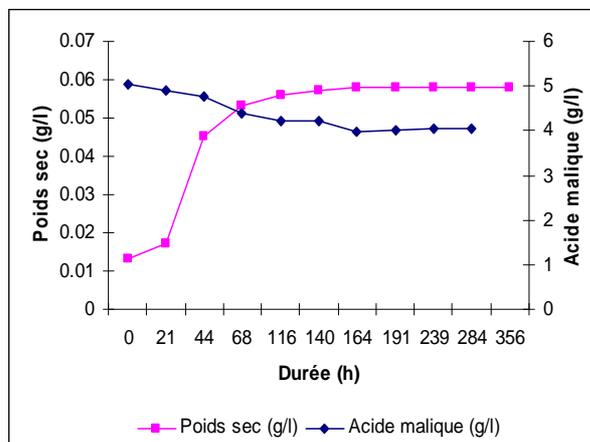


Fig. a-1 Evolution du poids sec de la souche X et de sa consommation d'acide malique pendant sa culture mixte en présence de la souche C avec séparation des deux micro-organismes.

**Tableau a-2. Suivi cinétique de la FA menée par *S. cerevisiae* souche C pendant sa culture mixte en présence d'*O. oeni* souche X avec séparation des deux micro-organismes.**

Durée (h)	D.O	Concentration cellulaire (cellules/mL) x 10 <sup>6</sup>	Poids sec (g/L)	Viabilité (%)	Sucre (g/L) réservoir avec membrane	Sucre (g/L) réservoir sans membrane
0	0,07	5,86 (±0,15)	0,13 (±0,15)		207,5	209
21	0,21	26 (±0,42)	0,575 (±0,01)		202	202,7
26	0,31	41,32 (±0,58)	0,91 (±0,01)		187,7	-
44	2	100,8 (±1,38)	2,23 (±0,032)		157,5	160,5
50	2,38	145 (±0,62)	3,2 (±0,035)		125,4	-
68	3,77	226,24 (±2,52)	5 (±0,06)		66,3	68,7
116	5,03	261 (±2,52)	5,77 (±0,06)	93,8	3,3	3,7
140	5,14	290 (±1,73)	6,41 (±0,023)	94,8	1,6	1,9
164	5,19	298 (±3)	6,6 (±0,07)	85	1,72	2,18
191	4,87	289 (±2,52)	6,4 (±0,05)	86		
239	4,63	275 (±2,52)	6,08 (±0,05)	75		
284	4,33	267 (±1,16)	5,9 (±0,03)	68		
335	4,17	258 (±0)	5,68 (±0)	14		
356	4,12	238 (±0)	5,24 (±0)	4,2		

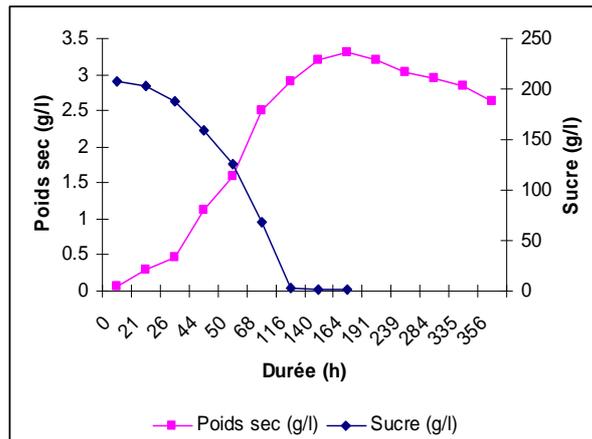


Fig. a-2 Evolution du poids sec de la souche C et de sa consommation de sucre pendant sa culture mixte en présence de la souche X avec séparation des deux micro-organismes.

**Tableau a-3. Evolution de la consommation de l'azote alpha-aminé au cours de la culture mixte de *S. cerevisiae* souche C/O. *oeni* souche X réalisée en séparant les deux micro-organismes.**

Durée (h)	Azote alpha-aminé (mg/L) Réservoir avec membrane	Azote alpha-aminé (mg/L) Réservoir sans membrane	Valeurs moyennes (mg/L)
0	65,62	70,43	68
21	49,63	47,22	48,43
26	35,71	-	35,71
44	18,52	11,47	15
50	15,08	-	15,08
68	9,41	9,06	9,24
116	18,17	17,14	17,7
140	15,42	20,06	17,74
164	16,8	19,72	18,3
191	22,47	23,5	23
239	29	28,32	29
284	29,17	32,61	31
335	59,26	52,55	56
356	59,94	60,12	60

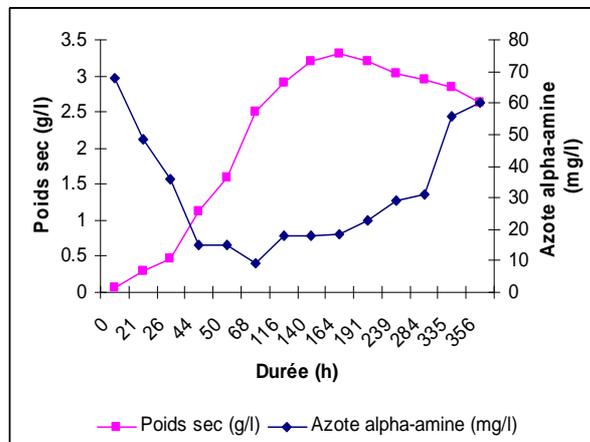


Fig. a-3 Evolution de la biomasse de la souche C et de la consommation d'azote alpha-aminé au cours de sa culture mixte en présence de la souche X avec séparation des deux micro-organismes.

**Tableau a-4. Evolution de la consommation de l'azote ammoniacal au cours de la culture mixte de *S. cerevisiae* souche C/O. *oeni* souche X réalisée en séparant les deux micro-organismes.**

Durée (h)	Azote ammoniacal (mg/L) Réservoir avec membrane	Azote ammoniacal (mg/L) Réservoir sans membrane	Valeurs moyennes (mg/L)
0	429,3	421,1	425,2
21	396,6	419	408
26	406,5	-	406,5
44	298,5	326,7	313
50	263,2	-	263,2
68	160	190,6	175,3
116	118,7	123,9	121,3
140	113,5	122	118
164	121,3	137,7	130
191	122,4	124,15	123,3
239	125,9	131,1	129
284	118,7	131,8	125,3
335	118	130	124
356	116	135,7	126

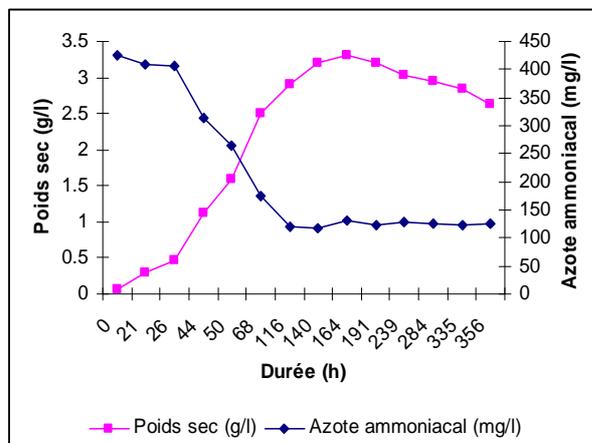


Fig. a-4 Evolution de la biomasse de la souche C et de la consommation d'azote ammoniacal au cours de sa culture mixte en présence de la souche X avec séparation des deux micro-organismes.

**b- Culture mixte du couple *S. cerevisiae* souche C/*O. oeni* souche X dans le BRM sous azote sans séparation des deux micro-organismes.**

**Tableau b-1. Suivi cinétique de la FML menée par *O. oeni* souche X pendant sa culture mixte avec *S. cerevisiae* souche C sans séparation des deux micro-organismes.**

Durée (h)	acide malique (g/L) (réservoir sans membrane)	acide malique (g/L) (réservoir avec membrane)
0	5,08 ( $\pm 0,058$ )	5,08 ( $\pm 0,061$ )
15	4,9 ( $\pm 0,01$ )	4,91 ( $\pm 0,017$ )
24	4,78 ( $\pm 0,021$ )	4,71 ( $\pm 0,015$ )
41	4,66 ( $\pm 0,042$ )	4,55 ( $\pm 0,057$ )
47	4,6 ( $\pm 0,015$ )	4,52 ( $\pm 0,023$ )
69	4,51 ( $\pm 0,012$ )	4,49 ( $\pm 0,032$ )
90	4,32 ( $\pm 0,04$ )	4,37 ( $\pm 0,045$ )
114	4,14 ( $\pm 0,07$ )	4,29 ( $\pm 0,02$ )
160	4 ( $\pm 0,03$ )	4 ( $\pm 0,053$ )
188	4,01 ( $\pm 0,027$ )	4,03 ( $\pm 0,035$ )
210	4,03 ( $\pm 0,027$ )	4,04 ( $\pm 0,046$ )
256	4,05 ( $\pm 0,025$ )	4,03 ( $\pm 0,015$ )
288	4,06 ( $\pm 0,035$ )	4,05 ( $\pm 0,017$ )
333	4,06 ( $\pm 0,038$ )	4,05 ( $\pm 0,018$ )
432	4,01 ( $\pm 0,025$ )	4,03 ( $\pm 0,017$ )

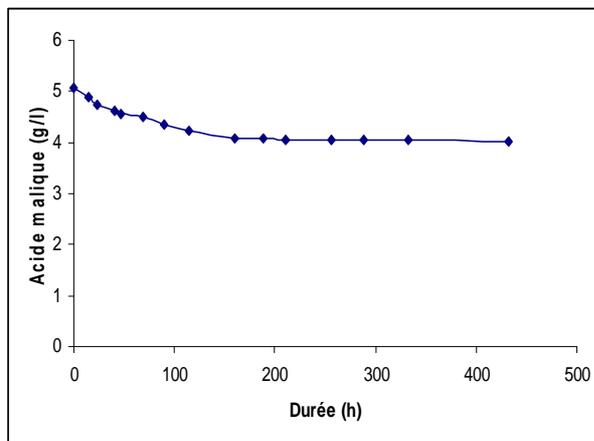


Fig. b-1 Evolution de la consommation de l'acide malique par la souche X au cours de sa culture mixte avec la souche C sans séparation des deux micro-organismes.

**Tableau b-2. Suivi cinétique de la FA menée par *S. cerevisiae* souche C pendant sa culture mixte avec *O. oeni* souche X sans séparation des deux micro-organismes.**

Durée (h)	D.O	Concentration cellulaire (cellules/mL) x 10 <sup>6</sup>	Poids sec (g/l)	Viabilité (%)	Sucre (g/L) (réservoir sans membrane)	Sucre (g/L) (réservoir avec membrane)
0	0,07	2,84	0,063		197,4	198,2
15	0,23	9,9	0,22		186,3	185
24	0,47	20,16	0,45		157,7	154,3
41	1,18	50,2	1,11	99	125,3	127,3
47	1,8	76,73	1,7	99	95,9	109,2
69	2,67	114,5	2,52	95	36,9	24,9
90	3,23	138,5	3,06	98,15	18	12
114	3,38	145,5	3,22	97,1	1,13	1,06
160	3,46	148,5	3,27	89,11	0,96	0,9
188	3,46	148,3	3,26	86,73	0,95	0,94
210	3,4	146,5	3,24	87,7		
256	3,14	134,5	2,96	79,4		
288	3,04	130	2,88	65		
333	2,8	120,4	2,66	59,3		
432	2,54	109	2,4	57,2		

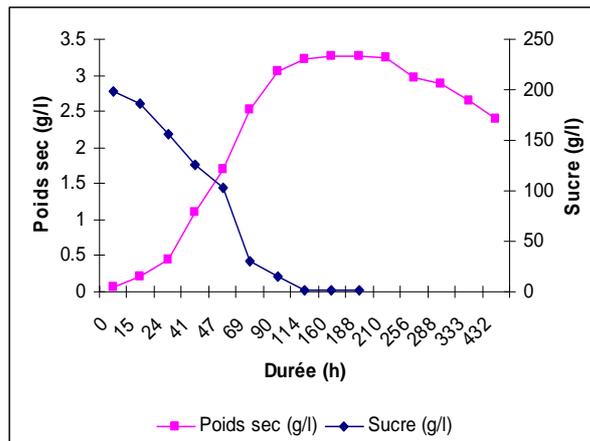


Fig. b-2 Evolution de la biomasse de la souche C et de sa consommation de sucre au cours de sa culture mixte avec la souche X sans séparation des deux micro-organismes.

**Tableau b-3. Evolution de la consommation de l'azote alpha-aminé au cours de la culture mixte de *S. cerevisiae* souche C/O. *oeni* souche X réalisée sans séparation des deux micro-organismes.**

Durée (h)	Azote alpha-aminé (mg/L) Réservoir avec membrane	Azote alpha-aminé (mg/L) Réservoir sans membrane	Valeurs moyennes (mg/L)
0	67	71	69
15	50	48	49
24	37	39	38
41	19	13	16
47	16	11	13,5
69	9,4	9,6	9,5
90	19	17	18
114	16	21	19
160	17	20	19
188	23	24	24
210	29	28	29
256	30	33	32
288	60	53	57
333	60	61	60,5

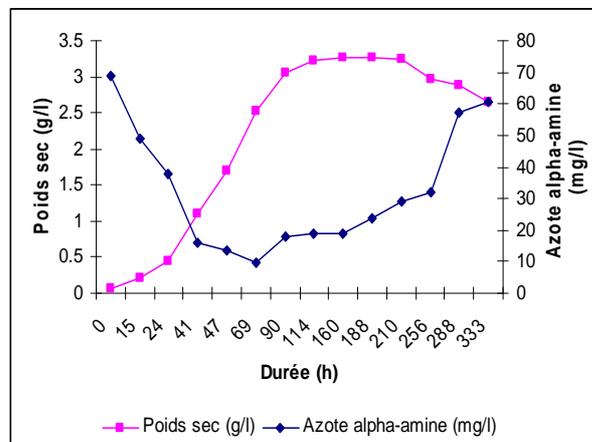


Fig. b-3 Evolution de la biomasse de la souche C et de la consommation de l'azote alpha-aminé au cours de sa culture mixte avec la souche X sans séparation des deux micro-organismes.

**Tableau b-4. Evolution de la consommation de l'azote ammoniacal au cours de la culture mixte de *S. cerevisiae* souche C/O. *oeni* souche X réalisée sans séparation des deux micro-organismes.**

Durée (h)	Azote ammoniacal (mg/L) Réservoir avec membrane	Azote ammoniacal (mg/L) Réservoir sans membrane	Valeurs moyennes (mg/L)
0	430	432	431
15	400	420	410
24	390	387	389
41	300	330	315
47	265	268	267
69	180	191	186
90	120	124	122
114	115	122	119
160	123	138	131
188	123	125	124
210	129	132	131
256	120	132	126
288	120	130	125
333	126	136	131

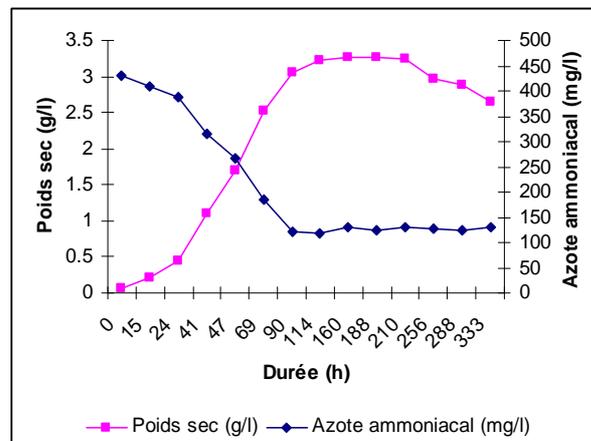


Fig. b-4 Evolution de la biomasse de la souche C et de la consommation de l'azote ammoniacal au cours de sa culture mixte avec la souche X sans séparation des deux micro-organismes.

**c-Culture pure de *S. cerevisiae* souche C dans le BRM sous azote.****Tableau c-1. Suivi cinétique de la culture pure de *S. cerevisiae* souche C dans le BRM sous azote.**

Durée (h)	D.O	Concentration cellulaire (cellules/mL) x 10 <sup>6</sup>	Poids sec (g/L)	Sucre (g/L) réservoir avec membrane	Sucre (g/L) réservoir sans membrane
0	0,12	6,8	0,154	207,5	206,9
17	0,25	14,23	0,32	198,3	194,6
24	0,43	24,75	0,55	168,3	170,3
40	2,53	146	3,24	147,7	146,8
47	3,24	187	4,15	118,2	92,5
92	4,4	260	5,6	57,7	45
138	4,44	267	5,7	2,04	2,01
160	4,8	300	6	2	2

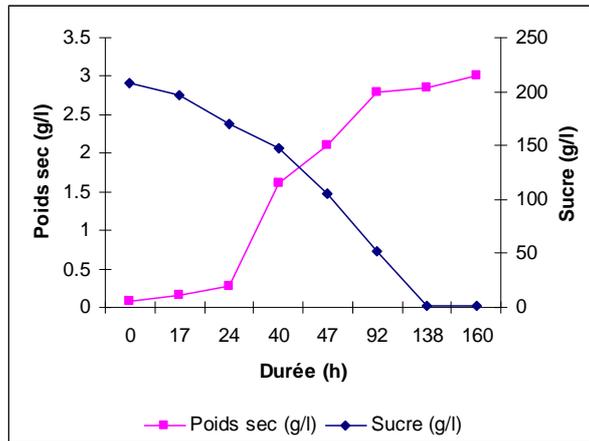


Fig. c-1 Evolution de la biomasse de la souche C et de sa consommation de sucre au cours de sa culture pure dans le BRM sous azote.

**Tableau c-2. Evolution de la consommation de l'azote alpha-aminé au cours de la culture pure de *S. cerevisiae* souche C dans le BRM sous azote.**

Durée (h)	Azote alpha-aminé (mg/L) Réservoir avec membrane	Azote alpha-aminé (mg/L) Réservoir sans membrane	Valeurs moyennes (mg/L)
0	74	76,3	75,2
17	53,24	54	53,62
24	35,88	41,38	38,63
40	12,73	12,5	12,62
47	8,4	7,34	7,87
92	11,81	8,55	10,2
138	8,46	12,5	10,5

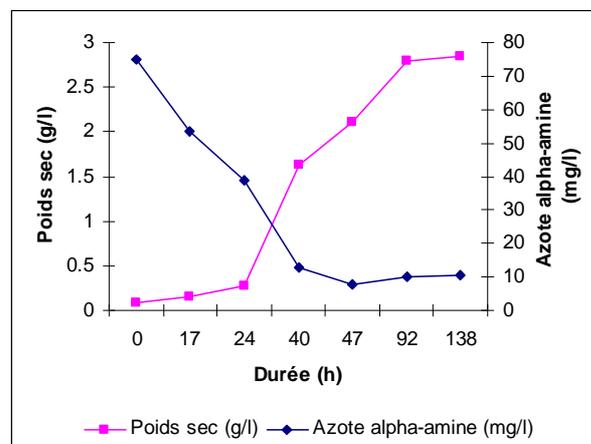


Fig. c-2 Evolution de la biomasse de la souche C et de sa consommation d'azote alpha-aminé au cours de sa culture pure dans le BRM sous azote.

**Tableau c-3. Evolution de la consommation de l'azote ammoniacal au cours de la culture pure de *S. cerevisiae* souche C dans le BRM sous azote.**

Durée (h)	Azote ammoniacal (mg/L) Réservoir avec membrane	Azote ammoniacal (mg/L) Réservoir sans membrane	Valeurs moyennes (mg/L)
0	430,5	443	437
17	428	426,5	427,3
24	419	413,7	416,4
40	302	326	314
47	267,2	277,6	272,4
92	118	119,2	119
138	118	118	118

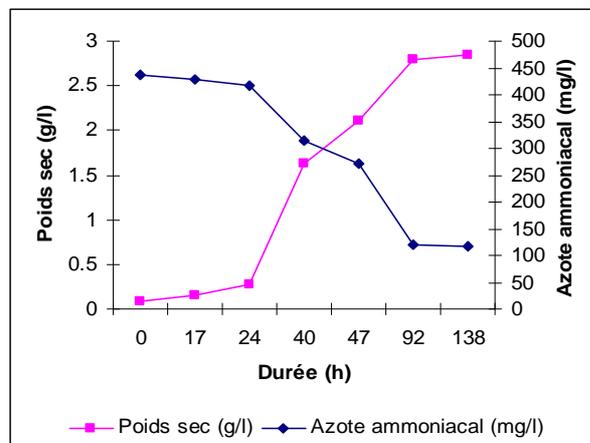


Fig. c-3 Evolution de la biomasse de la souche C et de sa consommation d'azote ammoniacal au cours de sa culture pure dans le BRM sous azote.



*Chapitre IV. Conclusion  
générale et perspectives*



#### IV- Conclusion générale et perspectives

La réalisation de la fermentation malolactique en vinification n'est pas toujours couronnée de succès. Les causes d'échec les plus fréquemment avancées sont la teneur élevée en éthanol du milieu à la fin de la fermentation alcoolique, la production par certaines souches de levures d'autres métabolites inhibiteurs comme le SO<sub>2</sub> endogène et les acides gras, le sulfitage, l'acidité élevée du vin et sa carence en nutriments indispensables à la croissance bactérienne comme les acides aminés. L'échec de la réalisation de la fermentation malolactique peut ainsi entraîner dans certains cas une dépréciation de la qualité du produit final.

Pour une meilleure compréhension des raisons d'échec ou de succès de la fermentation malolactique, il est important d'étudier les interactions qui peuvent exister entre les levures *S. cerevisiae*, principal agent de la fermentation alcoolique et les bactéries lactiques *O. oeni*, responsables de la fermentation malolactique. Différents chercheurs se sont intéressés à l'étude de ces interactions dont on distingue : absence d'interaction (neutralité), inhibition et/ou stimulation. Cependant la plupart de ces chercheurs ont surtout utilisé des méthodes qualitatives sur gélose, inspirées de la méthode des antibiogrammes, dont les résultats concernent uniquement la croissance cellulaire. Ces résultats n'étaient pas tout le temps reproductibles en milieu liquide (synthétique ou naturel) et ne permettaient pas la quantification de l'interaction. De plus l'activité malolactique recherchée n'est pas toujours corrélée à celle de croissance. Il est donc important d'acquérir une description précise de ces interactions en les quantifiant.

Dans ce travail nous avons testé différentes souches de *S. cerevisiae* avec différentes souches d'*O. oeni* dans des milieux liquides synthétiques simulant les milieux naturels (jus de raisin ou vin) et nous avons quantifié les interactions en testant deux stratégies d'inoculation : les fermentations séquentielles et les cultures mixtes. Nous avons également essayé d'identifier dans le cas d'une inhibition certaines molécules qui en sont responsables.

La première partie de notre travail a été consacrée à l'étude des cultures pures de cinq souches de levure et de trois souches de bactérie dans un milieu synthétique jus de raisin. Les milieux fermentés par les levures ont servi plus tard à l'inoculation des bactéries lactiques pour la réalisation des cultures séquentielles. Le suivi des fermentations alcooliques nous a permis de constater de faibles différences dans le comportement cinétique des souches de levure testées (croissance et consommation de sucre) ainsi que dans le profil biochimique des milieux établi à la fin de ces fermentations, notamment la production de certains métabolites inhibiteurs de la FML

(éthanol, SO<sub>2</sub> et acides gras) et la quantité d'azote assimilable restant dans le milieu (azote ammoniacal et alpha-aminé).

D'autre part les cultures pures des trois souches d'*O. oeni* dans le milieu synthétique jus de raisin en fioles d'Erlen-meyer ont montré un comportement cinétique proche pour les souches X et Z contrairement à la souche Y qui s'est distinguée par sa faible biomasse et par une lente activité de démalication. Par ailleurs les 3 souches ont consommé de faibles quantités de sucre et d'azote alpha-aminé et ont produit de faibles quantités d'acide D-lactique et d'acide acétique. *O. oeni* souche X a été également testée dans un milieu synthétique vin et a montré que même en présence de 10 % d'éthanol (v/v), elle était capable de consommer complètement l'acide malique. Sa vitesse de démalication était cependant réduite de 67 % par rapport à celle obtenue dans le milieu synthétique jus de raisin. Les deux cultures pures d'*O. oeni* souche X dans les milieux synthétiques jus de raisin et vin et celle d'*O. oeni* souche Y dans le milieu synthétique jus de raisin ont servi plus tard de référence pour les cinétiques de croissance et de consommation d'acide malique pendant leurs cultures séquentielles. De plus *O. oeni* souche X a été testée en culture pure dans le bioréacteur à membrane (milieu synthétique jus de raisin) en utilisant 3 gaz différents : l'air, le CO<sub>2</sub> et l'azote. Les meilleurs résultats de la FML ont été obtenus sous CO<sub>2</sub> et sous azote. L'azote a été finalement adopté pour les cultures mixtes réalisées ultérieurement dans ce bioréacteur.

La deuxième partie de notre travail a été consacrée à l'étude des cultures séquentielles. Nous avons, dans un premier temps, mis en évidence l'effet positif et cumulatif de l'adaptation des bactéries à l'éthanol et de l'addition d'un complément nutritionnel riche en mannoprotéines (Optired®) sur la croissance bactérienne et la démalication. Leur utilisation a été adoptée pour toutes les cultures séquentielles. Puis nous avons comparé les résultats des FML menées par *O. oeni* souche X dans les milieux préfermentés par *S. cerevisiae* souches A, B, C et D. Ceci nous a permis de constater qu'*O. oeni* souche X a été inhibée par tous ces milieux mais le degré d'inhibition dépendait étroitement de la souche de levure en question. La souche la plus inhibitrice a été la souche D suivie par les souches C, B puis A. Les profils biochimiques des quatre milieux préfermentés par ces levures et préalablement établis dans la partie I nous ont montré que l'éthanol, le SO<sub>2</sub> et les acides gras produits par ces souches ainsi que l'azote alpha-aminé restant n'ont pu être responsables des différences d'inhibition observées. Nous avons notamment constaté que *S. cerevisiae* souche D qui était la plus inhibitrice a produit des quantités très proches d'éthanol et de SO<sub>2</sub> moléculaire que les autres souches ainsi que les plus faibles quantités d'acides gras. Quantitativement l'azote alpha-aminé restant n'était pas non plus limitant. Le milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche C qui a été aussi fortement inhibiteur a présenté un profil biochimique comparable à celui du milieu préfermenté par *S. cerevisiae* souche A au niveau duquel l'acide

malique a été complètement consommé. Ces résultats nous ont encouragés à exploiter la présence d'autres molécules inhibitrices synthétisées par ces deux souches comme les molécules de nature protéique. Cette étude constituera la troisième partie de notre travail.

Contrairement aux résultats obtenus avec *O. oeni* souche X, la souche Y testée dans les milieux préfermentés par *S. cerevisiae* souches B, C et D s'est révélée résistante aux conditions inhibitrices de ces milieux et sa croissance ainsi que son activité de démalication ont été toutes les deux stimulées dans le milieu préfermenté par la souche B alors que seule la démalication a été stimulée dans le milieu préfermenté par la souche C. Il serait donc intéressant pour la suite des recherches d'exploiter la présence de certains mécanismes de résistance chez cette souche et d'identifier la nature des molécules stimulatrices relarguées par ces levures.

Ces résultats nous poussent à conclure que le choix du couple levure-bactérie est très important vis-à-vis de l'échec ou de la réussite de la FML, bien qu'à ce jour nous n'ayons pas encore identifié toutes les molécules responsables de l'inhibition et de la stimulation de cette fermentation.

Dans la troisième partie de notre travail, nous avons essayé de rechercher la présence de molécules inhibitrices de nature protéique dans les milieux préfermentés par *S. cerevisiae* souches C et D. Les résultats ont montré que l'inhibition exercée par la souche D était partiellement due à un peptide de poids moléculaire compris entre 5 et 10 KDa capable de réduire la vitesse de démalication de 25 %. Il agit principalement avec l'éthanol responsable de la réduction de la vitesse de démalication de 75 % mais sa présence semble être essentielle pour inhiber fortement la démalication. D'autre part les résultats obtenus avec *S. cerevisiae* souche C ont également montré la présence d'un peptide inhibiteur de poids moléculaire compris entre 5 et 10 KDa capable de réduire la vitesse de démalication de 5 à 11 %. Ces deux peptides ne semblent pas être les mêmes car celui synthétisé par la souche C est thermostable à 100°C contrairement au peptide synthétisé par la souche D. De plus son action inhibitrice sur la réalisation de la FML n'est pas aussi importante que celle exercée par le peptide synthétisé par la souche D. En effet, même quand il est 3,5 fois concentré, la démalication est 2 fois ralentie mais elle est entièrement achevée contrairement au peptide produit par la souche D qui inhibe complètement la démalication dans ce cas.

Il serait intéressant pour la suite des recherches de connaître le poids moléculaire exact de ces deux peptides, de les purifier, d'identifier leur mode et leur seuil d'action, le moment de leur relargage, de savoir si différentes souches de *S. cerevisiae* seraient capables de les synthétiser et d'étudier la sensibilité de différentes souches de bactéries lactiques à leur égard. Il serait également intéressant de remonter aux gènes codant ces deux peptides et de suivre leur expression dans différentes conditions.

La quatrième partie de notre travail a été consacrée à l'étude d'une nouvelle stratégie d'inoculation alternative aux cultures séquentielles. Il s'agit de la co-culture levure-bactérie réalisée dans le bioréacteur à membrane sous azote dans le milieu synthétique jus de raisin. *S. cerevisiae* souches C et D qui ont été les plus inhibitrices envers *O. oeni* souche X lors des cultures séquentielles ont été testées de nouveau avec cette même souche de bactérie mais cette fois en co-culture. Cette stratégie s'est avérée intéressante pour le couple *S. cerevisiae* souche D/ *O. oeni* souche X puisque la productivité et la vitesse de démalication ont été améliorées respectivement de 2,6 et 3,55 fois ainsi que la quantité d'acide malique consommée qui a été 10 fois plus importante. De plus il n'y avait aucun risque de déviation (piqûre lactique) puisque les concentrations d'acide D-lactique et d'acide acétique produites étaient faibles. Cependant avec le couple *S. cerevisiae* souche C/ *O. oeni* souche X, malgré l'amélioration de la productivité et de la vitesse de démalication, la quantité d'acide malique consommée n'était pas meilleure et l'inhibition est restée importante.

La stratégie de co-culture peut être intéressante dans le cas de certains couples levure-bactérie mais le choix des souches reste un critère important pour la réussite de la FML. Il serait intéressant de tester cette stratégie à l'échelle industrielle et de voir si les résultats sont extrapolables.

En définitive, ce travail a permis les avancées suivantes :

- mise en évidence de différents types d'interaction levure-bactérie (inhibition, stimulation et neutralité) en testant plusieurs couples dans des milieux liquides synthétiques dont la composition simule celle des milieux naturels en suivant à la fois la croissance bactérienne et la démalication.
- quantification de l'inhibition et de la stimulation de la FML par comparaison à des témoins.
- mise en évidence de l'implication de molécules de nature protéique dans l'inhibition de la FML en plus des molécules classiques rencontrées dans la littérature et caractérisation partielle de ces molécules protéiques.
- utilisation d'un bioréacteur à membrane pour l'étude des cultures mixtes levure-bactérie ce qui a facilité le suivi de l'évolution de chacune des deux populations et la quantification de leur biomasse, paramètre important dans la compréhension de l'interaction. Cet outil nous a ainsi permis d'évaluer les avantages de la culture mixte sur la croissance bactérienne et la démalication par comparaison des résultats à ceux obtenus lors des cultures séquentielles correspondantes.

Finalement, les recherches sont à poursuivre sur les molécules responsables de l'inhibition de la FML et sur l'étude de la sensibilité des souches bactériennes vis-à-vis de l'inhibition. Il serait également intéressant d'appliquer les cultures mixtes à l'échelle industrielle pour voir si elles restent avantageuses pour la réalisation de la FML dans ces conditions.



## *Références bibliographiques*



**Abrams A, Smith JB** (1974) Bacterial membrane ATPase. In: The enzymes. Boyer PD (Ed). Vol 10, 3<sup>rd</sup> edition. Academic Press Inc, New York, 395-429.

**Albasi C, Riba JP, Salgado E, Mona JP, Espenan JM** Brevet déposé sous le No.98.09563, le 27 juillet 1998.

**Albasi C, Tataridis P, Salgado Manjarrez E, Taillandier P** (2001) A new tool for the quantification of micro-organisms interactions dynamics. Industrial and Engineering Chemistry Research.

**Alberto MR, Farias ME, de Nadra MCM** (2001) Effect of gallic acid and catechin on *Lactobacillus hilgardii* 5w growth and metabolism of organic compounds. J. Agric. Food. Chem. 49 : 4359-4363.

**Alexandre H, Nguyen Van Long T, Feuillat M, Charpentier C** (1994) Contribution a l'étude des bourbes : influence sur la fermentescibilité des mouts. Rev. Fr. Oenol. 146: 11-20.

**Alexandre H, Heintz D, Chassagne D, Guilloux-Benatier M, Charpentier C, Feuillat M** (2001) Protease A activity and nitrogen fractions released during alcoholic fermentation and autolysis in oenological conditions. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 26: 235-240.

**Arendt EK, Neve H, Hammes WP** (1991) Characterization of phage isolates from a phage-carrying culture of *Leuconostoc oenos* 58N. Appl. Microbiol. Biotechnol. 34 : 220-224.

**Arnink K, Henick-Kling T** (2005) Influence of *Saccharomyces cerevisiae* and *Oenococcus oeni* strains on successful malolactic conversion in wine. AM J Enol&Vitic 56: 228-237.

**Asmundson RV, Kelly WJ** (1990) The effect of temperature and ethanol concentration on the growth of *Leuconostoc oenos*. In: Williams PJ, Davidson D, Lee TH (Eds), Proceedings of the seventh Australian wine industry technical conference, 14-16 August 1989, Adelaide, S.A Winetitles, 251-252.

**Bailey JE, Ollis DF** (1986) Biochemical engineering fundamentals. 2<sup>ème</sup> edition, McGraw-Hill, Singapore.

- Barnett JA, Payne RW, Yarrow D** (1990) *Yeasts: Characteristics and Identification*. 2<sup>nd</sup> ed. Cambridge University Press.
- Barnett JA** (1992) The taxonomy of the genus *Saccharomyces* Meyen ex Rees: a short review for non-taxonomists. *Yeast*, 8: 1-23.
- Barre P, Vezhinet F, Dequin S, Blondin B** (1993) In: *Wine Microbiology and Biotechnology*. Fleet GH (Ed), Hardwood Academic Publisher, Chur, Switzerland, pp. 265-287.
- Bauer W, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M** (1996) Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45: 493-496.
- Beelman RB, Keen RM, Banner MJ, King SW** (1982) Interactions between wine yeast and malolactic bacteria under wine conditions. *Dev Ind Microbial* 23: 107-121.
- Beelman RB, Kunkee RE** (1985) Inducing simultaneous malolactic-alcoholic fermentation in red table wines. In: *Malolactic fermentation*. Lee T.H. (Eds), 97-112, Glen Osmond, South Australia. The Australian Wine Research Institute.
- Blackburn D** (1984) Present technology in the use of malolactic bacteria. *Practical Winery*. 5: 64-72.
- Boles E, De Jong-Gubbels P, Pronk JT** (1998) Identification and characterization of *MAEI*, the *Saccharomyces cerevisiae* structural gene encoding mitochondrial malic enzyme. *J. Bacteriol.* 180: 2875-2882.
- Bolhuis H, Poelarends G, van Veen HW, Poolman B, Driesen AJM, Konings WN** (1995) The lactococcal *lmp* gene encodes a proton motive force-dependent drug transporter. *J. Bio. Chem.* 270: 26092-26098.
- Bony M, Bidart F, Camarasa C, Ansanay V, Dulau L, Barre P, Dequin S** (1997) Metabolic analysis of *S. cerevisiae* strains engineered for malolactic fermentation. *FEBS Letters*. 410: 452-456.

**Bordons A, Cerme Masque M, Vidal M** (1998) Isolation and selection of malolactic bacteria and effect of pesticides. In: "The management of malolactic fermentation and quality of wine, Rencontres Lallemand, Verona 16-17 avril, 17-22.

**Bourdineaud JP, Nehme B, Tesse S, Lonvaud-Funel A** (2003) The *ftsH* gene of the wine bacterium *Oenococcus oeni* is involved in protection against environmental stress. Appl. Environ. Microbiol. 69: 2512-2520.

**Bourdineaud JP, Nehme B, Tesse S, Lonvaud-Funel A** (2004) A bacterial gene homologous to ABC transporters protect *Oenococcus oeni* from ethanol and other stress factors in wine. Int. J. Food. Microbiol. 92: 1-14.

**Britz TJ, Tracey RP** (1990) The combination effect of pH, SO<sub>2</sub>, ethanol and temperature on the growth of *Leuconostoc oenos*. J. Appl. Bacteriol. 68: 23-31.

**Campos FM, Couto JA, Hogg TA** (2003) Influence of phenolic acids on growth and inactivation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii*. J. Appl. Microbiol. 94: 167-174.

**Cannon MC, Pilone GJ** (1993) Interactions between commercial wine yeast and malolactic bacteria. In: The New Zealand Grape and Wine Symposium. Jordan D.T. (Eds) Vol 8, 85-95. The New Zealand Society for Viticulture and Oenology, Auckland, NZ.

**Capucho I, San Romão MV** (1994) Effect of ethanol and fatty acids on malolactic activity of *Leuconostoc oenos*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 42 : 391-395.

**Carrau FM, Neirotti E, Gioia O** (1993) Stuck wine fermentation: effect of killer/sensitive yeast interactions. J. ferment. Bioeng. 76 : 67-69.

**Carre E** (1982) Recherches sur la croissance des bactéries lactiques en vinification. Désacidification biologique des vins. Thèse Doctorat, Université de Bordeaux II.

**Carreté R, Teresa Vidal M, Bordons A, Constanti M** (2002) Inhibitory effect of sulphur dioxide and other stress compounds in wine on the ATPase activity of *Oenococcus oeni*. FEMS Microbiol. Lett. 211: 155-159.

**Cavin JF, Divies C, Guzzo J** (1998) La fermentation malolactique. Dans : *Œnologie, fondements scientifiques et technologiques*, 503-533. Lavoisier (Eds), Paris.

**Charpentier C, Feuillat M** (1993) Yeast autolysis. In: « Wine microbiology and biotechnology » Fleet GH (Ed). Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland, pp 225-242.

**Chu-Ky S, Tourdot-Marechal R, Marechal PA, Guzzo J** (2005) Combined cold, acid, ethanol shocks in *Oenococcus oeni*: Effects on membrane fluidity and cell viability. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1717: 118-124.

**Comitini F, Ferretti R, Clementi F, Mannazzu I, Ciani M** (2004) Interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and malolactic bacteria: preliminary characterization of a yeast proteinaceous compounds active against *Oenococcus oeni*. *J Appl Microbiol* 99: 105-111.

**Costello PJ, Morrison GJ, Lee TH, Fleet GH** (1983) Number of species of lactic acid bacteria in wines during vinification. *Food Technol. Austral.* 35 : 14-18.

**Coucheney F, Gal L, Beney L, Lherminier J, Gervais P, Guzzo J** (2005) A small HSP, Lo18, interacts with the cell membrane and modulates lipid physical state under heat shock conditions in a lactic acid bacterium. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1720: 92-98.

**Cox DJ, Henick-Kling T** (1989) The malolactic fermentation, a chemiosmotic energy yielding (ATP) decarboxylation reaction. *J. Bacteriol.* 171: 5750-5752.

**Cox DJ, Henick-Kling T** (1990) A comparison of lactic acid bacteria for energy-yielding (ATP) malolactic enzyme systems. *Am. J. Enol. Vitic.* 41: 215-218.

**Craig EA, Gambill DB, Nelson RJ** (1993) Heat shock proteins: molecular chaperones of protein biogenesis. *Microbiol. Rev.* 57: 402- 414.

**Cushnie TP, Lambert AJ** (2005) Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 26: 343-356.

**Davis CR, Silveira NFA, Fleet GH** (1985a) Occurrence and properties of bacteriophages of *Leuconostoc oenos* in Australian wines. *Appl. Environ. Microbiol.* 50: 872-876.

**Davis CR, Wibowo D, Eshenbruch R, Lee TH, Fleet GH** (1985b) Am. J. Enol. Vitic. 36: 290-301.

**Davis CR, Wibowo D, Lee TE, Fleet GH** (1986) Growth and metabolism of lactic acid bacteria during fermentation and conservation of some Australian wines. Food Technol. Austral. 38: 35-40.

**Davis CR, Wibowo D, Fleet GH, Lee TE** (1988) Properties of wine lactic acid bacteria, their potential oenological significance. Am. J. Enol. Vitic. 39: 137-142.

**Delfini C, Morsiani MG** (1992) Study on the resistance to sulphur dioxide of malolactic strains of *Leuconostoc oenos* and *Lactobacillus* sp. Isolated from wines. Sciences des Aliments 12: 493-511.

**Dick KJ, Molan PC, Eschenbruch R** (1992) The isolation from *Saccharomyces cerevisiae* of two antibacterial cationic proteins that inhibit malolactic bacteria. Vitis 31: 105-116.

**Dicks LMT, Dellaglio F, Collins MD** (1995) Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni*. Int. J. Syst. Bacteriol. 45: 395-397.

**Dittrich HH** (1987) Mikrobiologie des Weines. Handbuch der Lebensmitteltechnologie. 2<sup>nd</sup> edition, Stuttgart, Ulmer.

**Drichi-Cachon Z** (1995) Mécanismes physiologiques de l'acidophilie de l'espèce *Leuconostoc oenos*. Relation avec le métabolisme du malate. Thèse de Doctorat, Université de Bourgogne.

**Dubourdieu D, Frezier V** (1990) Application de l'électrophorèse en champs pulsés a l'étude écologique des levures en fermentation spontanée. Rev. Fr. Oenol 125, 30: 37-40.

**Edwards CG, Beelman RB** (1987) Inhibition of the malolactic bacterium *Leuconostoc oenos* (PSU-1) by decanoic acid and subsequent removal of the inhibition by yeast ghosts. Am. J. Enol. Vitic. 38: 239-242.

**Edwards CG, Beelman RB, Bartley CE, McConnell AL** (1990). Production of decanoic acid and other volatile compounds and the growth of yeast and malolactic bacteria during vinification. Am. J. Enol. Vitic. 41 : 48-56.

- Eschenbruch R, Bonish P** (1976) The influence of pH on sulfite formation by yeasts. *Archives of Microbiology*. 107: 229-231.
- Farias ME, Rollan GC, Manca de Nadra MC** (1996) Influence nutritional factors on the protease production by *Leuconostoc oenos* from wine. *J. Appl. Bacteriol.* 81: 398-402.
- Farias ME, Manca de Nadra MC** (2000) Purification and partial characterization of *Oenococcus oeni* exoprotease. *FEMS Microbiology. Lett.* 185: 263-266.
- Figueiredo AR, Campos F, de Freitas Victor, Hogg T, Couto JA** (2007) Effect of phenolic aldehydes and flavonoids on growth and inactivation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii*. *Food Microbiol.*
- Field JA, Lettinga G** (1992) Toxicity of tannic compounds to micro-organisms. In: Hemingway RW, Laks PE (Eds), *Plant Polyphenols* Plenum, New-York.
- Fleet GH** (1990) Growth of yeasts during wine fermentations. *J. Wine. Res.* 1: 211-223.
- Fleet GH, Heard GM** (1992) Growth during fermentation. In: *Wine Microbiology and Biotechnology*. GH. Fleet (Eds), 27-54, Harwood Academic Pub, Switzerland.
- Fornairon-Bonnefond C, Camarasa C, Moutounet M, Salmon JM** (2001) Etat des connaissances scientifiques actuelles sur le phénomène d'autolyse des levures et l'élevage des vins sur lies. *J. Int. Sci. Vigne Vin.* 35 : 57-78.
- Fornachon JCM** (1968) Influence of different yeasts on the growth of lactic acid bacteria in wine. *J. Sci. Food. Agric.* 19: 374-378.
- Fortier LC, Tourdot-Marechal R, Divies C, Lee BH, Guzzo J** (2003) Induction of *Oenococcus oeni* H<sup>+</sup>-ATPase activity and mRNA transcription under acidic conditions. *FEMS Microbiol. Lett.* 222: 165-169.
- Fourcassie P, Makaga-Kabinda-Massard A, Belarbi A, Maujean A** (1992) Growth, D-glucose utilization and malolactic fermentation by *Leuconostoc oenos* strains in 18 media deficient in one amino acid. *J. Appl. Bacteriol.* 73: 489-496.

- Frolund B, Griebe T, Nielsen P.H** (1995) Enzymatic activity in the activated sludge floc matrix. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43: 755-761.
- Fuqua C, Winans SC, Greenberg EP** (1996) Census and concensus in bacterial ecosystems : the LuxR-LuxI family of quorum sensing transcriptional regulators. *Ann Rev Microbiol.* 50: 727-751.
- Galland D, Tourdot-Marechal R, Abraham M, Son Chu K, Guzzo J** (2003) Absence of malolactic activity is a characteristic of H<sup>+</sup>-ATPase deficient mutants of the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1973-1979.
- Garvie E** (1967) The growth factor and amino acid requirements of species of the genus *Leuconostoc*, including *Leuconostoc paramesenteroides* (sp.nov) and *Leuconostoc oenos*. *J. Gen. Microbiol.* 48: 439-447.
- Garvie EI** (1986) Genus *Leuconostoc* van Tieghem 1878, 198<sup>AL</sup>. Char. Hucker and Pederson 1930, 66<sup>AL</sup>. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol 2, 1071-1075.
- Gerbeaux V** (1998) Le point sur la maîtrise de la fermentation malolactique par l'ensemencement bactérien des vins. In: *The management of malolactic fermentation and quality of wine*. Rencontres Lallemand (Eds), Verona 16-17 avril, 23-28.
- Gilis JF, Delia-Dupuy ML, Strehaiano P** (1996) Qualitative and quantitative study of interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and *Leuconostoc oenos*. *J. Int. Sci. Vigne Vin.* 30:151-157.
- Gill AO, Holley RA** (2004) Mechanisms of bactericidal action of cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and eugenol against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 5750-5755.
- Goldberg DM, Karumanchiri A, Tsang E, Soleas GJ** (1998) Catechin and epicatechin concentrations of red wines: regional and cultivar-related differences. *Am. J. Enol. Vitic.* 49: 23-34.
- Graca Da Silveira M, Golovina EA, Hoekstra FA, Rombouts FM, Abee T** (2003) Membrane fluidity adjustments in ethanol-stressed *Oenococcus oeni* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 5826-5832.

- Grimaldi A, Mc Lean H, Jiranek V** (2000) Identification and partial characterization of glycosidic activities of commercial strains of the lactic acid bacteria, *Oenococcus oeni*. *Am. J. Enol. Vitic.* 51: 362-369.
- Groenewald M, Viljoen-Bloom M** (2001) Factors involved in the regulation of the *Schizosaccharomyces pombe* malic enzyme gene. *Curr. Genet.* 39 : 222-230.
- Guilloux-Benatier M, Feuillat M, Ciolfi M** (1985) Contribution a l'étude de la dégradation de l'acide L-malique par les bactéries lactiques isolées du vin : effet stimulant des autolysats de levures. *Vitis.* 24, 1 : 59-74.
- Guilloux-Benatier M, Feuillat M** (1993) Incidence de la clarification des mouts de raisin sur les fermentescibilités alcoolique et malolactique. *J. Int. Sci. Vigne Vin.* 27 : 299-311.
- Guilloux-Benatier M, Guerreau J, Feuillat M** (1995) Influence of initial colloid content on yeast macromolecule production and on the metabolism of wine microorganisms. *Am. J. Enol. Vitic.* 46: 486-492.
- Guilloux-Benatier M, Le Fur Y, Feuillat M** (1998) Influence of fatty acids on the growth of wine microorganisms *Saccharomyces cerevisiae* and *Oenococcus oeni*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 20: 144-149.
- Guilloux-Benatier M, Pageault O, Man A, Feuillat M** (2000) Lysis of yeast cells by *Oenococcus oeni* enzymes. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 25: 193-197.
- Guilloux-Benatier M, Chassagne D** (2003) Comparison of components released by fermented or active dried yeasts after aging on lees in a model wine. *J. Agricult. Food Chem.* 51 (3): 746-751.
- Gunnison AF** (1981) Sulphite toxicity: a critical review of *in vitro* and *in vivo* data, *Food and Cosmetic Toxicology.* 19: 667-682.
- Guzzo J, Delmas F, Pierre F, Jobin MP, Samyn B, Van Beeumen J, Cavin JF, Divies C** (1997) A small heat shock protein from *Leuconostoc oenos* induced by multiple stresses and during stationary growth phase. *Lett. Appl. Microbiol.* 24: 393-396.

- Guzzo J, Jobin MP, Divies C** (1998) Increase of sulphite tolerance in *Oenococcus oeni* by means of acidic adaptation. FEMS Microbiol. Lett. 160: 43-47.
- Guzzo J, Jobin MP, Delmas F, Fortier LC, Garmyn D, Tourdot-Maréchal R, Lee B, Divies C** (2000) Regulation of stress response in *Oenococcus oeni* as a function of environmental changes and growth phase. Int. J. Food. Microbiol. 55: 27-31.
- Gyllang H, Winge M, Korch C** (1989) Regulation of SO<sub>2</sub> formation during fermentation. European Brewery convention. In: Proceedings of the 22<sup>nd</sup> Congress, Zurich, 347-354.
- Hayashi M, Ohkuni K, Yamashita I** (1998) An extracellular meiosis-promoting factor in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast. 14: 617-622.
- Heard GM, Fleet GH** (1985) Growth of natural yeast flora during the fermentation of inoculated wines. Appl. Environ. Microbiol. 50: 727-728.
- Heard GM, Fleet GH** (1986) Evaluation of selective media for enumeration of yeasts during wine fermentation. J. Appl. Bacteriol. 60: 477-481.
- Hebert EM, Raya RR, De Giori GS** (2000) Nutritional requirements and nitrogen-dependent regulation of proteinase activity of *Lactobacillus helveticus* CRL 1062. Appl. Environ Microbiol. 66 : 5316-5321.
- Henick-Kling T** (1986) Growth and metabolism of *Leuconostoc oenos* and *Lactobacillus plantarum* in wine. PhD thesis, The University of Adelaide, South Australia.
- Henick-Kling T** (1990) pH and regulation of malolactic activity in *Leuconostoc oenos*. In: Actualités Oenologiques 89. Comptes rendus du 4<sup>e</sup> Symposium International d'Oenologie (Bordeaux, 1989), 320-325, Institut d'Oenologie Université de Bordeaux II, Dunod, Paris.
- Henick-Kling T** (1993) In: Wine Microbiology and Biotechnology. Fleet GH (Ed), Hardwood Academic Publisher, Chur, Switzerland, pp. 289-326.
- Henick-Kling T, Park HY** (1994) Considerations for the use of yeast and bacterial starter cultures: SO<sub>2</sub> and timing of inoculation. Am. J. Enol. Vitic. 45: 464-469.

**Husnik J, Volschenk H, Bauer J, Colavizza D, Luo Z, van Vuuren HJJ** (2006) Metabolic engineering of malolactic wine yeast. *Metabolic Engineering*. 8: 315-323.

**Ingram LO, Butke T** (1984) Effects of alcohols on microorganisms. *Adv. Microb. Physiol.* 25: 254-290.

**Jackson RS** (2000) *Wine Science-Principles, Practice, Perception*, second ed. Academic Press, San Diego, pp 232-270.

**Jobin MP, Delmas F, Garmyn D, Divies C, Guzzo J** (1997) Molecular characterization of the gene encoding an 18-kilodalton small heat shock protein associated with the membrane of *Leuconostoc oenos*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 609-614.

**Jolly NP, Pretorius IS** (2000) The distribution of non-*Saccharomyces cerevisiae* yeast strains in four wine production regions of the western cape, South Africa. Tenth International Symposium on Yeasts, 27 August-1 September 2000, p302. Deft University Press, Papendal, Arnhem, The Netherlands (ISY 10).

**Kelly WJ, Asmundson RV** (1989) Growth of *Leuconostoc oenos* under anaerobic conditions. *Am. J. Enol. Vitic.* 40: 277-282.

**King SW, Beelman RB** (1986) Metabolic interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and *Leuconostoc oenos* in a model grape juice/wine system. *Am. J. Enol. Vitic.* 37: 53-60.

**Kleerebezem M, Quadri LEN, Kuipers OP, de Vos WM** (1997) Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol.* 24: 895-904.

**Krebs HA, Wiggins D, Stubs M, Sols A, Bedoya F** (1983) Studies on the mechanism of the antifungal action of benzoate. *Biochem J.* 214: 657-663.

**Krieger SA, Hammes WP, Henick-Kling T** (1992) Effect of medium composition on growth rate, growth yield, and malolactic activity of *Leuconostoc oenos* LoZH<sub>1-t7-1</sub>. *Food Microbiol.* 9: 1-11.

**Kroll RG, Booth IR** (1983) The relationships between intracellular pH, the pH gradient and potassium transport in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 216: 709-716.

**Konings WN, Poolman B, van Veen HW** (1994) Solute transport and energy transduction in bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 65: 369-380.

**Lamarque M, Charbonnel P, Aubel D, Piard JC, Atlan D, Juillard V** (2004) A multifunction ABC transporter (Opt) contributes to diversity of peptide uptake specificity within the genus *Lactococcus*. *J Bacteriol.* 186: 6492-6500.

**Lange H, Bavouzet J.M, Taillandier P, Delorme C** (1993) Systematic error and comparison of four methods for assessing the viability of *Saccharomyces cerevisiae* suspensions. *Biotechnology Techniques.* 7-3: 223-228.

**Lafon-Lafourcade S** (1970) Etude de la dégradation de l'a. L-malique par les bactéries lactiques non proliférantes isolées des vins. *Ann Technol Agric* 19: 141-154.

**Lafon-Lafourcade S** (1981) Connaissance actuelle dans la maîtrise de la fermentation malolactique dans les mouts et les vins. In : *Actualités Œnologiques et Viticoles*. Ribereau-Gayon P, Sudraud P (Eds), 243-251, Dunod, Paris.

**Lafon-Lafourcade S, Carre E, Ribereau-Gayon P** (1983) Occurrence of lactic acid bacteria during different stages of vinification and conservation of wines. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 874- 880.

**Lafon-Lafourcade S, Ribereau-Gayon P** (1984) Evolution of yeasts and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux wines. *Appl. Environ. Microbiol.* 48 : 1034-1038.

**Lafon-Lafourcade S, Ribereau-Gayon P** (1984) Les altérations des vins par les bactéries acétiques et les bactéries lactiques. *Connaiss. Vigne Vin.* 18: 67-82.

**Lema C, Garcia-Jares C, Orriols I, Angulo L** (1996) Contribution of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* populations to the production of some components of Albarino wine aroma. *Am. J. Enol. Vitic.* 47, 2: 206-216.

**Lemaresquier H** (1987) Inter-relationships between strains of *Saccharomyces cerevisiae* from the Champagne area and lactic acid bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.* 4: 91-94.

**Lindquist S, Craig EA** (1988) The heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* 22: 631-677.

**Liu JWR, Gallander JF** (1982) Effect of insoluble solids on the sulphur dioxide and rate of malolactic fermentation in white table wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 33: 194-197.

**Liu JWR, Gallander JF** (1983) Effect of pH and sulphur dioxide on the rate of malolactic fermentation in red table wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 34: 44-46.

**Lonvaud-Funel A, Joyeux A, Dessens C** (1988) Inhibition of malolactic fermentation of wines by products of yeast metabolism. *J. Sci. Food. Agric.* 44: 183-191.

**Lonvaud-Funel A** (1992) Evolution des populations bactériennes pendant la vinification. Métabolismes. In : Les acquisitions récentes en microbiologie du vin. 43-56. Tec et Doc (Eds), Lavoisier, Paris.

**Loubiere P, Novak L, Coccagn-bousquet M, Lindley ND** (1996) Besoins nutritionnels des bactéries lactiques : interactions des flux de carbone et d'azote. *Lait* 76: 5-12.

**Macheix JJ, Fleuriet A, Billot J** (1990) Phenolic compounds in fruit processing. In: *Fruit Phenolics*. CRC Press, Boca Raton, FL pp. 1-91 and 323-332.

**Manca de Nadra MC, Strasser de Saad AM** (1987) Evolution of lactic acid bacteria during the different stages of vinification of Cafayete (Argentina) wine. *Microbiol. Alim. Nutrition.* 5: 235-240.

**Manca de Nadra MC, Strasser de Saad AM** (1990) Evolution of lactic acid bacteria during the different stages of vinification of Cafayete (Argentina) wine. In: *Actualités Œnologiques 1989*. Ribereau-Gayond P, Lonvaud A (Eds), 367-371. Bordas, Paris.

**Mantis NJ, Winans SC** (1992) Characterization of the *Agrobacterium tumefaciens* heat shock response : evidence for a  $\sigma^{32}$ -like sigma factor. *J. Bacteriol.* 174: 991-997.

- Martini A, Ciani M, Scorzetti G** (1996) Direct enumeration and isolation of wine yeasts from grape surfaces. *Am. J. Enol. Vitic.* 47: 435-440.
- Martinez-Rodriguez AJ, Carrascosa AV, Polo MC** (2001) Release of nitrogen compounds to the extracellular medium by three strains of *Saccharomyces cerevisiae* during induced autolysis in a model wine system. *Int. J. Food. Microbiol.* 68: 155-160.
- Masneuf I** (1996) Recherche sur l'identification génétique des levures de vinification. Applications œnologiques. Thèse de Doctorat de l'Université de Bordeaux II.
- Mc Donald LC, Fleming HP, Hassan HM** (1990) Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 2120-2124.
- Meers JL** (1973) Growth of bacteria in mixed cultures. *Crit. Rev. Microbiol.* 2: 139-184.
- Miller GL** (1959) Use of DNS Acid Reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chem* 31: 426-428.
- Moore KJ, Johnson MG, Morris JR** (1988) Indigenous yeast microflora on Arkansas white *Riesling* (*Vitis Vinifera*) grapes and in model must systems. *J. Food. Sci.* 53: 1725-1728.
- Mora J, Barbas JJ, Mulet A** (1990) Growth of yeast species during the fermentation of musts inoculated with *Kluveromyces thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Am. J. Enol. Vitic.* 41: 156-159.
- Morishita T, Deguchi Y, Yajima M, Sakurai T, Yura T** (1981) Multiple nutritional requirements of lactobacilli : genetic lesions affecting amino acid biosynthetic pathways. *J. Bacteriol.* 148: 64-71.
- Nissen P, Nielsen D, Arneborg N** (2003) Viable *Saccharomyces cerevisiae* cells at high concentrations cause early growth arrest of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures by a cell-cell contact-mediated mechanism. *Yeast.* 20: 331-341.
- Nygaard M, Prahl C** (1996) Compatibility between strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Leuconostoc oenos* as an important factor for successful malolactic fermentation. *Proceedings of the*

Fourth International Symposium on Cool-Climate Viticulture and Oenology, 16-20 July, Rochester, NY, USA, V1-103-V1-106.

**O'Connor DO, Rubino JR** (1991) Phenolic compounds. In: Block SS (Ed), *Desinfection, Sterilization and Preservation*, fourth ed. Lea and Febiger, Philadelphia, pp 204-224.

**Olivier C, Stonestreet T, Larue F, Dubourdieu D** (1987) Incidence de la composition colloïdale des mouts blancs sur leur fermentescibilité. *Conn. Vigne et Vin*. 21: 59-70.

**Olsen EB, Russel JB, Henick-Kling T** (1991) Electrogenic L-malate transport by *Lactobacillus plantarum*: a basis for energy derivation from malolactic fermentation. *J. Bacteriol.* 173: 6199-6206.

**Osborne JP, Edwards CG** (2006) Inhibition of malolactic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* during the alcoholic fermentation under low and high nitrogen conditions: a study in synthetic media. *Australian Journal of Grape and Wine Research*.12: 69-78.

**Osborne JP, Edwards CG** (2007) Inhibition of malolactic fermentation by a peptide produced by *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. *Int. J. Food Microbiol* 118: 27-34.

**Osothsilp C, Subden RE** (1986) Isolation and characterization of *Schizosaccharomyces pombe* mutants with defective NAD-dependent malic enzyme. *Can. J. Microbiol.* 32: 481-486.

**Osothsilp C** (1987) Genetic and biochemical studies of malic acid metabolism in *Schizosaccharomyces pombe*. PhD thesis, University of Guelph, Ontario, Canada.

**Palková Z, Janderová B, Gabriel J** (1997) Ammonia mediates communication between yeast colonies. *Nature*. 390: 532-536.

**Patynowski RJ, Jiranek V, Markides AJ** (2002) Yeast viability during fermentation and sur lie ageing of a defined medium and subsequent growth of *Oenococcus oeni*. *Austr. J. Grape Wine Res.* 8: 62-69.

**Peynaud E** (1984) *Connaissance et travail du vin*. Dunod (Ed), Paris.

**Pilone GJ, Kunkee RE** (1976) Stimulatory effect of malolactic fermentation on the growth rate of *Leuconostoc oenos*. Appl. Environ. Microbiol. 32: 405-408.

**Poulard A, Reberteau R, Rousset Y** (1985) La microflore des phases préfermentaires. Rev. Fr. Oenol. 99: 14-19.

**Poolman B** (1993) Energy transduction in lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 12: 125-148.

**Radler F** (1963) Über die Milchsäurebakterien des Weins und den biologischen Säureabbau II. Physiologie und Ökologie der Bakterien. Vitis. 3: 207-236.

**Rainieri S, Zambonelli C, Giudici P, Castellari L** (1998a) Characterization of thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* hybrids. Biotechnol. Lett. 20: 543-547.

**Rainieri S, Zambonelli C, Tini V, Castellari L, Giudici P** (1998b) The oenological traits of thermotolerant *Saccharomyces* strains. Am. J. Enol. Vitic. 49: 319-324.

**Ramon-Portugal F, Riba JP, Strehaiano P** (1994) Effet « killer » : analyse cinétique et modélisation. Actes Coll. 8-10.03, 549-554. Dijon SFM (Ed).

**Ramon-Portugal F** (1995) Interaction de type killer entre levures : Analyse cinétique, co-culture et modélisation. Thèse Doctorat Institut National Polytechnique, Toulouse, 1995.

**Ramos-Nino ME, Ramirez-Rodriguez CA, Clifford MN, Adams MR** (1998) QSARS for the effect of benzaldehydes on foodborne bacteria and the role of sulfhydryl groups as targets of their antibacterial activity. J. Appl. Microbiol. 84 : 207-212.

Recueil des Méthodes Analytiques de l'OIV, 1974.

**Reguant C, Bordons A, Arola L, Rozes N** (2000) Influence of phenolic compounds on the physiology of *Oenococcus oeni* from wine. J. Appl. Microbiol. 88: 1065-1071.

**Remize F, Gaudin A, Kong Y, Guzzo J, Alexandre H, Krieger S, Guilloux-Benatier M** (2006) *Oenococcus oeni* preference for peptides : qualitative and quantitative analysis of nitrogen assimilation. Arch Microbiol. 185: 459-469.

**Ribéreau-Gayon J, Peynaud E, Ribéreau-Gayon P, Sudraud P** (1975) *Traité d'œnologie. Science et technique du vin, Tome II*, 548-551, Dunod (Ed), Paris.

**Ribéreau-Gayon P, Glories Y, Maujean A, Dubardieu D** (2000) Phenolic compounds In : *Handbook of Enology, vol 2*. Wiley, Chichester pp, 129-183.

**Rollan GC, Farias ME, Strasser de Saad AM, Manca de Nadra MC** (1998) Exoprotease activity of *Leuconostoc oenos* in stress conditions. *J. Appl. Microbiol.* 85: 219-223.

**Romano P, Suzzi G** (1992) Sulphur dioxide and wine micro-organisms. In: *Wine Microbiology and Biotechnology*. Fleet G (Ed), 373-394. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland.

**Romano P, Suzzi G** (1993) Potential use for *Zygosaccharomyces* species in winemaking. *J. Wine. Research.* 4, 2 : 87-94.

**Rosa F, Sa-Correia I** (1992) Ethanol tolerance and activity of plasma membrane ATPase in *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb. Technol.* 14: 23-27.

**Rosi I, Gheri A, Domizio P, FIA G** (1998) Production de macromolécules pariétales de *Saccharomyces cerevisiae* au cours de la fermentation et leur influence sur la fermentation malolactique. *Rev. Oenol.* 94 : 18-20.

**Sakamoto K, Margolles A, van Veen HW, Konings WN** (2001) Hop resistance in the beer spoilage bacterium *Lactobacillus brevis* is mediated by the ATP-binding cassette multidrug transporter HorA. *J. Bacteriol.* 183: 5371-5375.

**Salgado E** (1999) Conception et mise en œuvre d'un bioréacteur a membranes pour l'étude de la dynamique de populations mixtes de micro-organismes. Thèse Doctorat Institut National Polytechnique de Toulouse, 1999.

**Sanders JW, Venema G, Kok J** (1999) Environmental stress responses in *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol. Rev.* 23 : 483-501.

**Santos MHS** (1996) Biogenic amines: their importance in foods. *Int. J. Food. Microbiol.* 29: 213-231.

**Sapis JC** (1995) La macération pelliculaire préfermentaire en vinification en blanc. Incidence sur les caractéristiques analytiques et organoleptiques des vins. Rev. Fr. Oenol. 153 : 24-27.

**Sato M, Suzuki Y, Kanamure K, Katoh I, Yagi Y, Otsuka K** (1997) Winemaking from Koshu variety by the sur lie method: behavior of free aminoacids and proteolytic activity. Am. J. Enol. Vitic. 48: 1-6.

**Da Silveira MG, San Romao MV, Loureiro-Dias MC, Rombouts FM, Abee T** (2002) Flow cytometric assessment of membrane integrity of ethanol-stressed *Oenococcus oeni* cells. Appl. Environ. Microbiol. 68 : 6087-6093.

**Somers TC, Wescombe LG** (1987) Evolution of red wines. II. An assessment of the role of acetaldehyde. Vitis. 26: 27-36.

**Soufleros E, Barrios ML, Bertrand A** (1998) Correlation between the content of biogenic amines and other wine compounds. Am. J. Enol. Vitic. 49: 266-278.

**Strasser de Saad AM** (1983) Enzima malolactica on *Lactobacillus murinus* CNRZ 2313. These Universidad Nacional de Tucuman. Facultad de Biochimica, Quimica y Farmacia. Argentina.

**Stevens S, Hofemyer JHS** (1993) Effects of ethanol, octanoic and decanoic acids on fermentation and the passive influx of protons through the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 38: 656-663.

**Suzzi G, Romano P, Zambonelli C** (1985) *Saccharomyces* strain selection in minimizing SO<sub>2</sub> requirement during vinification. Am. J. Enol. Vitic. 36: 199-202.

**Taillandier P, Riba JP, Strehaiano P** (1988) Malate utilization by *Schizosaccharomyces pombe*. Biotechnol. Lett. 10: 469-472.

**Taillandier et Strehaiano** (1991) The role of L-malic acid in the metabolism of *Schizosaccharomyces pombe*: substrate consumption and cell growth. Appl. Microbiol. Biotechnol. 35: 541-543

**Taillandier P, Gilis M, Strehaiano P** (1995) Deacidification by *Schizosaccharomyces* : interactions with *Saccharomyces*. J. Biotechnol. 40: 199-205.

**Taillandier P, Tataridis P, Strehaiano P** (2002) A quantitative study of antagonism between *Saccharomyces cerevisiae* and *Oenococcus oeni*. Lallemand Technical Meetings Symposium 10, Biarritz. pp 21-26.

**Tourdot-Maréchal R, Fortier LC, Guzzo JLB, Divies C** (1999) Acid sensitivity of neomycin-resistant mutants of *Oenococcus oeni*: a relationship between reduction of ATPase activity and lack of malolactic activity. FEMS Microbiol. Lett. 178: 319-326.

**Tsvetkova NM, Horvath I, Torok Z, Wolkers WF, Balogi Z, Shigapova L, Crowe LM, Tablin F, Vierling E, Crowe JH, Vigh L** (2002) Small heat shock proteins regulate membrane lipid polymorphism. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99: 13504-13509.

**van Veen HW, Venema K, Bolhuis H, Oussenko I, Kok J, Poolman B, Driessen AJM, Konings WN** (1996) Multidrug resistance mediated by a bacterial homologue of the human multidrug transporter MDR1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93 : 10668-10672.

**Verachtert H, Shanta Kumara HMC, Dawoud E** (1990) Yeasts in mixed cultures with emphasis on lambic beer brewing. In: Yeasts in Biotechnology and Biocatalysis. Verachtert H, De Mot R (Eds), pp 429-449. Marcel Dekker, New York.

**Vivas N, Bellemère L, Lonvaud-Funel A, Glories Y** (1995) Etudes sur la fermentation malolactique des vins rouges en barrique et en cuves. Rev. Fr. Oenol. 149: 37-42.

**Vivas N, Augustin M, Lonvaud-Funel A** (2000) Influence of oak wood and grape tannins on the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni* (*Leuconostoc oenos*, 8413). J. Sci. Food. Agric. 80: 1675-1678.

**Volschenk H, Viljoen M, Grobler J, Petzold B, Bauer F, Subden RE, Young RA, Lonvaud A, Denayrolles M, van Vuuren HJJ** (1997) Engineering pathways for malate degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. Nat. Biotechnol. 15: 253-257.

**Weiller HG, Radler F** (1972) Vitamin und Aminosäurebedarf von Milchsäurebakterien aus Wein und von Rebenblättern, Mitteilungen Klosterneuburg. 22: 4-18.

**Wibowo D, Eschenbruch RE, Davis CR, Fleet GH, Lee TH** (1985) Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine. A review. Am. J. Enol. Vitic. 36: 302-313.

**Wibowo D, Fleet GH, Lee TH, Eschenbruch RE** (1988) Factors affecting the induction of malolactic fermentation in red wines with *Leuconostoc oenos*. J. Appl. Bacteriol. 64: 421-428.



## *Articles et Communications*



## I- Articles

**Strehaiano P, Nehme N, Renouf V, Lonvaud-Funel A, Mathieu F, Taillandier P (2008) Microbial interactions in winemaking.** In: Current Topics on Bioprocesses in Food Industry. Koutinas AA, Pandey A and Larroche C (Eds), Asiatech Publishers, Inc., New Delhi. ISBN: 81-87680-17-2. Ch 20, pp. 296-311.

**Nehme N, Mathieu F, Taillandier P (2008) Quantitative study of interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and *Oenococcus oeni* strains.** Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. DOI 10.1007/s10295-008-0328-7.

**Nehme N, Mathieu F, Taillandier P. Impact of the co-culture of *Saccharomyces cerevisiae*-*Oenococcus oeni* on malolactic fermentation and partial characterization of an inhibitory peptide.** Soumis au International Journal of Food Microbiology.

**Nehme N, Mathieu F, Taillandier P (2007) Co-culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Oenococcus oeni*: a new strategy for the improvement of malolactic fermentation. Studies in a membrane bioreactor under different gas conditions.** In : Oenologie 2007 8<sup>e</sup> Symposium international d'œnologie, Conférence Oeno 2007, Bordeaux (France), 25-27 juin 2007.

## II- Congrès :

**Co-culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Oenococcus oeni*: a new strategy for the improvement of malolactic fermentation. Studies in a membrane bioreactor under different gas conditions.** Nehme N, Mathieu F, Taillandier P, VIII<sup>ème</sup> Symposium International d'Œnologie, Bordeaux-France, Juin 2007.

***Oenococcus oeni* growth and malolactic activity: effect of adaptation to ethanol and addition of a nutrient complement.** Nehme N, Mathieu F, Taillandier P, International Congress on Bioprocesses in Food Industries, Patras-Grèce, Juin 2006.