

Intérêt et analyse de nutriments pour les bactéries lactiques du vin

Ramón MIRA DE ORDUÑA HEIDINGER¹, Changins | Haute école de viticulture et œnologie, 1260 Nyon
¹Avec la collaboration technique d'A. Sudano.

Renseignements: Ramón Mira de Orduña Heidinger, e-mail: ramon.mira@changins.ch, tél. +41 22 363 40 94, www.changins.ch



Chimie analytique à Changins: chromatographe en phase liquide à ultra-haute pression pour analyses diverses (à gauche) et spectromètre d'absorption atomique pour les éléments (à droite).

Introduction

Le bon déroulement des fermentations alcoolique (FA) et malolactique (FML) est essentiel pour la qualité des vins. Les carences nutritionnelles peuvent causer des fermentations languissantes ou des arrêts de fermentations, ou encore amener à la formation de composés aromatiques non désirables. Pour assurer une nutrition adéquate aux levures lors de la FA, il est fréquent d'utiliser des nutriments et un grand nombre

de produits commerciaux existant sur le marché. En revanche, l'utilisation de nutriments pour la FML est marginale. Cependant, cette différence ne correspond pas aux besoins des organismes d'un point de vue microbiologique. Il est possible de cultiver des levures dans des milieux définis contenant une demi-douzaine de constituants. En revanche, les bactéries lactiques (BL) du vin ont perdu plusieurs voies de biosynthèse au long de leur évolution et ont ainsi besoin d'un grand nombre de constituants, notamment des acides

aminés et des vitamines. Terrade *et al.* (2009) ont proposé 44 constituants pour un milieu assurant une croissance vigoureuse des BL du vin. Basées sur ce milieu, des études approfondies (Terrade et Mira de Orduña 2009) ont révélé l'existence de différences significatives entre les besoins nutritionnels essentiels de plusieurs souches œnologiques de *Lactobacillus* spp. et *Oenococcus oeni*. (fig.1): les similarités au sein des genres étaient de 86 % pour *Lactobacillus* spp. et de 79 % pour *O. oeni*, ces dernières manifestant des besoins significatifs en certains acides aminés. En revanche, les souches de *Lactobacillus* exigeaient une vitamine supplémentaire (tabl.1).

Afin de pouvoir estimer l'importance des nutriments pour la croissance et le déroulement de la FML, ce travail a évalué la composition de différentes préparations nutritives commerciales et expérimentales destinées à favoriser la FML, ainsi que leur effet sur la viabilité de quelques souches de BL du vin.

Tableau 1 | Liste de nutriments essentiels pour quatre souches de bactéries lactiques. Le nombre en parenthèses indique le nombre de sous-cultures nécessaires pour déterminer le caractère essentiel d'un constituant

Nutriment	<i>O. oeni</i> R1034	<i>O. oeni</i> R1054	<i>L. buchneri</i> CUC-3	<i>L. hilgardii</i> MHP
D-ribose	+ (1)	+ (1)	+ (1)	+ (1)
L-glycine	+ (1)	+ (1)		
L-valine	+ (1)	+ (1)	+ (1)	+ (1)
L-leucine	+ (1)	+ (1)	+ (1)	+ (1)
L-isoleucine	+ (1)	+ (1)	+ (1)	+ (1)
L-serine		+ (1)		
L-thréonine	+ (1)	+ (1)		
L-cystéine	+ (1)	+ (1)		+ (1)
L-méthionine	+ (1)	+ (1)		
L-asparagine		+ (1)		
L-ac. glutamique		+ (1)		+ (1)
L-arginine	+ (1)	+ (1)	+ (3)	+ (1)
L-histidine	+ (1)	+ (1)		
L-phénylalanine	+ (1)	+ (1)		+ (1)
L-tyrosine	+ (1)	+ (1)		
L-tryptophane	+ (1)	+ (1)		
L-proline	+ (3)	+ (2)	+ (3)	+ (2)
Ac. nicotinique (B3)	+ (3)	+ (3)	+ (3)	+ (3)
Ca-D-ac. pantothénique (B5)	+ (3)	+ (3)	+ (3)	+ (3)
Riboflavine (B2)			+ (3)	+ (3)
MnSO ₄ 4 H ₂ O	+ (3)	+ (3)	+ (3)	+ (3)
K ₂ HPO ₄	+ (1)	+ (1)	+ (1)	+ (1)

Résumé

Les bactéries lactiques ont des besoins nutritionnels importants. Un manque de nutriments dans le vin peut retarder ou entraver le déclenchement de la fermentation malolactique (FML). Dans ce travail, la composition de plusieurs produits nutritionnels destinés aux bactéries a été évaluée, ainsi que leur effet sur la viabilité bactérienne. L'analyse des éléments, acides aminés et vitamines a mis en évidence une variation significative entre ces produits. Leur effet sur la viabilité bactérienne dépendait fortement de la souche testée. Une corrélation entre la teneur d'un produit en vitamine B5 et son effet sur la viabilité de trois souches bactériennes a pu être établie. Les résultats soulignent aussi l'importance des conditions de stockage des produits sur les concentrations en vitamines qui sont essentielles pour les bactéries du vin.

Matériel et méthodes

Tous les produits nutritionnels étaient basés sur des extraits de levure et fournis par la société Lallemand. Les produits 1–4 étaient des nutriments commerciaux et 5–6 des produits expérimentaux. Pour les analyses et les incubations (30 °C), tous les produits ont été dissous à 200 mg/l dans un vin synthétique contenant 3,5 g/l ac. L-malique, 0,5 g/l ac. citrique, 3 g/l ac. tartrique, 1 g/l fructose, 0,5 g/l glucose, 12,5 % (v/v) éthanol (pH 4,5). Pour les incubations, une souche de *Lactobacillus plantarum* et deux souches d'*Oenococcus oeni* (toutes commerciales) ont été utilisées (1 x 10⁶ ufc/ml) >

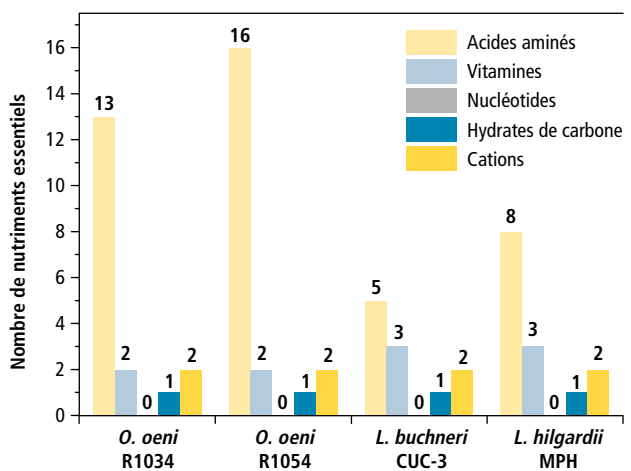


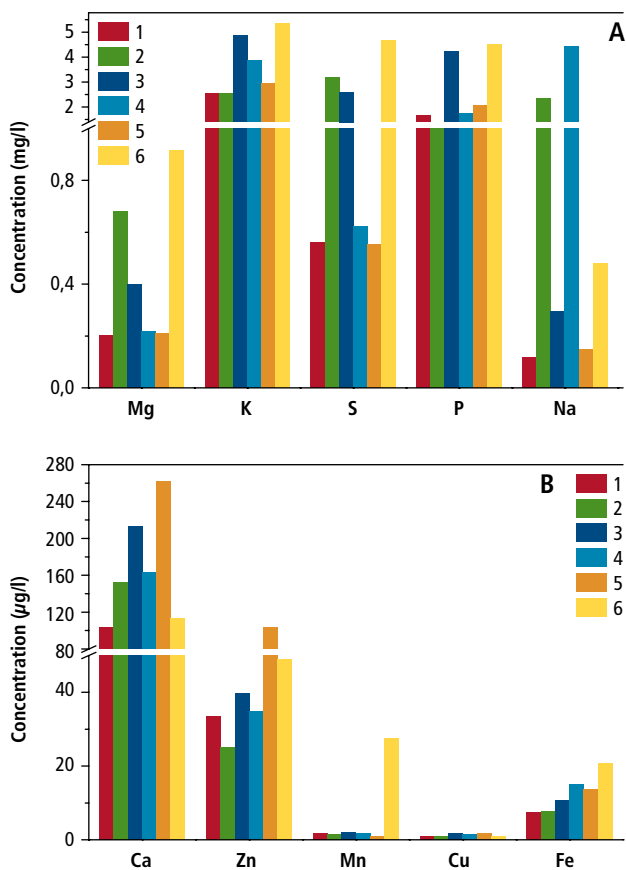
Figure 1 | Nombre de constituants essentiels pour quatre souches de bactéries lactiques du vin, déterminés selon la technique d'omission individuelle.

après isolation sur plaques MRS. La viabilité a été quantifiée par énumération d'échantillons dilués sur plaques MRS. L'analyse élémentaire a été réalisée par ICP-AES après digestion au HNO₃ assisté par microondes (Méthode EPA 3015-6010). Les acides aminés ont été quantifiés par RP-HPLC avec détection à l'UV/Fluorescence après dérivatisation par OPA ou FMOC (Terrade et Mira de Orduña 2006). Les vitamines ont été déterminées après séparation sur colonne C18 (vitamines lipophiles) ou HILIC (vitamines hydrophiles) par UHPLC-ESI-QTOF (6540, Agilent, Santa Clara, CA).

Résultats

L'analyse élémentaire a montré que les concentrations en métaux lourds (Co, Pb, Ni, As) étaient inférieures à 4 µg/l dans les solutions de 200 mg/l de tous les produits. Pour les autres éléments, les concentrations variaient significativement entre les différents produits (fig. 2a/b).

L'analyse a mis en évidence que la stabilité des vitamines dépendait significativement du stockage des solutions. Les résultats définitifs montrés ici ont été



Figures 2a/b | Concentration en quelques éléments après solution (200 mg/l) de six produits nutritionnels dans un vin synthétique.

obtenus immédiatement après solution. Les vitamines ont également fortement varié entre les produits (fig. 3). L'échelle de la figure 3 étant logarithmique, le produit 3 contenait ainsi environ 40 fois moins d'acide nicotinique que la moyenne de tous les autres produits et le produit 4 près de 45 fois moins d'acide pantothénique que la moyenne des autres produits.

La figure 4 illustre la variabilité des concentrations en acides aminés (AA) libres dans les différents produits. Les concentrations étaient faibles (0,1–3,45 mg/l), la cystéine ne pouvant pas être quantifiée avec la méthode choisie. En plus des AA protéinogéniques, les métabolites de la dégradation d'arginine, l'ornithine et la citrulline, ont pu être quantifiés.

La comparaison des effets des produits nutritionnels sur la viabilité bactérienne a mis en évidence un effet dû à la souche (tabl. 2). Par conséquent, il n'a pas été possible d'identifier quel produit aurait assuré la meilleure viabilité aux trois souches testées. Cepen-

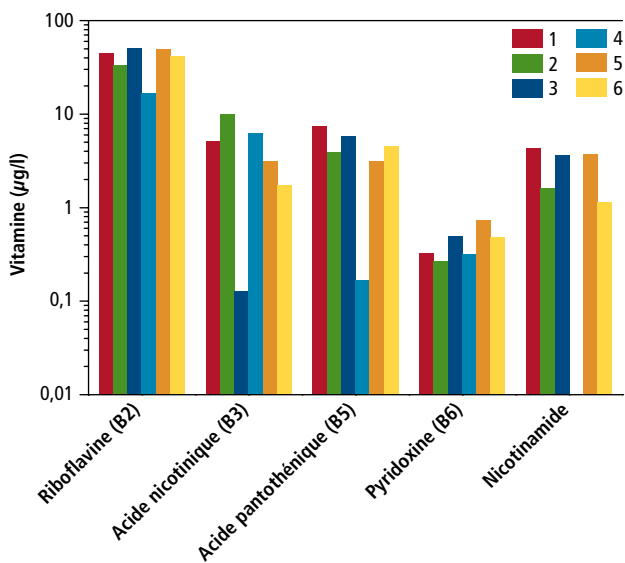


Figure 3 | Concentration en vitamines après solution (200 mg/l) de six produits nutritionnels dans un vin synthétique.

Tableau 2 | Effet de six produits nutritionnels dissous dans un vin synthétique (à 200 mg/l) sur la viabilité de trois bactéries lactiques

	<i>Lb. plantarum</i> spp.	<i>O. oeni</i> A	<i>O. oeni</i> B
Bonne viabilité	1	3	6
	3	6	1
	5	1	2
	6	5	3
	2	2	5
	4	4	Témoin
Mauvaise viabilité	Témoin	Témoin	4

lant, l'essai a montré que le produit 4 n'améliorait pas la viabilité par rapport aux témoins et qu'il ne permettait pas une dégradation complète de l'acide L-malique dans les incubations.

Après incubation (post-FML pour les produits 1-3, 5, 6), les concentrations en AA libres ont été quanti-

fiées encore une fois et comparées avec celles d'avant l'inoculation (fig. 5). Une dégradation partielle, voire complète, est obtenue pour presque tous les AA. Dans quelques incubations, les concentrations en AA libres ont augmenté, notamment celles en ornithine et citrulline.

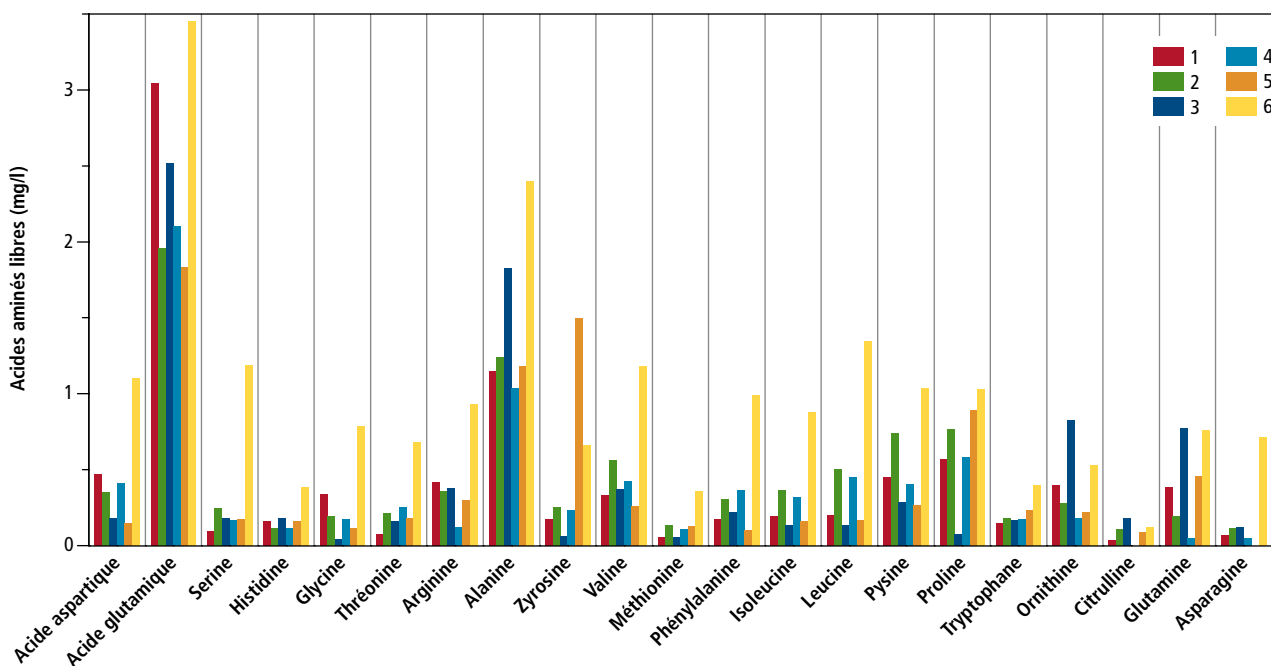


Figure 4 | Concentration en acides aminés libres après solution (200 mg/l) de six produits nutritionnels dans un vin synthétique.

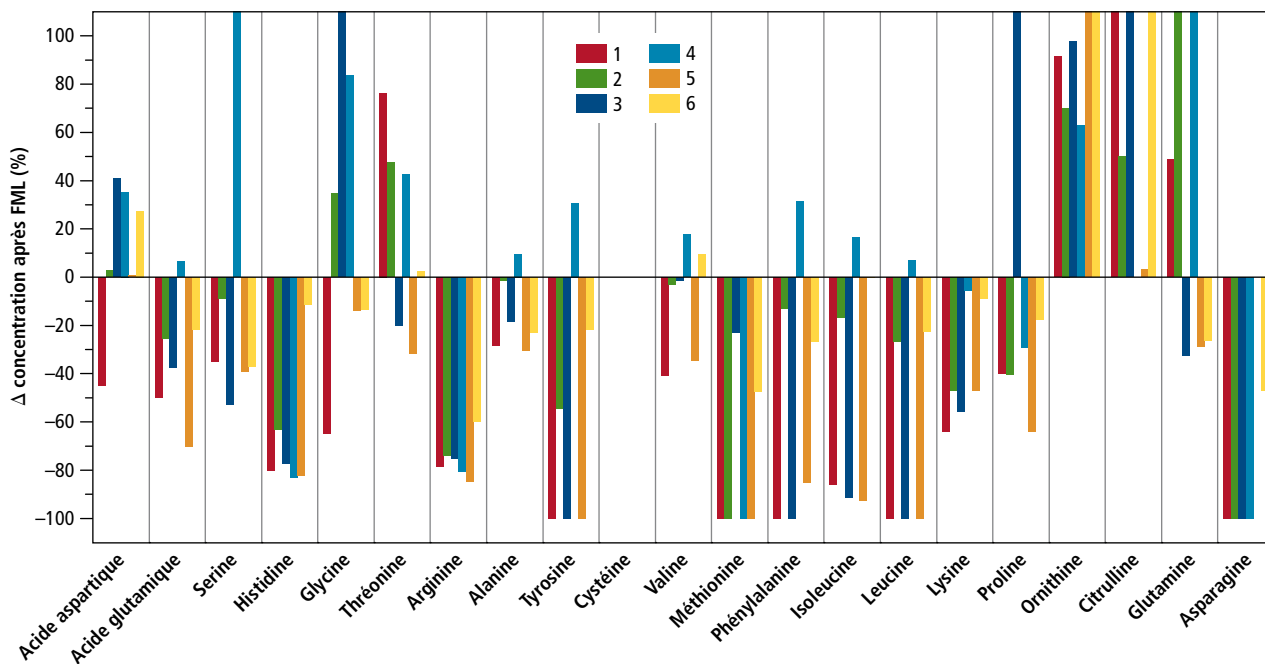


Figure 5 | Changement (en %) des concentrations en acides aminés libres après FML par trois souches de bactéries lactiques (moyenne des données pour les trois souches).

Discussion et conclusions

- Bien que les extraits de levures soient utilisés de manière généralisée en industrie alimentaire et en microbiologie industrielle (et donc en œnologie), très peu de données récentes ont été publiées sur leur composition.
- Tous les produits nutritionnels étudiés étaient basés sur des extraits de levures naturelles. Cependant, des variations significatives ont été enregistrées pour tous les paramètres analysés: éléments, vitamines et acides aminés (AA).
- Parmi les éléments, le manganèse est essentiel pour les bactéries du vin (Terrade et Mira de Orduña 2009) et les concentrations basses trouvées dans tous les produits pourraient avoir un caractère limitant, sauf dans le n° 6, un produit expérimental associé à une bonne viabilité des deux souches d'*O. oeni* testées. Ces résultats corroborent les conclusions d'autres auteurs qui ont souligné l'importance du manganèse pour les bactéries lactiques du vin (Theobald et al. 2005a; Theobald et al. 2005b). Cependant, les données sur les concentrations habituelles de manganèse dans les vins sont rares. Il serait donc prématuré à l'heure actuelle de proposer l'addition systématique de manganèse à des produits nutritionnels.
- Les publications détaillant les concentrations en AA dans les extraits de levures et leurs dérivés sont également peu nombreuses. Les manuels de la société Difco (Anonyme 2006; Zimbro et al. 1998) contiennent des tableaux de concentrations d'acides aminés libres et totaux (après hydrolyse) de leurs extraits de levures pour laboratoires. La teneur en AA totaux est généralement inférieure à 1 % (p/p) pour la cystéine et de 1–10 % (p/p) pour d'autres AA, l'acide glutamique et l'alanine pouvant atteindre jusqu'à 15 % (p/p). En se basant sur une solution imaginaire de 200 mg/l, ces concentrations équivalraient à 2–30 mg/l d'AA totaux, dont environ 60 % d'AA libres. Les concentrations d'AA libres déterminées dans notre étude étaient considérablement plus basses. En admettant que les teneurs en AA totaux des produits nutritifs sont proches des produits de laboratoire puisqu'il s'agit d'extraits secs dans les deux cas, on peut estimer que seuls ~10 % des AA étaient présents sous forme libre dans les produits testés de cette étude, sauf dans le produit 6 expérimental.
- L'existence d'un «réservoir» d'AA a pu être établie lors des dosages post-FML, car les concentrations en plusieurs AA libres s'étaient considérablement élevées. L'augmentation de la citrulline et de l'ornithine provient de la dégradation d'arginine par la voie métabolique arginine déiminase (Liu et Pilon 1998; Mira de Orduña et al. 2000). Cependant, l'élévation des concentrations d'autres AA libres suggère des activités protéases (Fariás et Manca de Nadra 2000; Remize et al. 2005). Quelques AA – dont certains essentiels pour les bactéries lactiques comme les AA branchés (tabl.1) – ont été épuisés dans la plupart des incubations, ce qui peut avoir contribué à une limitation nutritionnelle. Toutefois, aucune corrélation n'a pu être statistiquement établie entre les concentrations en AA libres et leurs effets sur la viabilité bactérienne.
- Il a été démontré que la vitamine B5 est essentielle pour des souches de *Lactobacillus* sp. et *Oenococcus* sp. (Terrade et Mira de Orduña 2009). Le présent travail a permis d'établir une corrélation entre la très faible concentration en acide pantothénique (B5) du produit 4 et l'incapacité de celui-ci à améliorer la viabilité des trois souches testées par rapport au témoin sans nutriments ajoutés. L'analyse des vitamines a par ailleurs montré que le stockage des échantillons jouait un rôle essentiel dans les concentrations retrouvées. Cette observation confirme la sensibilité des vitamines aux températures élevées, à la lumière et à l'oxydation.
- Le succès d'une FML dépend d'un certain nombre de facteurs, notamment de la température et de la concentration en éthanol et en SO₂ libre et combiné (Krieger-Weber 2009). Il est donc difficile de prédire l'effet d'un produit nutritionnel particulier dans le cadre d'une vinification spécifique. Cependant, cette étude montre qu'un effort plus soutenu devrait être investi pour mieux caractériser et standardiser les produits nutritionnels œnologiques, ainsi que pour étudier et définir des conditions de stockage qui garantissent la conservation de leur constituants actifs, et notamment des vitamines. ■

Summary **Importance and analysis of nutrients for wine lactic acid bacteria**

Lactic acid bacteria have stringent nutritional requirements. A lack of suitable nutrients can delay or prevent the onset of MLF. This work evaluated the composition of various nutrient formulations intended for bacteria, as well as their effect on bacterial viability. The analysis of elements, amino acids and vitamins revealed significant variations among these products and their effect on bacterial viability was strain dependent. A correlation between the vitamin B5 content in one nutrient and its effect on the viability of three bacterial strains could be established. The results also highlight the importance of proper storage conditions of nutrients on the concentration of vitamins that are essential for wine bacteria.

Key words: wine, lactic acid bacteria, nutrients, malolactic fermentation, amino acids, vitamins.

Zusammenfassung **Relevanz und Analyse von Nährstoffpräparaten für Weinmilchsäurebakterien**

Milchsäurebakterien haben vielseitige Nährstoffbedürfnisse. Ein Mangel an essentiellen Nährstoffen kann den BSA verlangsamen oder verhindern. Diese Studie wurde mit dem Ziel durchgeführt, die Zusammensetzung mehrerer Nährstoffpräparate und deren Auswirkung auf die bakterielle Lebensfähigkeit zu untersuchen. Die Analyse der Elemente, Aminosäuren und Vitamine hat grosse Schwankungen unter den untersuchten Präparaten zu Tage gebracht. Ihr Effekt auf die bakterielle Lebensfähigkeit war stark stammabhängig. Ein Zusammenhang zwischen der Vitamin B5 Konzentration eines Präparats und seiner Wirkung auf die bakterielle Lebensfähigkeit von drei Stämmen konnte hergestellt werden. Die Ergebnisse weisen auch die Wichtigkeit der Lagerbedingungen der Präparate für den Gehalt von Vitaminen hin, welche für Weinmilchsäurebakterien essentiell sind.

Riassunto **Importanza e analisi dei nutrienti per i batteri lattici del vino**

I batteri lattici hanno precise esigenze nutrizionali. La mancanza di nutrienti adeguati può ritardare o impedire l'avvio della fermentazione malolattica (FML). Questo lavoro ha valutato la composizione di varie formulazioni di nutrienti destinati ai batteri, così come il loro effetto sulla vitalità batterica. L'analisi della loro composizione (minerali, amminoacidi e vitamine) ha rivelato la presenza di variazioni significative tra questi prodotti commerciali e il loro effetto sulla vitalità batterica si è dimostrato ceppo-dipendente. È stato possibile stabilire una correlazione tra il contenuto di vitamina B5 in un nutriente e il suo effetto sulla vitalità di tre ceppi batterici. I risultati sottolineano anche l'importanza delle corrette condizioni di conservazione delle sostanze nutritive che influenzano la concentrazione delle vitamine essenziali per i batteri di vino.

Remerciements

Nous remercions la société Lallemand de son soutien pour ces études visant à caractériser les nutriments bactériens.

Bibliographie

- Anonyme, 2006. BD Bionutrients Technical Manual. BD Diagnostics – Diagnostic Systems, Sparks, Maryland, USA, 29 p.
- Fariás M. E. & Manca de Nadra M. C., 2000. Purification and partial characterization of *Oenococcus oeni* exoprotease. *FEMS Microbiol. Lett.* **185** (2), 263–266.
- Krieger-Weber S., 2009. Application of Yeast and Bacteria as Starter Cultures. In: *Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine*. König H., Uden G. & Fröhlich J. (Eds). Springer-Verlag, Berlin, 489–511.
- Liu S.-Q. & Pilone G. J., 1998. A review: Arginine metabolism in wine lactic acid bacteria and its practical significance. *J. appl. Microbiol.* **84** (3), 315–327.
- Mira de Orduña R., Liu S.-Q., Patchett M. L. & Pilone G. J., 2000. Ethyl carbamate precursor citrulline formation from arginine degradation by malolactic wine lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **183** (1), 31–35.
- Remize F., Augagneur Y., Guilloux-Benatier M. & Guzzo J., 2005. Effect of nitrogen limitation and nature of the feed upon *Oenococcus oeni* metabolism and extracellular protein production. *J. appl. Microbiol.* **98** (3), 652–661.
- Terrade N. & Mira de Orduña R., 2006. Impact of winemaking practices on arginine and citrulline metabolism during and after malolactic fermentation. *J. appl. Microbiol.* **101**, 406–411.
- Terrade N. & Mira de Orduña R., 2009. Determination of the essential nutrient requirements of wine-related bacteria from the genera *Oenococcus* and *Lactobacillus*. *Int. J. Food Microbiol.* **133** (1–2), 8–13.
- Terrade N., Noël R., Couillaud R. & Mira de Orduña R., 2009. A new chemically defined medium for wine lactic acid bacteria. *Food Res. Int.* **42** (3), 363–367.
- Theobald S., Pfeiffer P. & König H., 2005a. Growth-stimulating factors from fruit juices and leaf extract for the wine-related bacterium *Oenococcus oeni*. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* **101** (7), 286–293.
- Theobald S., Pfeiffer P. & König H., 2005b. Manganese-dependent growth of *Oenococcus*. *J. Wine Res.* **16** (2), 171–178.
- Zimbardo M. J., Power D. A., Miller S. M., Wilson G. E. & Johnson J. A. (Eds). 1998. DIFCO & BBL Manual. BD Diagnostics – Diagnostic Systems, Sparks, Maryland, USA, 677 p.