Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin, 1994, **28**, N°2, 161-170

# LA DÉSACIDIFICATION BIOLOGIQUE DES VINS ETAT DE LA QUESTION PERSPECTIVES D'AVENIR

Aline LONVAUD-FUNEL

Institut d'Œnologie - Unité associée Université Bordeaux II/INRA,
351, cours de la Libération, 33405 Talence cedex (France)

**Résumé :** *La désacidification biologique est le résultat de la transformation enzymatique de l'acide L-malique. Levures et bactéries lactiques possèdent un équipement enzymatique, différent à la fois par la nature des produits de la transformation et leur affinité pour le substrat. La fermentation malolactique assurée par les bactéries lactiques est le procédé le plus répandu.*

*Sa maîtrise passe par l'utilisation de levains bactériens, dont les plus récents sont ensemencés directement au vin après la fermentation alcoolique. Les résultats des recherches fondamentales sur l'enzyme malolactique permettent aujourd'hui d'envisager la construction de réacteurs enzymatiques et sans doute plus rapidement, le transfert de cette activité enzymatique chez les levures de vinification.*

## INTRODUCTION

L'élimination, par voie biologique, de l'acide malique des vins représente un évènement normal et nécessaire de la vinification. Elle est obligatoire, en règle générale pour les vins rouges et les vins blancs de garde surtout. Pour d'autres types de vins, tels que les vins rouges peu acides, les vins blancs secs de certaines régions, la situation est différente. Ainsi il peut être souhaitable de réaliser une dégradation partielle de l'acide malique. Dans d'autres cas, il serait important de transformer la totalité de l'acide malique, mais en évitant les transformations secondaires du métabolisme microbien.

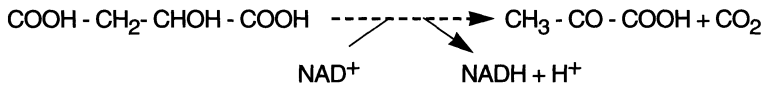
En effet, d'autres molécules que l'acide malique, non identifiées pour la plupart entrent aussi dans l'ensemble des réactions biochimiques et conduisent à des produits aromatiques. Les bouleversements organoleptiques provoqués par le métabolisme microbien tant sur les vins rouges que sur les vins blancs sont bien connus des œnologues. Le résultat dépend d'une part des microorganismes, levures ou bactéries, qui métabolisent l'acide malique selon des voies biochimiques différentes, mais aussi des autres constituants du vin impliqués dans des réactions autres que la transformation principale.

Le but de cet article est de faire le point sur les connaissances actuelles sur la désacidification biologique par les levures et les bactéries et de décrire de nouvelles perspectives d'avenir.

# LA TRANSFORMATION DE L'ACIDE MALIQUE PAR LES LEVURES

## I — L'ENZYME MALIQUE ET LA MALATE DÉSHYDROGÉNASE (MDH)

Deux enzymes étudiées chez de nombreux microorganismes, cellules végétales et animales utilisent l'acide malique comme substrat. Elles diffèrent par les produits de la réaction qu'elle catalyse : ceux de l'enzyme malique sont l'acide pyruvique et le gaz carbonique, celui de la MDH est l'acide oxaloacétique. Ces deux enzymes sont présentes chez la levure. L'enzyme malique nécessite le coenzyme $NAD^+$ qui est réduit lors de la réaction :




La MDH fonctionne aussi avec ce cofacteur. L'acide oxaloacétique qu'elle produit, conduit par l'oxaloacétate décarboxylase à l'acide pyruvique et au gaz carbonique ; les molécules terminales sont donc les mêmes. Une partie cependant de l'acide oxaloacétique peut suivre des voies anaboliques dans les conditions œnologiques (SALMON, 1986).

L'acide pyruvique est lui-même décarboxylé en éthanal puis oxydé en éthanol (FLESH and HOLBACH, 1970). L'ensemble des réactions, depuis l'acide malique, porte en œnologie le nom de fermentation maloalcoolique car le produit final est l'éthanol.

## II — APTITUDE DES LEVURES À DÉGRADER L'ACIDE MALIQUE

Les levures des espèces *Schizosaccharomyces pombe* et *Zygosaccharomyces bailii* ont une forte activité vis-à-vis de l'acide malique ; certaines souches conduisent même à une disparition totale de l'acide.

Des souches de *S. pombe* ont depuis longtemps été expérimentées pour inoculer et désacidifier le moût en fermentation. Des résultats contradictoires au plan organoleptique, auxquels s'ajoutent des difficultés d'implantation ont en général détourné les œnologues de leur utilisation. Cependant ces dernières années, des essais ont démontré l'intérêt de cette levure dans des applications très ponctuelles pour des moûts très acides. Des résultats intéressants ont été décrits avec des levures utilisées dès le début de la vinification en inoculation massive, soit sous forme de suspension soit incluses dans des billes d'alginate (TAILLANDIER, 1990). Il faut, pour cette levure, résoudre le problème de son implantation dans le moût où elle est fortement concurrencée par les levures de la fermentation alcoolique.

La dégradation de l'acide malique par *Saccharomyces cerevisiae* suit la même voie mais l'équipement enzymatique est moins efficace que pour *Z. bailii* et les autres espèces (KUCZYNSKI and RADLER, 1982). Pendant la fermentation alcoolique 20 à 30 p. cent de l'acide malique initial sont en général transformés. Un travail récent a pour la première fois permis d'avoir une idée précise sur l'activité désacidifiante de *S. cerevisiae.* L'observation réalisée grâce à un test rapide porte sur des biomasses récoltées dans des régions très dif-

férentes (DANIEL, 1993). L'auteur estime à 10.000 le nombre de souches dont l'activité a été évaluée. Une trentaine seulement de souches de *S. cerevisiae* dégradent au plus de 30 à 45 p. cent de l'acide malique initial.

## LA FERMENTATION MALOLACTIQUE

La fermentation malolactique est de loin le processus privilégié pour la désacidification biologique des vins. Elle est le résultat du métabolisme des bactéries lactiques.

### I — L'ENZYME MALOLACTIQUE

Le produit de la voie de dégradation de l'acide malique distingue la fermentation malolactique de la fermentation maloalcoolique. Le substrat de l'enzyme malolactique active chez les bactéries est bien le L-malique, mais les produits sont l'acide L-lactique et le gaz carbonique et non l'acide pyruvique. D'abord étudiée chez les bactéries lactiques du vin (SCHÜTZ et RADLER, 1973 ; LONVAUD, 1975), cette même enzyme a été mise en évidence chez les bactéries provenant de milieux totalement différents (STRASSER de SAAD, 1983 ; RENAULT, 1987).

L'existence de l'enzyme malolactique a été déduite, pour la première fois par PEYNAUD et *al.* (1966) d'observations simples. Ces auteurs notent que *Leuconostoc œnos*, coque hétérofermentaire forme uniquement de l'acide D-lactique à partir des sucres. Chez cette espèce donc, seule est présente la D-LDH, enzyme catalysant la réduction du pyruvate en lactate lors de la fermentation lactique des sucres. Mais par ailleurs, les même auteurs démontrent que l'acide L-malique est transformé en quantité stœchiométrique en acide L-lactique. Le métabolisme de l'acide malique ne passe donc pas par le pyruvate qui, lui, est réduit exclusivement en D-lactique par ces souches. Ces observations sont confirmées par les expérimentations de ALIZADE et SIMON (1973) : l'utilisation de substrats marqués radioactivement démontre que le groupe COOH du malate est remplacé par un H avec rétention de la configuration du carbone asymétrique.

Les recherches sur ce mécanisme enzymatique, qui apparaît comme une simple décarboxylation, aboutissent à la purification de l'enzyme malolactique chez plusieurs espèces de bactéries lactiques : *Lactobacillus plantarum* (SCHÜTZ et RADLER, 1973 ; LONVAUD, 1975 ; CASPRITZ et RADLER, 1983), *Leuconostoc mesenteroides* (SCHÜTZ et RADLER, 1973 ; LONVAUD-FUNEL et STRASSER de SAAD, 1982), *Lactobacillus murinus* (STRASSER de SAAD, 1983), *Leuconostoc œnos* (SPETTOLI et *al.*, 1984 ; LONVAUD-FUNEL, 1986) et plus récemment *Lactococcus lactis* (LONVAUD-FUNEL, résultats non publiés). Dans tous ces travaux, les étapes successives de purification des extraits bactériens conduisent à des fractions enzymatiques catalysant la transformation stoechiométrique de l'acide L-malique en acide L-lactique.

L'enzyme fonctionnelle est constituée de 2 ou 4 sous-unités de poids moléculaire de l'ordre de 60.000. Dans les conditions de purification utilisées le plus souvent, l'activité est

liée à un édifice protéique de 235.000 à 240.000 correspondant au tétramère. L'enzyme de *L. mesenteroides* est jusqu'ici plus précisément décrite quant à ces caractéristiques physiques et propriétés cinétiques (LONVAUD-FUNEL et STRASSER de SAAD, 1982). Seule la séquence de l'extrémité N-terminale de *L. lactis* est connue à ce jour (LONVAUD-FUNEL et GANDAR, résultats non publiés). Réalisée par le séquenceur Applied Biosystem 475H elle comprend l'enchaînement d'acide aminés suivants : Met - Arg - Ala - His - Glu - Ile - Leu - Asn - Asn - Pro - Phe - Leu - Asn - Cys - Gly - Thr - Ala - Phe - Thr - Met.

## II — POPULATION BACTÉRIENNE ET FERMENTATION MALOLACTIQUE. UTILISATION DES LEVAINS MALOLACTIQUES

En vinification, la fermentation malolactique se déclenche normalement après la fermentation alcoolique lorsque la population bactérienne se multiplie. Elle devient perceptible lorsque la population viable atteint le seuil de $10^6$ cell/ml.

La microflore qui se développe spontanément dans le vin est sélectionnée à partir de la flore du raisin et du chai par le jeu des interactions entre levures et bactéries et entre bactéries elles-mêmes (RIBÉREAU-GAYON et *al.*, 1975 ; LONVAUD-FUNEL et al, 1988 ; LONVAUD-FUNEL et JOYEUX, 1993). Elle est constituée presque toujours, exclusivement de souches de *L. œnos*. Des difficultés dans l'établissement de cette microflore sont courantes. Elles sont le plus souvent dues à une température et un pH bas, mais quelquefois à un défaut de l'inoculum naturel initial. Les pratiques souhaitables de l'hygiène des chais ont souvent pour conséquence d'éliminer une partie de cet inoculum. Quelle qu'en soit la raison, le retard ou le non-déclenchement de la fermentation malolactique constitue toujours un risque potentiel, car le vin ne peut pas être stabilisé avant que l'acide malique n'ait été dégradé.

Pour pallier au défaut de population indigène, depuis longtemps les œnologues ont tenté de lui substituer une flore sélectionnée, ajoutée en quantité importante. Après les premiers échecs, ces tentatives ont été abandonnées jusqu'au début des années 1980. A ce moment là les producteurs de préparations bactériennes ont proposé la fabrication de levains malolactiques de *L. œnos* congelés puis lyophilisés. Grâce aux études réalisées par LAFON-LAFOURCADE et *al.* (1983), il était établi que les bactéries préparées par les industriels ne pouvaient être utilisées avec succès qu'après une phase de "réactivation" (JOYEUX et LONVAUD-FUNEL, 1985). Cette étape préliminaire est indispensable pour obtenir un taux suffisant de survie nécessaire à la dégradation de l'acide malique. Par la suite, de nombreuses autres équipes ont confirmé ce résultat en proposant des milieux et des méthodes de réactivation différents, toujours basés sur le procédé initialement décrit : incubation dans un milieu contenant de l'extrait de levure. Souvent des étapes de multiplication des levains et la préparation de pied de cuve ont été préconisées, l'ensemble conduisant toujours à des manipulations lourdes et peu commodes.

Malgré ce progrès, il est vite apparu qu'il fallait rechercher des levains malolactiques, utilisables directement, sans réactivation. Deux approches ont été tentées, radicalement différentes l'une de l'autre. La première consiste à obtenir une dégradation de l'acide malique dès le début de la vinification en utilisant une souche de *Lactobacillus plantarum* (Viniflora L.P., Ch. Hansen's Laboratorium A/S, Danemark) à forte activité malolactique (PRAHL et *al.*,

1988). Comme les souches de cette espèce ne résistent pas longtemps à l'antagonisme exercé par les levures en cours de fermentation, il est important que l'activité de cette biomasse soit forte. L'acide malique est dégradé dès l'instant où le moût est inoculé. La fermentation malolactique se poursuit ensuite pendant les 4 à 5 premiers jours de la vinification. Elle s'arrête finalement par disparition totale de la population viable. L'inconvénient de cette méthode est qu'elle ne permet pas en général la dégradation complète de l'acide malique lorsque les moûts en sont très riches. Cependant, elle est apparue intéressante pour la désacidification partielle de certains vins blancs. L'intérêt est évident puisqu'elle ne nécessite aucune réactivation préalable. Cette préparation industrielle ne peut cependant s'accorder à tous les types de vinification, c'est pourquoi les recherches ont été conduites avec des souches de *Leuconostoc œnos*, seule espèce universellement appréciée pour la fermentation malolactique.

Un travail de collaboration entre quatre laboratoires européens dont le notre, soutenu par la Commission de Bruxelles dans le cadre du programme ECLAIR a abouti en 1993 à la mise sur le marché d'une préparation industrielle de *Leuconostoc œnos* active après inoculation directe (*Viniflora œnos*, Chr Hansen's Laboratorium A/S., Danemark). Le principal obstacle à l'inoculation directe des vins par des levains malolactiques est donc franchi. Ajoutée à une concentration de l'ordre de $10^6$ cell/ml cette préparation industrielle adaptée à l'ensemencement du vin après la fermentation alcoolique, parvient à s'y multiplier et à conduire jusqu'à son terme la fermentation malolactique.

## PERSPECTIVES D'AVENIR

Au plan œnologique, la dégradation de l'acide malique est la principale réaction de l'ensemble du métabolisme bactérien au cours de la phase de fermentation malolactique. L'activité malolactique est donc à la limite la seule nécessaire. Des procédés différents ont donc été imaginés, où seule cette activité bactérienne s'exprimerait soit dans une biomasse non-proliférante soit même sous forme d'enzyme.

Les principaux sont l'immobilisation de bactéries ou de l'enzyme malolactique dans des réacteurs où circule le vin, ou bien encore l'utilisation de levures de vinification (*S. cerevisiae*) auxquelles l'activité malolactique serait transférée par voie génétique.

### I — UTILISATION DE RÉACTEURS À ACTIVITÉ MALOLACTIQUE

Diverses études ont porté sur l'immobilisation de *Leuconostoc œnos* dans des gels de polyacrylamide (ROSSI et CLEMENTI, 1984), d'alginate (SPETTOLI et *al.*, 1982), de carraghénane (Mc CORD et RYU, 1985). Mais il ressort de toutes ces tentatives que le maintien de l'activité, facile en milieux synthétiques est faible ou nul dans le vin. Les bactéries restent soumises aux mêmes contraintes de milieu (pH, $SO_2$, alcool), elles perdent leur viabilité et leur activité.

Des réacteurs continus ont fonctionné dont le principe est la circulation du vin sur les billes

d'alginate. CUENAT et VILLETAZ (1984) assurent la survie du réacteur par incubation dans un jus de raisin alcoolisé. Après élimination de ce milieu, le vin à traiter est mis en circulation. Le fonctionnement est satisfaisant mais l'activité malolactique diminue trop rapidement. En outre, la mise en œuvre d'un tel réacteur soulève d'autres problèmes tels que la production de mauvais goûts et d'éventuelles contaminations microbiennes. Depuis aucune autre tentative efficace n'a été rapportée.

La fixation de l'enzyme malolactique elle-même est envisageable à condition de résoudre les problèmes de stabilité et de cinétique du système enzymatique. Parmi diverses tentatives, l'une d'elle est rapportée par SPETTOLI et *al.* (1982) ; l'enzyme est immobilisée en gel d'alginate. Là encore le fonctionnement n'est possible qu'en milieu synthétique. Les connaissances de base sur cette enzyme laissaient prévoir ces mauvaises performances : la protéine nécessite pour son activité deux cofacteurs le $NAD^+$ et des ions métalliques ($Mn^{2+}$), son pH optimum est de l'ordre de 6,0. Elle ne peut donc pas fonctionner à l'état libre dans le vin où elle est soumise à l'action d'agents dénaturants (acidité, polyphénols, alcool) et où le cofacteur $NAD^+$ n'est pas disponible.

La seule étude approfondie d'un réacteur à enzyme malolactique a été réalisée par FESTAZ-FURET (1991). Le réacteur choisi est un filtre à fibres creuses de polyamide équipé d'un circuit interne et d'un circuit externe. Comme prévu, l'activité s'exprime correctement lorsque l'enzyme fixée est dans un milieu à pH 6,0 additionnée de $NAD^+$, mais disparaît complètement en l'absence de $NAD^+$ et à pH 3,3. Mais l'auteur résout élégamment ce problème fondamental en utilisant les 2 circuits de l'ultrafiltre. Plusieurs conceptions seront étudiées pour aboutir à la réalisation d'un réacteur à enzyme malolactique libre dans le circuit interne et $NAD^+$ immobilisé. Le vin circule dans le circuit externe. L'acide malique après diffusion est effectivement transformé en acide lactique. La faisabilité a été démontrée, l'optimisation du système doit être maintenant réalisée.

## II — CLONAGE DE L'ENZYME MALOLACTIQUE CHEZ DES LEVURES ŒNOLOGIQUES

Pour surmonter la difficulté d'implantation des bactéries lactiques et obtenir une transformation malolactique, une autre idée est de transférer l'enzyme malolactique à la levure qui en se multipliant assure la fermentation alcoolique. Ainsi l'acide malique serait, dès le début de la vinification, transformé en acide L-lactique et gaz carbonique qui sont les produits de réaction de cette enzyme. Cette solution a été envisagée par les chercheurs dès que les méthodes d'extraction d'ADN et de clonage des gènes sont devenues plus fiables et facilitées par les progrès de la biologie moléculaire. Dès 1984, deux équipes décrivent cette opération. WILLIAMS et *al.* (1984), clonent le gène de l'enzyme malolactique de *Lactobacillus delbrueckii* dans *E. coli* et la levure. LAUTENSACH et SUBDEN (1984) choisissent l'enzyme de *L. œnos* et la transfèrent chez *E. coli*. Mais ces résultats n'ont eu aucun prolongement et les faibles activités obtenues pour les microorganismes recombinés montrent la fragilité des systèmes décrits.

Dans les années 1985 un programme est relancé en France qui, pour éviter les échecs des équipes précédentes, s'appuiera sur des bases plus solides. Le travail est décomposé en trois grandes étapes : purification de l'enzyme malolactique et séquençage de l'extrémi-

té de la protéine, isolement du gène à partir des informations précédentes, transfert chez la levure. La bactérie lactique dont le gène malolactique doit être cloné est *Lactococcus lactis*.

Connaissant la séquence N-terminale de l'enzyme (LONVAUD-FUNEL et GANDAR, résultats non publiés) la recherche du gène sur le chromosome bactérien a pu démarrer. Le principe général a été de synthétiser deux enchainements courts de nucléotides dont la séquence correspond à deux régions de l'extrémité connue de la protéine. Ces deux oligonucléotides ont été utilisés comme amorces dans des réactions d'amplification d'ADN *in vitro* : le résultat est la production de nombreuses copies du fragment d'ADN compris entre les 2 amorces. Ainsi une séquence d'ADN, copie exacte de la portion du gène malolactique correspondant à l'extrémité de la protéine a été obtenue. Elle a été utilisée par la suite comme sonde pour localiser des portions du génome contenant le gène. De proche en proche en utilisant différentes méthodes de l'analyse de l'ADN, la séquence nucléotidique complète du gène malolactique a été obtenue. Le gène code pour une protéine de 540 acides aminés, correspondant à un poids moléculaire théorique de 59500 Da ; c'est effectivement le poids d'une sous-unité comme les précédentes études l'avaient laissé prévoir. Pour la première fois donc la séquence nucléotidique du gène de l'enzyme malolactique pouvait être déposée dans la banque de séquences de l'EMBL (DENAYROLLES et *al.*, 1993 accession number X71897). La séquence de ce gène a été confirmée, récemment par ANSANAY et *al.* (1993). En outre, ce gène a été cloné chez *E. coli* et chez une levure *S. cerevisiae* de laboratoire. Bien que le niveau d'activité malolactique des souches transformées ne soit pas important, nous avons bien démontré que de l'acide L-lactique était produit à partir d'acide L-malique, alors que les souches d'origine n'assuraient pas cette réaction mais celle de l'enzyme malique (DENAYROLLES et *al.*, 1994).

## DISCUSSION

Alors que les difficultés à résoudre le problème de la désacidification biologique des vins ont souvent paru insurmontables, les œnologues pourraient bien disposer à l'avenir de plusieurs outils nouveaux, basés sur la réaction malolactique.

Dès maintenant un grand progrès est réalisé puisqu'un levain malolactique de *L. œnos* est déjà disponible pour l'inoculation directe. Néanmoins, il reste encore beaucoup à faire. Toutes les souches utilisées par les différents producteurs pour la préparation des levains de *L. œnos*, n'ont été jusqu'à présent sélectionnées que pour leur activité malolactique, leur capacité de survie dans le vin et l'absence de défaut gustatif. Il importe maintenant d'intégrer un nouveau critère de sélection relatif à l'incidence organoleptique. Aucun des levains commercialisés ne provoque de mauvais goût, mais ils semblent cependant capables de modifier les arômes. En somme, il s'agit de savoir si l'utilisateur pourra, comme il le fait parfois pour les levures, choisir le levain en fonction de sa spécificité organoleptique. Pour cela des études précises doivent être entreprises.

D'un autre côté, il est admis que la fermentation malolactique doit être évitée pour de nombreux vins blancs secs dont elle fait disparaître les arômes spécifiques primaires.

Le développement des bactéries n'est pas souhaité. Dans ces cas, il est nécessaire d'obtenir la dégradation exclusive de l'acide malique dans une réaction malolactique mais en l'absence de bactéries afin que les produits du métabolisme bactérien n'apparaissent pas. Ainsi pourraient être évitées les augmentations d'acidité volatile, faibles mais obligatoires dans une fermentation malolactique classique, la production de diacétyle, le plus souvent indésirable et celle des différentes amines biogènes, histamine et tyramine en particulier. En outre, les constituants aromatiques ne seraient pas modifiés. Ces deux objectifs sont envisageables avec les deux procédés exposés précédemment où seule l'enzyme malolactique bactérienne est active : le réacteur enzymatique et la levure recombinée portant le gène de l'enzyme. Ces deux projets nécessitent encore beaucoup de recherche : l'un pour optimiser la conception du réacteur, l'autre pour obtenir une bonne expression du gène dans la levure au cours de son cycle de croissance, en condition de fermentation alcoolique. Probablement le second correspondrait mieux à l'attente des vinificateurs dans la mesure où maintenant l'utilisation des levures est une pratique très courante. Mais on doit s'attendre à de sérieuses réticences pour l'autorisation de l'utilisation de souches recombinées. Par ailleurs le réacteur enzymatique présenterait l'avantage de ne décider du traitement qu'après fermentation alcoolique, si la nécessité de désacidification est évidente.

Entre des levures naturellement désacidifiantes comme *S. pombe*, des levains malolactiques pour la dégradation totale (*L. œnos*) ou partielle (*L. plantarum*) de l'acide malique, un réacteur à enzyme malolactique et une fermentation conduite par une *S. cerevisiae* recombinée, des solutions, déjà opérationnelles ou encore à l'étude, existent. Mais il appartiendra toujours à l'œnologue de choisir la méthode la mieux appropriée au type de vin qu'il élabore.

Manuscrit reçu le 24 novembre 1993 ; accepté pour publication le 4 février 1994

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ALIZADE M.A. und SIMON H, 1973. Zum Mechanismus und zur kompartmentierung der L-und D-lactat bildung aus L-malat bzw D-glucose in *Leuconostoc* mesenteroides. Hoppe-seyler's *Z. Physiol. Chem.*, **354**, 163-168.

ANSANAY V., DEQUIN S., BLONDIN B. and BARRE P., 1993. Cloning, sequence and expression of the gene encoding the malolactic enzyme from *Lactococcus lactis*. *FEBS Lett.*, **332**, 74-80.

CASPRITZ G. and RADLER F., 1983. Malolactic enzyme of *Lactobacillus plantarum*. J. *Biol. Chem.*, **258**, 4907-4910.

CUENAT P. et VILLETAZ J.C., 1984. Essais de fermentation malolactique de vins par bactéries lactiques immobilisées du genre *Leuconostoc*. *Rev. Suisse Vitic. Arboric. Hortic.*, **16**, 145-151.

DANIEL P., 1993. Sélection et identification moléculaire de microorganismes responsables de la désacidification des vins. *Thèse de Doctorat*. Université de Nantes.

DENAYROLLES M., AIGLE M. and LONVAUD-FUNEL A., 1994. Cloning and sequence analysis of the gene encoding *Lactococcus lactis* malolactic enzyme : relationships with malic enzymes. *FEMS Microbiol. Lett.*, **116**, 79-86.

FESTAZ-FURET B., 1991. Réacteur à enzyme malolactique et NAD. Production de l'enzyme malolactique de *Leuconostoc œnos* 8406. Mise au point d'un réacteur à enzyme malolactique et NAD. Application à la fermentation malolactique des vins. *Thèse Doctorat.* Université de Saint Etienne.

FLESCH P. und HOLBACH B., 1970. Untersucchungen über die L-Apfersaüreabbauenden enzyme von *Schizosaccharomyces acidodevoratus. Arch mikrobiol.*, **74**, 213-222.

JOYEUX A. et LONVAUD-FUNEL A., 1985. Comparaison de diverses préparations industrielles de bactéries lactiques réactivées pour stimuler la fermentation malolactique. *Conn. Vigne Vin,* **19**, n°2, 149-159.

KUCZYNSKI J.T. and RADLER F., 1982. The anaerobic metabolism of malate of *Saccharomyces bailii* and the partial purification and characterization of malic enzyme. *Arch. mikrobiol.*, **131**, 266-270.

LAFON-LAFOURCADE S., CARRE A., LONVAUD-FUNEL A., RIBEREAU-GAYON G., 1983. Induction de la fermentation malolactique des vins par inoculation d'une biomasse congelée de *L. œnos* après réactivation. *Conn. Vigne Vin,* **17**, n°1, 55-71.

LAUTENSACH A. and SUBDEN R.E., 1984. Cloning of malic acid assimilated activity from *Leuconostoc œnos* in E. coli. *Microbios*, **39**, 29-39.

LONVAUD M, 1975. Recherches sur l'enzyme des bactéries assurant la transformation du malate en lactate. *Thèse Doctorat.* Université de Bordeaux II.

LONVAUD-FUNEL A., 1986. Recherches sur les bactéries lactiques du vin. Fonctions métaboliques, croissance, génétique plasmidique. *Thèse Doctorat es Sciences.* Université de Bordeaux II.

LONVAUD-FUNEL A. and STRASSER DE SAAD A.M., 1982. Purification and properties of malolactic enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.*, **43**, 357-361.

LONVAUD-FUNEL A., MASCLEF J.Ph., JOYEUX A. et PARASKEVOPOULOS Y., 1988. Etude des interactions entre levures et bactéries lactiques dans un moût de raisin. *Conn. Vigne Vin*, **22**, n°1, 11-24.

LONVAUD-FUNEL A. and JOYEUX A., 1993. Antagonism between lactic acid and bacteria of wines : inhibition of *Leuconostoc œnos* by *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus pentosaceus. Food Microbiol.*, **10**, 411-419.

MAC CORD J.D. and RYU D.D.Y., 1985. Development of malolactic process using immobilized whole cells and enzymes. *Am. J. Enol. Vitic.*, **36**, 214-218.

PEYNAUD E., LAFON-LAFOURCADE S., GUIMBERTEAU G., 1966. L-lactic acid and D-lactic acid in wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, **17**, 302-307.

PRAHL C., LONVAUD-FUNEL A. KORGAARD S., MORRISSON E. et JOYEUX A., 1988. Etude d'un nouveau procédé de déclenchement de la fermentation malolactique. *Conn. Vigne Vin*, **22**, n°2, 197-207.

RENAULT P., 1987. Etude génétique du système malolactique chez *Streptococcus lactis*. *Thèse de Docteur-Ingénieur*. INA-Paris Grignon.

RIBEREAU-GAYON J., PEYNAUD E., RIBEREAU-GAYON P. ET SUDRAUD P., 1975. *Sciences et techniques du vin. Traité d'Œnologie*. Tome II. Dunod Ed. Paris.

ROSSI J. and CLEMENTI F., 1984. L-malic acid catabolism by polyacrylamide gel entrapped *Leuconostoc œnos*. *Am. J. Enol.Vitic.*, **35**, 100-102.

SALMON J.M., 1986. Mise en évidence d'un rôle anabolique de l'acide L-malique chez *S. cerevisiae* en anaérobiose et en conditions œnologiques. *Thèse Doctorat* USTL, Montpellier.

SCHUTZ M. und RADLER F., 1973. Das "Malatenzym" von *Lactobacillus plantarum* und *Leuconostoc mesenteroides*. *Arch. Mikrobiol.*, **91**, 183-202.

SPETTOLI P., BOTTACIN A., NUTI M.P. and ZAMORANI A., 1982. Immobilization of *Leuconostoc œnos* ML34 in calcium alginade gels and its application to wine technology. *Am. J. Enol. Vitic.*, **33**, 1-5.

SPETTOLI P., NUTI M.P. and ZAMORANI A., 1984. Properties of malolactic activity purified from *Leuconostoc œnos* ML34 by affinity chromatography. *Appl. Environ. Microbiol.*, **48**, 900-903.

STRASSER DE SAAD A.M., 1983. Enzima malolactica en Lactobacilllus murinus CNRZ 2313. *Thèse de Doctorat*. Université Nationale de Tucuman (Argentine).

TAILLANDIER P., 1990. Désacidification des moûts par *Schizosaccharomyces*. Analyse cinétique et métabolique. *Thèse Doctorat*. Institut National Polytechnique Toulouse.

WILLIAMS S.A., HODGES R.A., STRIKE T.L., SNOW R. and KUNKEE R.E., 1984. Cloning the gene for the malolactic fermentation of wine from *Lactobacillus delbruekii* in *Escherichia coli* and yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**, 288-293.