Connaissance Vigne et Vin, 1977, **11**, N° 1, 73-91.

LE MECANISME DE LA FERMENTATION MALOLACTIQUE DES VINS

M. LONVAUD, A. LONVAUD-FUNEL et P. RIBÉREAU-GAYON

Institut d'Œnologie, Université de Bordeaux II
351, Cours de la Libération, 33405 Talence (France)

INTRODUCTION

Les questions concernant la fermentation malolactique, son incidence sur les caractères organoleptiques et sur la stabilisation biologique des vins, constituent un chapitre d'actualité de l'œnologie qui a été largement décrit (RIBÉREAU-GAYON et *al.*, 1975 et 1976).

La nécessité d'une intervention bactérienne dans l'élaboration des vins rouges est une idée qui a été longue à s'imposer et on peut en être surpris. Sans doute « la diffusion du progrès en œnologie se heurte toujours à une forte difficulté de pénétration (E. PEYNAUD, 1971) ». Mais aussi, il a du intervenir, d'une part la difficulté de caractériser cette transformation et, à ce propos, la chromatographie sur papier a rendu de grands services (P. RIBÉREAU-GAYON, 1953), d'autre part la difficulté d'une maîtrise parfaite de cette fermentation secondaire ; on sait la provoquer dans la majorité des cas, mais il existe des exemples, heureusement en nombre limité, pour lesquels elle est sinon impossible, tout au moins très difficile et les raisons n'en sont pas connues.

Bien sûr la croissance des bactéries est difficile dans un milieu tel que le vin, contenant de l'alcool et relativement acide. Mais la constitution des vins ne suffit pas pour expliquer toutes les difficultés de la fermentation malolactique. On peut supposer que ces problèmes technologiques trouveraient une solution si on possédait une meilleure connaissance de deux aspects théoriques de la fermentation malolactique qui restent obscurs, malgré le nombre et l'importance des travaux qui lui ont été consacrés. D'une part on ne connaît pas l'origine de l'énergie servant à la croissance bactérienne et le rôle de la dégradation de l'acide malique pour ces bactéries. D'autre part, on n'a pas déterminé le mécanisme biochimique exact de la transformation de l'acide malique en acide lactique.

Après avoir envisagé les connaissances actuelles sur l'énergétique de la fermentation malolactique, nous décrirons essentiellement, dans cet article, les résultats de nos travaux personnels sur le mécanisme de la fermentation malolactique et la nature de l'enzyme impliquée.

ORIGINE DE L'ENERGIE MISE EN JEU DANS LA FERMENTATION MALOLACTIQUE

D'après SCHANDERL (1959), sur le plan thermodynamique, l'équation de la fermentation malolactique ne s'accompagne pas d'une diminution de l'énergie libre, c'est-à-dire, qu'elle est légèrement endergonique ; elle ne provoque pas de libération d'énergie mise à la disposition des bactéries pour assurer leur croissance ; il ne s'agirait donc pas d'une véritable fermentation.

Mais la variation d'énergie libre au cours d'un phénomène biochimique dépend des conditions (température, pH, concentration des substrats). Des calculs plus récents effectués par KUNKEE (1967) donnent une variation d'énergie libre de —8,2 Kcal (à 25 °C, pH 7, solution aqueuse 0,01 M) ; à partir des données de LEHNINGER (1973), on obtient —16 Kcal (à 25 °C, pH 7, solution aqueuse 1 M) ; d'après PILONE et KUNKEE (1970) le pH modifie peu ces valeurs qui par contre dépendent de la forme sous laquelle CO_2 est libéré (gaz, carbonate ou bicarbonate). Ces valeurs indiquent que la réaction de la fermentation malolactique n'est pas endergonique comme le disait SCHANDERL (1959), mais faiblement exergonique. Cependant la question est de savoir si, lors de cette réaction, une partie de l'énergie libérée peut être utilisée pour former des liaisons de haut potentiel énergétique. La synthèse d'une molécule d'ATP, à partir d'ADP et de phosphate minéral, nécessite 7 Kcal environ ; l'énergie provenant de la décomposition d'une molécule d'acide malique est donc théoriquement suffisante, bien que le rendement énergétique des phénomènes biochimiques ne dépasse généralement pas 30 à 50 p. 100. D'ailleurs, le mécanisme de la fermentation malolactique ne laisse pas prévoir une telle formation d'ATP. Il est donc vraisemblable que la réaction ne fournit pas d'énergie aux bactéries, dont la croissance doit être assurée par un autre phénomène.

Une autre hypothèse suppose qu'une partie de l'acide malique serve d'aliment énergétique aux bactéries, mais au cours d'une transformation différente de la transformation malolactique. KUNKEE (1975) indique que 0,2 p. 100 environ de l'acide malique est transformé en acide pyruvique, avec réduction concomitante de NAD^+ ; on pourrait envisager une récupération d'énergie, après passage par le stade acétyl - phosphate (KUNKEE, 1967). Cependant, compte tenu de la faible importance de l'acide malique concerné, il est peu vraisemblable que ce phénomème puisse fournir la totalité de l'énergie nécessaire.

Pourtant une intervention directe de la molécule d'acide malique sur la croissance bactérienne s'accorderait avec certaines observations. D'abord, BRECHOT et *al.* (1974) ont constaté que lorsque des bactéries lactiques se développent sur un milieu contenant à la fois du sucre et de l'acide malique, elles n'attaquent pas le premier, tout au moins en quantité importante, tant que le second n'a pas été entièrement dégradé. Egalement LAFON-

LAFOURCADE (1970) estime que la dégradation de l'acide malique, par l'enzyme constitutive des cellules bactériennes introduites dans un milieu, facilite la croissance ultérieure des cellules dans le même milieu.

Cependant, dans l'état actuel des connaissances, l'hypothèse la plus plausible consiste à admettre que la croissance bactérienne se fait aux dépens des traces de sucres résiduels, ou encore de substances azotées. RADLER (1958) a montré que 1 g d'acide malique peut être dégradé par 10 mg de bactéries (en poids sec) qui nécessient pour leur croissance 0,1 g de sucre. La décomposition de l'acide malique serait alors une réaction secondaire utilisée par les bactéries uniquement pour améliorer les conditions d'acidité ; l'instabilité de la molécule d'acide malique la rendrait possible.

Quoiqu'il en soit, cette analyse montre bien l'imprécision des données dont on dispose à l'heure actuelle pour interpréter les rapports existants entre la croissance bactérienne et la dégradation de la molécule d'acide malique. On comprend bien que l'œnologue ne peut pas espérer une parfaite maîtrise de la fermentation malolactique tant que cette question fondamentale n'aura pas trouvé une solution définitive.

MECANISMES AYANT ETE PROPOSES POUR EXPLIQUER LA TRANSFORMATION DE L'ACIDE MALIQUE EN ACIDE LACTIQUE.

On peut envisager, pour interpréter la fermentation malolactique des vins, l'intervention de différentes enzymes susceptibles de dégrader l'acide malique et ayant été identifiées dans des cellules végétales, animales ou chez les microorganismes (fig. 1). Nous ne retiendrons pas la première voie mettant en jeu une malate-deshydrogénase car son rôle a été écarté par de nombreux auteurs ; elle a été signalée pour mémoire sur la figure 1. L'enzyme dont l'intervention a été le plus souvent retenue est l'enzyme malique, décrite initialement par OCHOA (1948) dans le foie de pigeon. Une enzyme similaire fut ensuite isolée et purifiée par KORKES et **al.** (1950) et par KAUFMAN (1951), chez *Lactobacillus arabinosus ;* d'après ces auteurs le mode d'action de cette enzyme se limite à la transformation de l'acide L-malique en acide pyruvique (fig. 1, voie 2) ; la réduction de ce dernier en acide D ou L-lactique est sous la dépendance de la présence éventuelle des lacticodéshydrogénases correspondantes. Or PEYNAUD (1968) a remarqué que certaines bactéries du vin possédent les deux lacticodéshydrogénases puisqu'elles sont susceptibles de former les deux isomères de l'acide lactique à partir des sucres par la voie de la glycolyse (fig. 1) ; cependant elles forment toutes exclusivement de l'acide L-lactique à partir de l'acide L-malique. Il apparaît ainsi que les lacticodéshydrogénases ne peuvent pas être impliquées dans le mécanisme de la fermentation malolactique des vins. Les travaux de SCHUTZ et RADLER (1973) supposent l'existence d'une enzyme spécifique qui peut assurer la transformation directe de l'acide malique en acide lactique (fig. 1, voie 3). Nos propres

résultats (LONVAUD, 1975), résumés dans cette publication, confirment cette hypothèse. Il est donc aujourd'hui souhaitable de donner un nom caractéristique à l'enzyme des bactéries du vin ; en accord avec KUNKEE (1975), nous proposons le terme trivial d'enzyme malolactique (fig. 1) qui représente bien la transformation fondamentale qui s'effectue dans les vins.

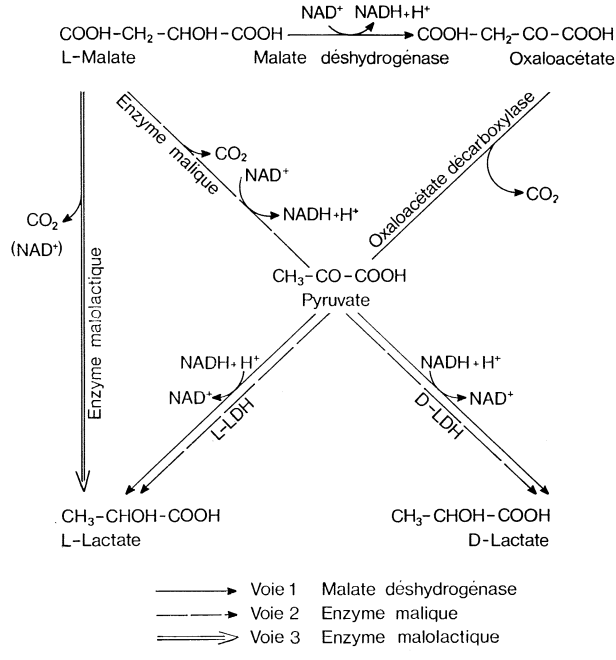


Fig. 1. — Les différentes voies possibles de la transformation Malate-Lactate.

L'enzyme étudiée initialement par KORKES et **al.** (1950) chez *Lactobacillus arabinosus* était certainement l'enzyme malolactique ; ces auteurs observaient bien la formation d'acide lactique à partir d'acide malique, mais ils l'attribuaient à l'intervention consécutive de l'enzyme malique, assurant la transformation acide malique→acide pyruvique et des lactico-déshydrogénases qu'ils n'avaient pas la possibilité de séparer de l'enzyme malique proprement dite.

ACTIVITE MALOLACTIQUE D'UNE SUSPENSION BACTERIENNE.

Avant d'extraire et d'étudier l'enzyme responsable de la fermentation malolactique, il faut s'assurer de sa présence dans les cultures de bactéries. Les travaux de LAFON-LAFOURCADE et PEYNAUD (1970) ont montré que l'activité malolactique dépend de la souche bactérienne qui peut posséder une enzyme inductible ou constitutive. Cette activité dépend aussi des conditions de culture et de conservation des préparations bactériennes qui doivent donc être précisées.

Nous avons utilisé une souche de *Lactobacillus plantarum (arabinosus)* ATCC 8014, bactérie homolactique à enzyme inductible, et une souche de *Lactobacillus Hilgardii* BC_2, bactérie hétérolactique à enzyme constitutive. Les bactéries sont cultivées sur le milieu synthétique de Carr légèrement modifié (pH 4,8), enrichi en jus de tomate ; ce jus contient un facteur stimulant la croissance bactérienne (AMACHI et YOSHIZUMI, 1970). Le milieu est réparti dans des bouteilles de 500 ml, stérilisées pendant cinq minutes à 120 °C. Après refroidissement le milieu est ensemencé à 30 °C avec une suspension de bactéries fraîches obtenue à partir d'une préculture réalisée dans les mêmes conditions. Les bactéries sont recueillies en fin de phase de croissance exponentielle (48 heures pour les lactobacilles et 60 heures pour les coques), par centrifugation à 10 000 tours par minute et à 4 °C pendant dix minutes. La détermination de la courbe de croissance est réalisée par néphélomètrie à 650 nm ; l'intensité du trouble est proportionnelle à la croissance bactérienne. Les bactéries sont ensuite lavées deux ou trois fois dans l'eau distillée, centrifugées et conservées à 4 °C. Elles gardent leur activité bactérienne vis-à-vis de l'acide malique pendant six semaines environ ; après trois mois de conservation, on ne retrouve plus que 30 à 50 p. 100 de l'activité de départ.

L'activité malolactique des bactéries ainsi préparées est mesurée à partir de cellules non proliférantes sur un milieu d'expérimentation contenant 50 méq par litre d'acide L-malique, tamponné à pH 4,0 et contenant tous les cations nécessaires à l'activité (LAFON-LAFOURCADE, 1970). Dans ce cas, la baisse d'acidité résultant de la transformation de l'acide malique en acide lactique est proportionnelle à l'activité bactérienne ; pour suivre rapidement la disparition de l'acide malique, en évitant ainsi les phénomènes secondaires (autolyse des bactéries), nous utilisons dans tous les cas un poids important de bactéries (5 g par litre environ en poids frais).

Cette activité peut aussi être suivie simplement par chromatographie sur papier (SCHLEICHER et SCHULL 2043 B) en utilisant comme solvant le butanol-acétique (4-1) ; pour avoir une bonne sensibilité et une bonne précision, la révélation des acides est effectuée par pulvérisation de glucose-aniline.

Dans une première expérience, à partir d'une souche de *Lactobacillus hilgardii,* nous avons montré que l'activité, à l'égard de l'acide malique, d'un poids de bactéries cultivées sur milieu synthétique de Carr, est sensiblement identique à celle de bactéries cultivées sur du moût de raisin ; la réaction est terminée au bout de trois heures. Il est donc justifié d'utiliser un milieu synthétique de composition parfaitement définie et non le jus de raisin dont la constitution est beaucoup plus variable.

En ce qui concerne l'influence des conditions de culture, le rôle de l'acide malique sur l'activité malolactique des bactéries à enzyme induc-

tible est bien connu. Pour cette raison, et pour avoir des conditions toujours identiques, nous ajoutons systématiquement 5 g par litre d'acide malique dans le milieu de culture, quelle que soit la souche étudiée

L'influence du glucose du milieu de culture, toujours à l'égard de l'activité malolactique, a déjà été envisagée. Les travaux de LONDON et MEYER (1969 et 1971) ont montré le rôle inhibiteur de ce sucre sur la dégradation de l'acide malique par deux bactéries lactiques différentes de celles du vin *(Streptococcus faecalis* et *Lactobacillus casei).* Mais, d'un autre côté, RADLER (1967) d'une part, PILONE et KUNKEE (1972) d'autre part, ont constaté que le glucose améliore la croissance cellulaire et favorise la synthèse de l'enzyme malolactique.

Nos résultats confirment ces dernières conclusions. Ils ont été obtenus à partir d'une souche de *Lactobacillus hilgardii* dont l'enzyme constitutive est indépendante de la présence d'acide malique. Pour des taux de glucose variables de 0 à 40 g par litre, le poids frais de bactéries varie de 0,80 à 2,80 g par litre ; de plus fortes concentrations de glucose n'améliorent pas le rendement. Mais aussi l'activité bactérienne à l'égard de l'acide malique, suivie dans les mêmes conditions, atteint un maximum (fig. 2) pour une concentration de 5 g par litre de glucose dans le milieu de culture.

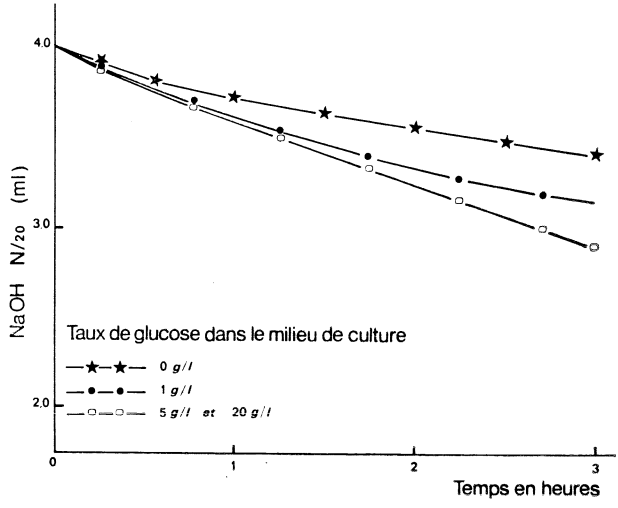


Fig. 2 — Dégradation de l'acide L--malique par **Lactobacillus hilgardii** précultivé sur des milieux synthétiques contenant des taux différents de glucose.

La divergence apparente avec les résultats de LONDON et MEYER (1969 ou 1971) s'explique par le fait que les bactéries étudiées par ces auteurs ne dégradent pas l'acide malique à l'aide de l'enzyme malolactique, mais font intervenir la véritable enzyme malique ; la présence de glucose n'a pas le même effet sur l'induction de la synthèse de ces deux enzymes chez des bactéries lactiques différentes.

Mais il est bien évident que l'étude précise des mécanismes de la fermentation malolactique ne peut pas être faite à partir de cellules entières. Il est indispensable d'effectuer la préparation d'un extrait acellulaire bactérien à partir duquel pourra être isolée et purifiée l'enzyme impliquée dans ce mécanisme.

PREPARATION D'UN EXTRAIT BACTERIEN

a) Broyage des bactéries

La même souche de *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 a été cultivée sur le milieu de Carr. Les bactéries sont soumises au broyage à l'aide d'un fractionneur de cellules (LONVAUD, 1975) afin de détruire la paroi et la membrane cytoplasmique, pour libérer le protoplasme bactérien contenant les enzymes endo-cellulaires. L'observation en microscopie électronique de *Lactobacillus plantarum* et de *Leuconostoc œnos* permet de porter un jugement sur l'état du cytoplasme et des enveloppes bactériennes avant et après broyage. Les cellules intactes de *Lactobacillus plantarum* (fig. 3-1) se présentent comme des germes gram-positifs classiques, en bâtonnets cylindriques. Le cytoplasme paraît dense aux électrons et finement granuleux ; le matériel nucléaire, caractérisé par une faible affinité pour le tétroxyde d'osmium utilisé comme fixateur, également pour les métaux lourds des contrastants, apparaît comme une tache claire ; la paroi bactérienne, bien distincte de la membrane plasmique, présente une assise basale très dense. Les cellules de *Leuconostoc œnos* apparaissent isolées, parfois en courtes chaînettes ou en tétrades (fig. 3 - 3) ; elles ont le même aspect qualitatif que les lactobacilles.

Dans les deux cas, ces bactéries ont, grâce à leur paroi, une très grande résistance mécanique ; pour cette raison la préparation d'extraits acellulaires nécessite l'utilisation de moyens de broyage énergiques. Nous avons utilisé le broyage avec un fractionneur de cellules. 10 à 100 ml de suspension bactérienne (à 20 p. 100 dans un tampon phosphate 0,05 M à pH 6,0) sont envoyés dans une chambre résistant aux hautes pressions par aspiration à l'aide d'un piston. Puis, par le mouvement inverse du piston, elle s'écoule à travers une vanne pointeau, réfrigérée par un courant d'azote et permettant de régler la pression du broyage en fonction de la rigidité de la paroi bactérienne. Deux passages successifs à la presse sous une pression de 1400 bars permettent d'obtenir un taux de protéines satisfaisant (3 mg par millilitre) déterminé selon la méthode de LOWRY (1951). Le contrôle de l'efficacité du broyage en microscopie électronique permet d'avoir une visualisation de l'effet du broyage et de l'état de rupture des cellules. L'examen d'un grand nombre de préparations montre que la plupart des cellules sont rompues, voire déchiquetées ; les débris cytoplasmiques sont très abondants et la rupture de la paroi est localisée en un ou plusieurs points par lesquels s'écoule le cytoplasme (fig. 3-2 et 3-4). En outre, ce procédé présente l'avantage de traiter des volumes impor-

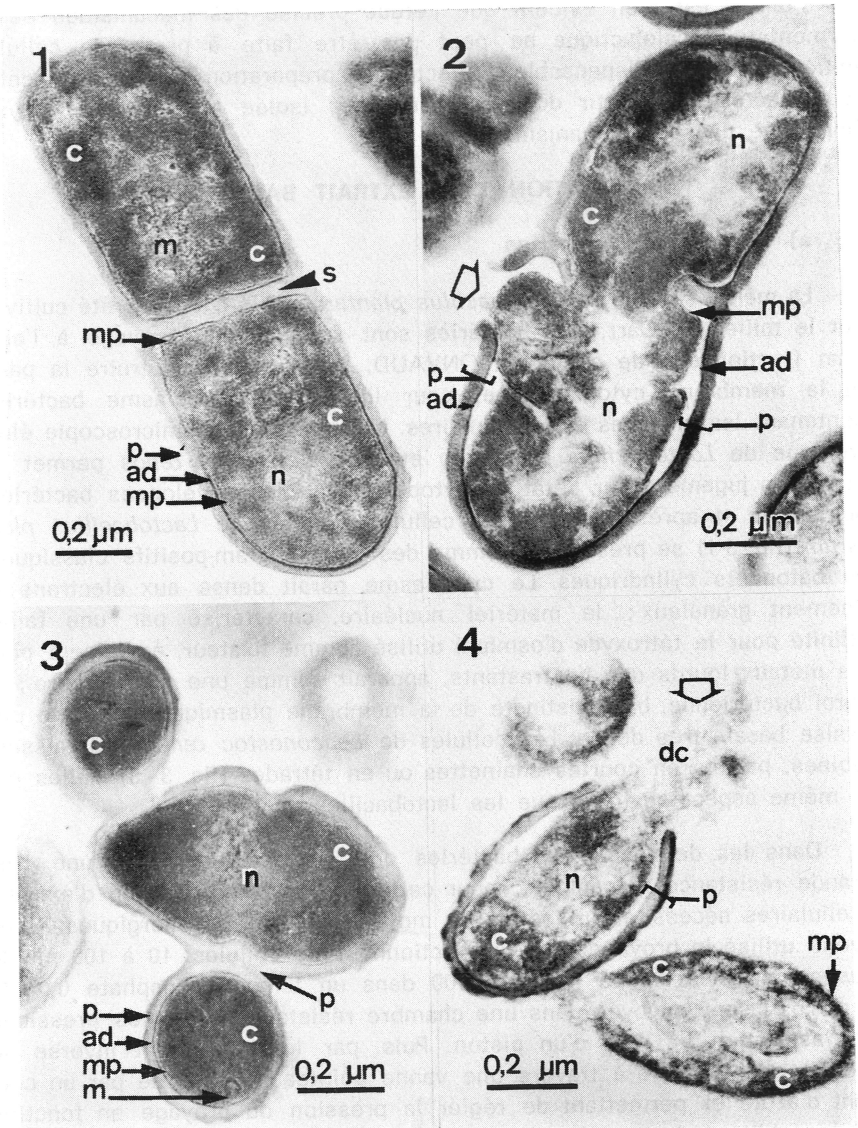


Fig. 3-1 et 3-2. — Cellules de *Lactobacillus plantarum :*

1 : cellule entière en fin de division, coupe suivant le grand axe
2 : cellule broyée à la presse, cassure typique. La paroi est rompue à proximité du septum en voie de l'extérieur.

Fig. 3-3 et 3-4. — Cellules de *Leuconostoc œnos :*

3 : cellule entière en division, observer une tétrade.
4 : cassure typique du broyage par la presse; la paroi est rompue, le cytoplasme est évacué de la bactérie.

ad : assise dense à la base de la paroi
c : cytoplasme
m : mésosome
n : noyau
dc : débris cytoplasmiques
mp : membrane plasmique
p : paroi
s : septum

Les flèches courtes indiquent les points de rupture de la paroi.

(Cliché du Centre de Microscopie électronique de l'Université de Bordeaux I)

tants de suspension bactérienne en des temps relativement courts (3 minutes) et à basse température afin d'éviter la dénaturation des protéines enzymatiques.

Pour ces différentes raisons nous avons préféré cette technique à celle utilisant le broyage aux ultra-sons, procédé classique dans lequel les bactéries sont éclatées sous l'action destructive des vibrations à haute fréquence et qui donne cependant des résultats satisfaisants avec un matériel plus simple.

b) **Mesure de l'activité de l'enzyme malolactique**

Les échantillons broyés sont débarrassés des débris cellulaires et des bactéries non cassées par centrifugation à 28 000 g pendant 20 minutes ; le surnageant constitue l'extrait acellulaire. Dans l'étude de l'activité de l'enzyme malique, les méthodes manométriques (appareil de Warburg) ont été les plus employées ; cependant elles réclament des manipulations délicates et elles se prêtent mal à l'étude des mécanismes enzymatiques. De ce fait nous avons envisagé une technique originale, utilisant une électrode spécifique à gaz carbonique (LONVAUD et RIBÉREAU-GAYON, 1973 ; LONVAUD, 1975). Dans ce cas la réaction enzymatique est suivie par la formation de CO_2 qui est enregistrée sous forme d'une augmentation de sa pression partielle ; cette mesure se ramène à celle de la variation de pH d'une solution de bicarbonate sous l'influence du CO_2.

L'activité de l'enzyme malolactique est suivie à 25 °C dans le milieu réactionnel suivant : acide L-malique 0,05 M, 0,2 ml ; NAD^+ 0,05 M, 0,2 ml ; $MnCl_2$ 0,02 M, 0,3 ml ; extrait enzymatique 0,1 à 0,5 ml ; l'ensemble est complété à 2,3 ml par un tampon phosphate 0,2 M à pH 6,0. Le potentiel pris par l'électrode, lors de la variation de pH, est enregistré en échelle logarithmique en mm de Hg, puis converti par le calcul en micromoles de CO_2. On définit arbitrairement une unité d'activité enzyme malolactique ; elle représente la transformation d'une micromole d'acide L-malique par mn et pour 0,1 ml d'extrait enzymatique, dans les conditions expérimentales retenues ; l'activité spécifique est déterminée par rapport au taux de protéines.

Cette méthode a été appliquée à la détermination de l'activité totale et de l'activité spécifique de l'enzyme malolactique de différentes souches de bactéries lactiques du vin. Les activités spécifiques sont variables en fonction des souches (Tableau I) ; elles ne correspondent pas toujours aux activités des bactéries entières vis-à-vis de l'acide malique.

PURIFICATION DE L'ENZYME MALOLACTIQUE.

a) **Mesure de l'activité L-lacticodéshydrogénase**

Un problème important est de montrer l'absence d'intervention de la L-LDH dans le mécanisme de la fermentation malolactique. Il est donc

TABLEAU I

Activité de l'enzyme malolactique de différentes souches de bactéries isolées du vin

(LONVAUD et RIBÉREAU-GAYON, 1973)

	Poids frais de culture (g par litre)	Protéines totales de l'extrait (mg par millilitre)	Activité totale de l'extrait (micromoles de CO_2 par mn et pour 0,1 ml)	Activité spécifique de l'extrait (micromoles de CO_2 par mn et par mg de protéine)
Bacilles homofermentaires				
Lactobacillus plantarum A 8014	4,8	7,2	2,00	2,78
Lactobacillus casei J F_1	0,9	7,2	0,06	0,08
Bacilles hétérofermentaires				
Lactobacillus hilgardii BC_2	2,8	4,2	0,89	2,12
Lactobacillus fructivorans A 8288	1,8	10,0	0,18	0,18
Lactobacillus brevis C 12	0,5	1,0	0,11	1,10
Lactobacillus hilgardii A 8290	0,7	6,2	0,27	0,44
Coques homofermentaires				
Pediococcus cerevisiae LX 126	3,3	5,6	0,08	0,14
Pediococcus cerevisiae J A_2	3,3	5,2	0,25	0,48
Coques hétérofermentaires				
Leuconostoc œnos B_2	1,0	4,2	0,81	1,90
Leuconostoc gracile Cf_{34}	1,2	5,2	0,06	0,12

Les bactéries proviennent de la collection de la Station Agronomique et Œnologique de Bordeaux. L'extrait enzymatique est préparé à partir d'une suspension bactérienne à 20 % dans le tampon phosphate 0,05 M.

nécessaire de la séparer de l'enzyme malolactique et pour cela il faut pouvoir mesurer son activité.

La mesure est effectuée à 25 °C dans le milieu réactionnel suivant : pyruvate de sodium (2,5 mg par millilitre) 0,2 ml ; NADH (1,0 mg par millilitre) 0,2 ml ; extrait enzymatique 0,01 à 0,05 ml ; l'ensemble est complété à 2,3 ml avec le tampon phosphate 0,2 M à pH 6,0. On mesure la variation de densité optique consécutive à l'oxydation de NADH qui accompagne la réduction de l'acide pyruvique en acide lactique. Dans ce cas l'unité d'activité, exprimée en Δ DO/mn, est définie comme la quantité d'extrait qui catalyse, par minute, l'oxydation d'une micromole de NADH dans les conditions du dosage ; l'activité spécifique est rapportée à 1 mg de protéine.

b) **Purification partielle de l'enzyme malolactique**

L'extrait enzymatique brut (40 ml) est tout d'abord débarrassé des acides nucléiques et des nucléoprotéines qui gêneraient le fractionnement ultérieur des protéines. Un traitement par la chaleur et l'addition conjuguée de chlorure de manganèse permet d'éliminer, sous forme dénaturée, une partie des protéines instables à la chaleur ; au cours de ces manipulations l'enzyme est stabilisée par addition de son substrat. Après élimination des nucléoprotéines résiduelles par un traitement complémentaire au sulfate de protamine, le surnageant est additionné de sulfate d'ammonium pour précipiter sélectivement les protéines. Le précipité protéique, recueilli après une saturation du surnageant à 90 p. 100, est repris avec 4 ml de tampon phosphate ; il constitue l'extrait enzymatique partiellement purifié.

c) **Séparation de l'enzyme malolactique et de la L-LDH.**

A partir de l'extrait partiellement purifié, précédemment obtenu, il faut d'abord réaliser un premier fractionnement de protéines afin d'augmenter l'activité de l'enzyme malolactique. Ensuite la séparation analytique de la L-LDH et de l'enzyme malolactique doit être obtenue afin d'avoir la preuve absolue que cette première enzyme n'intervient pas dans le mécanisme de la transformation malolactique.

Le fractionnement des protéines est obtenu sur gel Sephadex G-100, dextrane constitué par un réseau de chaînes de polysaccharides, qui sépare les protéines selon leur dimension et leur poids moléculaire. Le gel est préalablement équilibré avec un tampon phosphate (0,2 M + 0,1 M KCl) ; l'élution est faite avec le même tampon ; à la sortie de la colonne, l'absorption de l'éluat, enregistrée en continu à 280 nm, permet de localiser les protéines ; dans chaque fraction protéique on détermine les activités L-LDH et enzyme malolactique. A ce stade, l'activité spécifique maximum de l'enzyme malolactique est de 9,6 mais la séparation avec la L-LDH n'est pas suffisante comme le montre la figure 4.

Pour améliorer cette séparation, nous avons fait appel à d'autres techniques de purification : la chromatographie d'adsorption sur hydroxylapatite et l'électrofocalisation.

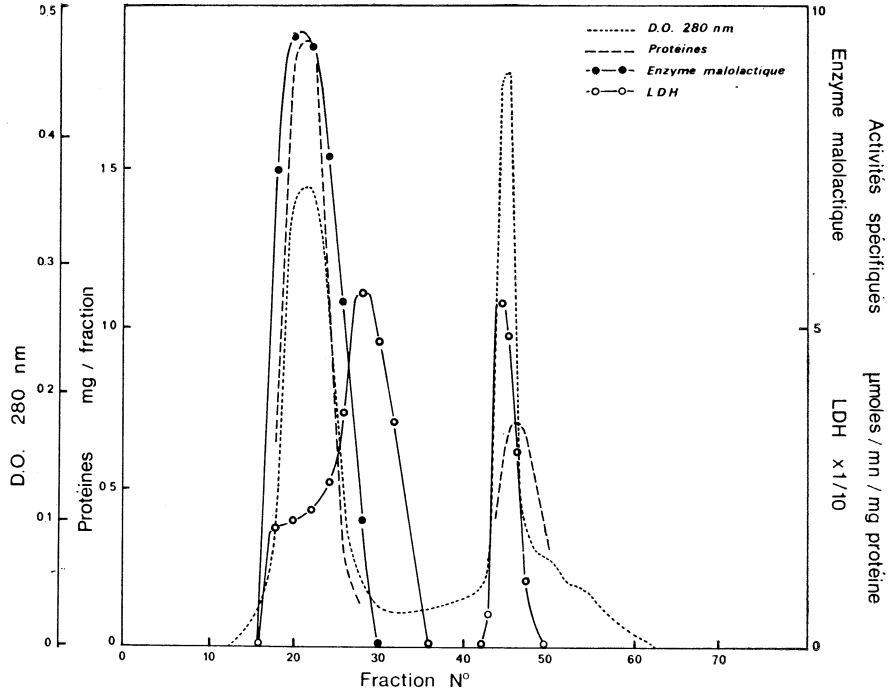


Fig. 4. — Fractionnement des protéines sur Sephadex G-100 (dimension du gel : 2,5 x 35 cm ; débit : 18 ml/h ; éluant : tampon phosphate 0,02 M ; pH 6 ; 0,1 M KCl).

Après élution de la colonne Sephadex G-100 l'extrait correspondant aux fractions n° 16 à 30 (fig. 4) est concentré par ultrafiltration et déposé sur une colonne d'hydroxylapatite qui est une forme de phosphate de calcium. L'adsorption des protéines est liée à la formation de complexes avec l'hydroxylapatite qui dépend de la salinité de la solution. Au cours de l'élution on élève la concentration en ions phosphates ce qui détruit progressivement ces complexes ; les deux protéines étudiées sont retrouvées pour des concentrations d'élution du tampon phosphate comprises entre 0,18 et 0,20 M. La chromatographie d'adsorption sur hydroxylapatite permet une forte augmentation de l'activité de l'enzyme malolactique par rapport à celle de la L-LDH (fig. 5) ; également, dans certaines fractions l'élimination de la L-LDH est complète. On a donc une bonne confirmation de l'existence de l'enzyme malolactique.

Une preuve supplémentaire est apportée par électrofocalisation des fractions dont l'activité malolactique est maximum (n° 62 à 72, fig. 5). Ce fractionnement isoélectrique consiste en la migration électrophorétique

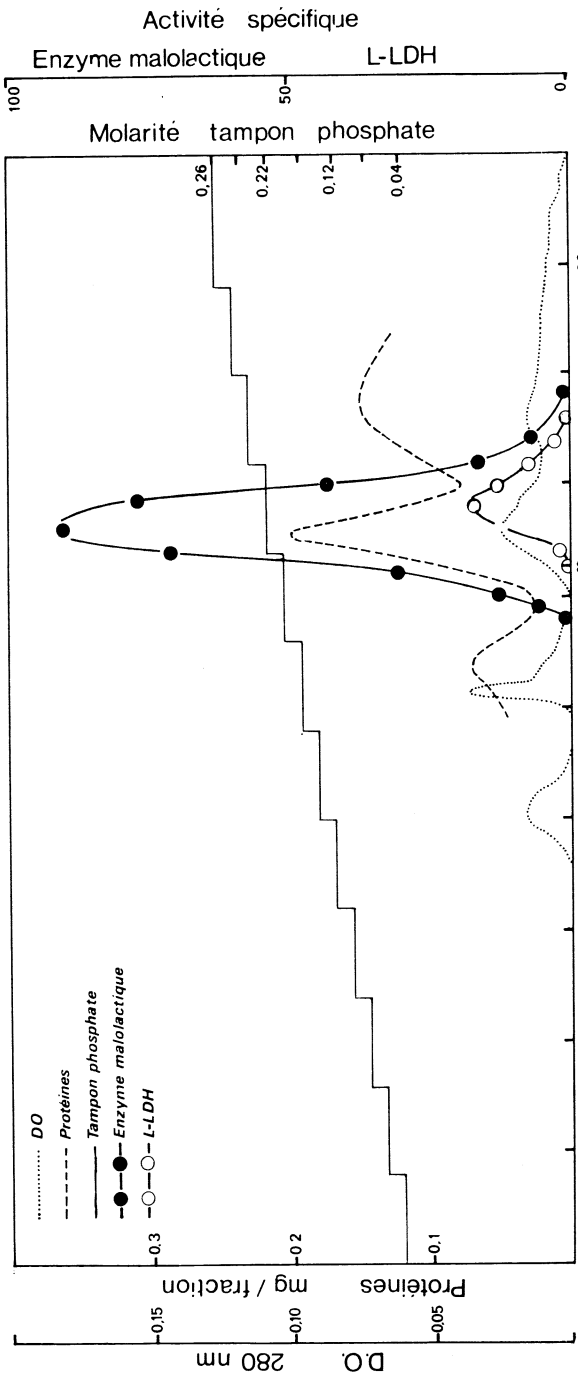


Fig. 5. — Chromatographie sur hydroxylapatite après passage de l'extrait sur Sephadex G-100 ; profil d'élution avec tampons phosphate pH 6,0 de molarités croissantes (0,04 — 0,26 M), additionnés de 0,1 M KCl. (Débit 40 ml/h ; pression 0,1 bar ; volume des fractions : 5 ml).

des protéines dans un gradient de pH créé par des ampholytes de synthèse ; elles se répartissent et se focalisent le long de la colonne en un point correspondant à leur point isoélectrique. Cette expérience réalisée dans une zone de pH de 4,0 à 4,5 (fig. 6), nous a permis également de déterminer la valeur des points isoélectriques, soit 4,20 pour la L-LDH et 4,35 pour l'enzyme malolactique, et de confirmer que ces deux protéines sont bien distinctes.

L'évolution du rapport entre l'activité spécifique de l'enzyme malolactique et celle de la L-LDH, au cours des différentes étapes de la purification, est indiquée sur le tableau II. SCHUTZ et RADLER (1973) obtiennent une purification de l'enzyme malolactique encore plus importante,

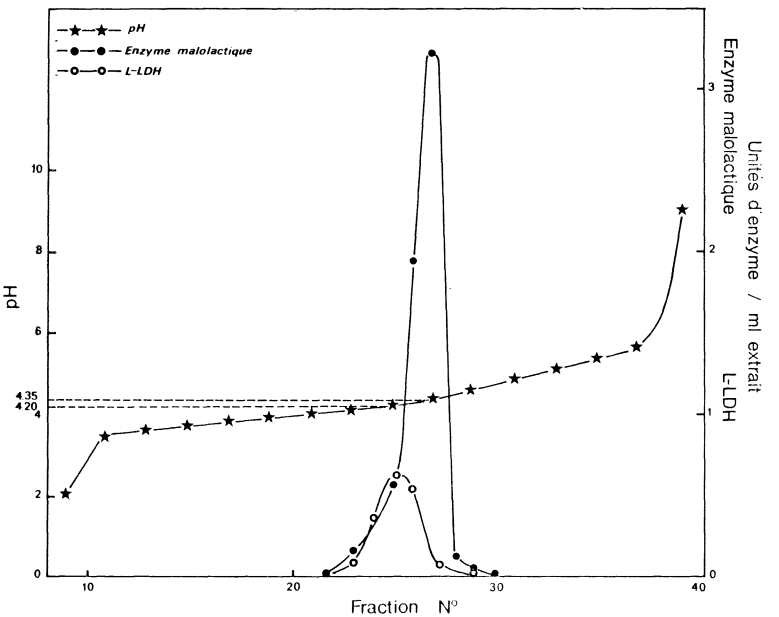


Fig. 6. — Electrofocalisation de l'extrait après passage sur Sephadex G-100 et hydroxylapatite. Gradient de pH 4,0 — 4,5. (Volume des fractions : 2 ml).

en relation avec une activité L-LDH plus faible ; mais ces auteurs mesurent cette dernière activité dans le sens acide lactique ——→acide pyruvique ; dans ces conditions on peut craindre de saisir une fraction seulement de la L-LDH, mesurée intégralement lorsque la réaction est effectuée dans le sens acide pyruvique ——→ acide lactique, car l'équilibre est en faveur de la formation de l'acide lactique ($K = 10^{-11}$ à 25 °C, Biochemist's Handbook).

d) **Mise en évidence de l'enzyme malolactique par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.**

Les résultats de l'expérience précédente ont été confirmés en effec-

tuant l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide d'une fraction purifiée (n° 27, fig. 6) sur l'hydroxylapatite puis par électrofocalisation. Dans ce cas la migration des protéines est le résultat d'un effet de filtration, dépendant de la porosité du gel, et d'une séparation provoquée par un champ électrique.

Mais on peut aussi, sur un gel, révéler spécifiquement la présence de la L-LDH ou de l'enzyme malolactique. La révélation de la L-LDH est effectuée à l'aide d'une méthode chimique consistant à oxyder l'acide L-lactique en acide pyruvique ; simultanément NAD+ est réduit en NADH, lui-même réoxydé par un colorant (sel de tétrazolium) dont la forme réduite donne sur le gel un dépôt coloré et insoluble.

TABLEAU II

Activités spécifiques de l'enzyme malolactique (EM) et de la L—Lacticodéshydrogénase (L—LDH) au cours de la purification

Purification	Activité spécifique		EM / L—LDH
	EM	L—LDH	
Extrait brut	3,0	6,6	0,45
$MnCl_2$ Chaleur	7,0	12,8	0,54
S.protamine	7,6	14,2	0,53
$(NH_4)_2$ SO_4 à 60 p. 100	8,3	16,6	0,50
Sephadex G-100 fraction n° 20	9,6	20,0	0,48
Hydroxylapatite fraction n° 66	90,0	12,0	7,50

Pour la révélation de l'enzyme malolactique, nous avons imaginé une méthode originale qui consiste à apprécier, à l'aide d'un colorant convenable (jaune de nitrazine), la variation de pH consécutive à la transformation de l'acide malique en acide lactique.

Les électrophorégrammes obtenus sont schématisés sur la figure 7. Même après plusieurs purifications, l'extrait contient deux protéines ; l'une est l'enzyme malolactique, l'autre la L-LDH. Cette caractérisation sans équivoque est sans doute, à l'heure actuelle, la preuve la plus sûre de l'existence, chez les bactéries lactiques du vin, d'une enzyme malolactique capable de transformer l'acide malique en acide lactique, en l'absence des lacticodéshydrogénases.

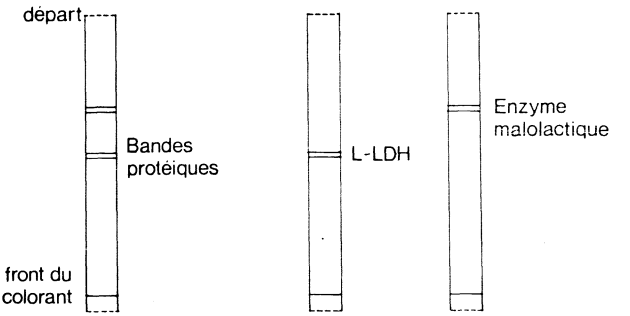


Fig. 7. — Localisation des activités L—LDH et enzyme malolactique sur gel de polyacrylamide.

CONCLUSIONS

La solution de deux questions théoriques devraient permettre d'améliorer la maîtrise de la fermentation malolactique des vins ; il s'agit de la caractérisation des molécules servant de substrat énergétique à la croissance bactérienne et de la mise en évidence du mécanisme biochimique par lequel l'acide malique est dégradé en acide lactique.

Sur ce dernier point, nos résultats, rapportés dans cette publication, confirment les travaux de PEYNAUD (1968) d'une part, et SCHÜTZ et RADLER (1973) d'autre part. La décomposition de l'acide malique ne fait pas intervenir l'enzyme malique avec passage par l'acide pyruvique, lui-même réduit en acide L(+)lactique par la L—Lacticodéshydrogénase ; cette décomposition est catalysée par une enzyme malolactique particulière assurant directement le passage de l'acide malique à l'acide lactique. Mais la question du mécanisme intime de cette réaction reste entière. Une simple décarboxylation de l'acide malique, ne correspondant à aucune réaction classique de la biochimie, est difficilement acceptable ; d'ailleurs NAD^+, coenzyme d'oxydoréduction, est un cofacteur indispensable.

On peut envisager deux possibilités : a) l'enzyme malolactique serait une protéine bifonctionnelle avec un mode d'action séquentiel ; b) l'enzyme malolactique serait un système multienzymatique de deux protéines intimement associées. Dans un cas comme dans l'autre, l'enzyme assurerait les deux transformations acide L—malique ⟶ acide pyruvique et acide pyruvique ⟶ acide L—lactique ; l'acide pyruvique ne serait pas libéré, mais resterait toujours lié à la protéine enzymatique ; on expliquerait ainsi que l'enzyme malolactique ne puisse pas le réduire directement.

Manuscrit reçu le 20 décembre 1976.

RÉSUMÉ

Dans ce travail on étudie l'activité de suspensions bactériennes responsables de la fermentation malolactique des vins, on décrit les méthodes de purification d'extraits bactériens catalysant cette transformation. On a vérifié l'existence d'une enzyme malolactique particulière assurant la transformation du malate en lactate sans intervention des lacticodéshydrogénases.

SUMMARY

The activity of bacterial suspensions responsible for malo-lactic fermentation in wines was studied. Methods of purification of bacterial extracts which catalyse this transformation are described. The existence of a particular malo-lactic enzyme which ensures the conversion of malate into lactate without the intervention of lactate dehydrogenases was shown.

ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit studiert man die Akktivität der Bakterien, die die Gärung der Apfel und Milchsäure im Wein provozieren, und beschreibt die Säuberungsmethoden von Bakterienextrakten, die diese Veränderung katalisieren. Man hat die Existenz eines besonderen Apfel-Milchsäuren Enzym nachprüfen können, der die Apfelsäure in Milchsäure umwandelt, ohne daß die vom Wasserstoff befreinten milchsauren Elemente eintreten.

RESUMEN

En este trabajo se estudia la actividad de suspensiones bacterianas responsables de la fermentatión maloláctica de vinos, se describe los métodos de purificatión de extractos bacterianos catalisando esta transformación. Se ha verificado la existencia de una enzima maloláctica particular asegurando la transformación del malato en lactato sin intervención de lactico deshidrogenasas.

RIASSUNTO

In questo lavoro si studia l'attività di saspensioni batteriche responsabili della fermentazione malolattica dei vini, si descrive i metodi di purificazione di estratti batterici catalizzando questa trasformazione. Si è verificato l'esistenza di un enzima malolattico particolare assicurando la trasformazione del malate in lattate senza intervento delle latticodesidogenasi.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AMACHI T., IMAMOTO S., YOSHIZUMI H. et SENOH S., 1970. Structure and synthesis of a novel pantothenic acid derivative. The microbial growth factor from tomato juice. *Tetrahedron letters,* **56**, 4871-4874.

BRECHOT P., CHAUVET J. et CROSON M., 1974. Influence de la concentration initiale de l'acide malique sur le déclenchement et l'évolution de la fermentation malo-lactique. *C.R. Acad. Agr.,* **60**, 734-741.

KAUFMAN S., KORKES S. et DEL CAMPILLO A., 1951. Biosynthesis of dicarboxylic acids by carbon dioxide fixation. V. Further study of the « malic » enzyme of *Lactobacillus arabinosus. J. Biol. Chem.,* **192**, 301-312.

KORKES S., DEL CAMPILLO A. et OCHOA S., 1950. Biosynthesis of dicarboxylic acids by carbon dioxide fixation. IV. Isolation and properties of an adaptative « malic » enzyme from *Lactobacillus arabinosus. J. Biol. Chem.,* **187**, 891-905.

KUNKEE R.E., 1967. Malo-lactic fermentation. *Adv. Appl. Microb.*, **9**, 235-279.

KUNKEE R.E., 1975. A second enzymatic activity for decomposition of malic acid by malo-lactic bacteria in « Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food ». Proceedings of the 4th Long-Ashton Symposium, University of Bristol.

LAFON-LAFOURCADE S. et PEYNAUD E., 1970. Nature de l'enzyme malique des bactéries lactiques isolées de vins. *C.R. Acad. Sc.*, **270**, 228-229.

LAFON-LAFOURCADE S., 1970. Etude de la dégradation de l'acide L— malique par les bactéries lactiques isolées de vins. *Ann. Technol. Agric.*, **19**, n° 2, 141-154.

LEHNINGER A.L., 1973. in *Biochimie*, 6e Ed., Flammarion.

LONDON J. et MEYER E.Y., 1969. Malate utilization by a group D—Streptococcus : Physiological properties and purification of an inducible malic enzyme. *J. Bacteriol.*, **98**, n° 2, 705-711.

LONDON J., MEYER E.Y. et KULCZYK S.R., 1971. Detection of relationships between *Streptococcus faecalis* and *Lactobacillus casei* by immunological studies with two forms of malic enzyme. *J. Bacteriol*, **108**, n° 1, 196-201.

LONVAUD M. et RIBÉREAU-GAYON P., 1973. Utilisation d'une électrode à CO_2 pour la détermination de l'activité de l'enzyme malique des bactéries lactiques du vin. *C.R. Acad. Sc.*, **276.D**, 2329-2331.

LONVAUD M., 1975. Recherches sur l'enzyme des bactéries lactiques du vin assurant la transformation du malate en lactate. *Thèse 3e cycle*, Université Bordeaux II.

LOWRY O.H., ROSENBROUGH N.J., FARR A.C. et RANDALL R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.

OCHOA S., MEHLER A.H. et KORNBERG A.J., 1948. Biosynthesis of dicarboxylic acids by carbon dioxide fixation. I. Isolation and properties of an enzyme pigeon liver catalysing the reversible oxidative decarboxylation of L-Malic acid. *J. Biol. Chem.*, **174**, 979-1000.

PEYNAUD E., 1968. Mécanisme biochimique de la fermentation malolactique. *C.R. Acad. Sc.*, **267**, 121-122.

PILONE G.J. et KUNKEE R.E., 1970. Carbonic acid from decarboxylation by « malic » enzyme in lactic acid bacteria. *J. Bacteriol.*, **103**, 404-409.

RADLER F., 1958. Untersuchung des biologischen Saüreabbaus im Wein. Isolierung und Charakterisierung von Apfelsaüreabbaunenden Bakterien. *Arch. Mikrobiol.*, **30**, 64-72.

RADLER F., 1967. Etude microbiologique des bactéries de la fermentation malolactique. *Connaissance Vigne Vin,* n° 3, 73-91.

RIBÉREAU-GAYON P., 1953. Méthode simple et expressive de caractérisation de la fermentation malolactique des vins. *C.R. Acad. Agric.,* **39,** 807.

RIBÉREAU-GAYON J., PEYNAUD E., RIBÉREAU-GAYON P. et SUDRAUD P., 1975 et 1976. Sciences et Techniques du vin. Tome II et Tome III. Ed. Dunod, Paris.

SCHANDERL H., 1959, cité par KUNKEE R.E., 1967. *Adv. App. Microb.,* **9,** 235-279.

SCHÜTZ M. et RADLER F., 1973. Das « Malatenzym » von *Lactobacillus plantarum* und *Leuconostoc mesenteroides. Arch. Mikrobiol.,* **91,** 183-202.

SCHÜTZ M. et RADLER F., 1974. Das Vorkommen von Malatenzym und Malo-Lactat Enzym bei verschiedenen Milchsäurebakterien. *Arch. Microbiol.,* **96**, 329-339.