Méthodes manométriques Application au dosage microbiologique de l'acide L-malique à l'aide de lactobacillus arabinosus

M^me A.-M. BOIDRON
Station Agronomique et Œnologique de Bordeaux

Nous rappelons brièvement le principe de la mesure des échanges gazeux d'origine biochimique par la méthode manométrique, ainsi que le fonctionnement et le montage de l'appareil de Warburg. La méthode permet d'étudier des réactions enzymatiques s'accompagnant d'un dégagement ou d'une absorption de gaz (méthode directe) ou des réactions au cours desquelles se forme un acide capable de déplacer (donc de dégager) le gaz carbonique d'un tampon bicarbonaté (méthode indirecte).

Dans la deuxième partie de ce travail, nous décrivons le dosage enzymatique de l'acide L-malique dans les vins à l'aide de **Lactobacillus arabinosus.**

Introduction

La technique générale d'utilisation et les applications de l'appareil de Warburg sont exposées par UMBREIT et col. (1).

En ce qui concerne les mesures effectuées sur le raisin, les levures et le vin, un certain nombre de travaux ont été réalisés grâce à l'appareil de Warburg. Citons : GATET (2), qui mesure en 1939 l'évolution de l'intensité respiratoire du grain de raisin pendant la phase de croissance et pendant la phase de maturation ; SAULNIER-BLACHE (3) qui étudie la respiration du grain de raisin à la véraison.

PEYNAUD et LAFON (4), en 1956, distinguent six grands groupes parmi les différentes souches de levures grâce à l'étude de leur fermentation et de leur respiration. Une étude identique a été faite par nous-même (5) en 1964 pour les levures du genre **Schizosaccharomyces.**

RIBÉREAU-GAYON et col. (6) ont testé l'action des antibiotiques sur l'intensité respiratoire et fermentaire des levures. Enfin la méthode de Warburg peut servir à des fins analytiques pour les constituants du vin.

I. - Principe et utilisation de l'appareil de Warburg

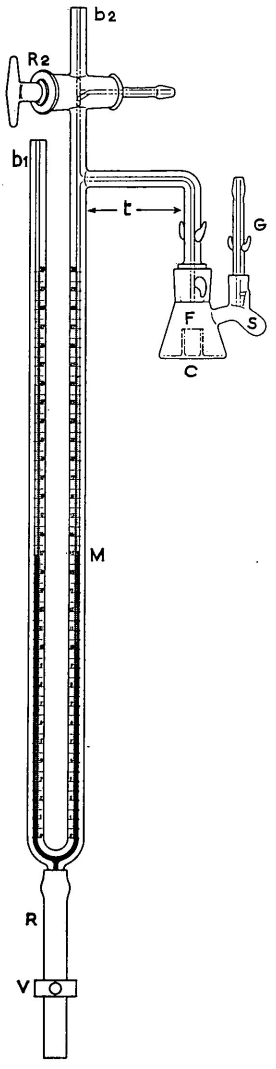
Les méthodes manométriques permettent de mesurer des échanges gazeux. Le principe fondamental est qu'à température et à volume constants, toute variation de la quantité de gaz se traduit par une variation de pression. Il est donc possible de suivre quantitativement les réactions produisant un dégagement gazeux, en mesurant, par de simples lectures manométriques, les changements de pression produits à volume constant et à température constante.

1. Description de l'appareil.

L'appareil se compose d'un bain-marie avec agitation de l'eau et thermostat afin que la température soit constante (à un dixième de degré près).

F I G U R E I

Manomètre et fiole de Warburg



M : manomètre proprement dit, avec liquide manométrique.

R : réservoir en caoutchouc contenant le liquide manométrique.

V : petite vis de serrage permettant par de légères pression ou dépression de faire varier le niveau du liquide manométrique.

b_1 : branche ouverte du manomètre sur laquelle s'effectueront toutes les lectures.

b_2 : branche fermée, c'est-à-dire correspondante avec la fiole F où se produit la réaction à étudier.

R_2 : Robinet permettant d'isoler le système fiole-manomètre pour effectuer les mesures.

t : tubulure manométrique dont le volume est connu.

F : fiole de Warburg.

C : cupule centrale.

S : diverticule latéral.

G : tubulure de fermeture de la fiole, permettant l'introduction d'un gaz.

Des manomètres en pyrex (fig. 1), munis de petites fioles coniques dites fioles de Warburg, se fixent extérieurement sur un système oscillant, de sorte que seules les fioles soient plongées dans l'eau du bain-marie (cf. fig. 1). Les oscillations régulières permettent une homogénéisation permanente à l'intérieur de la fiole.

Un liquide manométrique coloré, de viscosité connue, contenu dans un petit réservoir de caoutchouc, monte dans les deux branches capillaires b_1 et b_2 du manomètre. A l'aide d'une petite vis de serrage (v) qui appuie sur le réservoir (R), on peut exercer la pression nécessaire pour amener le liquide manométrique à un niveau déterminé dans la branche ouverte (b_1) du manomètre.

Le volume de la fiole, de la tubulure latérale t et de la branche fermée b_2 entre le robinet R_2 et une graduation déterminée (150 mm par exemple) sont connus, soit d'après une détermination expérimentale, soit selon les données du constructeur. Il est essentiel que ce volume soit très précisément déterminé, les mesures reposant sur des variations de pression à volume constant.

La fiole de Warburg, adaptable au manomètre par un rodage et maintenue en place à l'aide d'ergots et de ressorts, est en pyrex. Elle est munie d'un diverticule latéral à bouchon creux servant en même temps de robinet lorsqu'on veut introduire un gaz déterminé dans l'ensemble du système. Elle comporte également une cupule centrale permettant de disposer à l'intérieur, sans les mélanger, deux liquides différents (cf. fig. 1).

2. **Mode opératoire.**

Après fixation de chaque fiole sur un manomètre, l'ensemble est porté sur la rampe à agitation de manière à ce que la fiole trempe entièrement dans le bain-marie.

On ne peut commencer les mesures avant trente minutes, ce qui représente le temps nécessaire à l'homogénéisation de la température du système. Ces trente minutes peuvent être mises à profit pour remplacer l'air ambiant des fioles par un autre gaz (azote ou gaz carbonique). Cette opération est indispensable chaque fois que la réaction doit se produire en anaérobiose. Le gaz entre dans la fiole par la tubulure de la fiole, circule dans la partie du manomètre non occupée par le liquide manométrique, et s'échappe par le robinet R_2 de b_2.

Après homogénéisation de la température (les mesures s'effectuent généralement à 25 °C) et remplacement de l'air par l'azote, nous ajustons le niveau du liquide à un repère (150 mm par exemple), dans la branche b_2, puis nous fermons le robinet R_2.

L'ensemble fiole-manomètre comprend donc une phase liquide qui contient en suspension les cellules à étudier et une phase gazeuse. Le volume de ces deux phases est exactement connu.

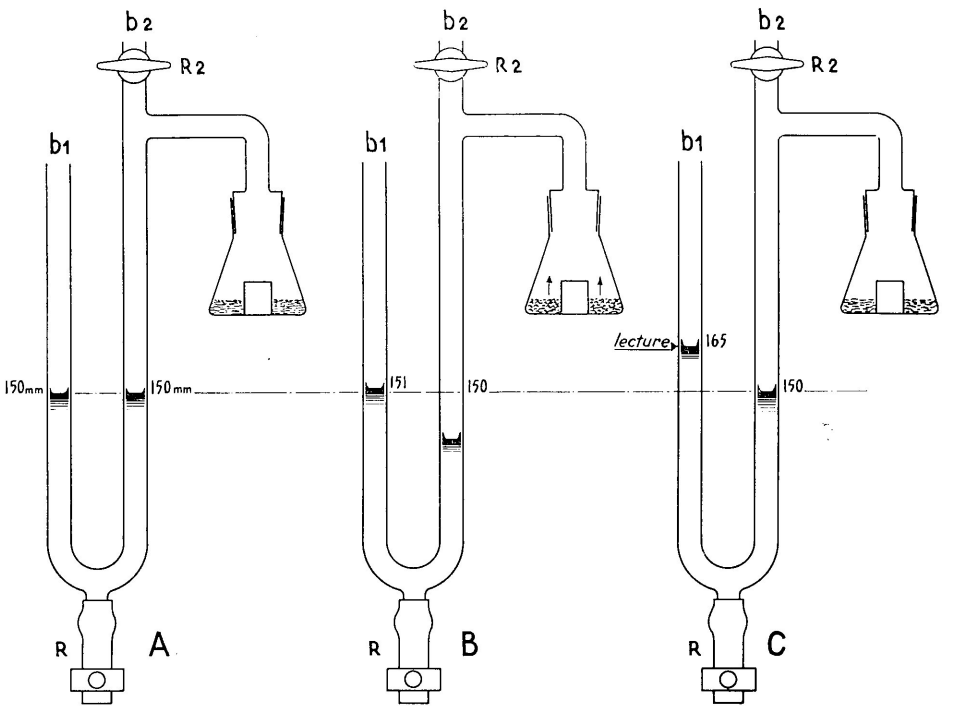
Avant de commencer les mesures, on note le niveau du liquide dans la branche ouverte b_1 car il est généralement un peu au-dessus ou au-dessous de 150 (cf. fig. 2). Ensuite l'agitation des fioles reprend et, après 15 minutes par exemple, et toutes les 15 minutes, on fait une lecture du niveau sur la colonne manométrique.

Prenons l'exemple d'une réaction qui libère un gaz. Le système étant clos, au bout de 15 minutes le gaz dégagé repousse le liquide manométrique vers le bas dans la branche b_2 (fig. 2B).

Etant donné que la mesure doit être faite à volume constant, on ramène ce niveau à 150 dans la branche b_2 à l'aide de la vis v, c'est-à-dire en opérant

F I G U R E 2

Représentation schématique d'un manomètre en cours d'expérience



A : départ ou temps zéro ; le liquide manométrique est au même niveau dans les deux branches.

B : position du liquide manométrique après 15 minutes de réaction.

C : position de lecture : le liquide manométrique a été ramené à 150 (point de départ) dans la branche fermée ; la lecture se fait dans la branche ouverte b_1.

une pression égale, mais de sens opposé à celle exercée sur le liquide par le gaz dégagé. Cette poussée s'exerce également dans la branche ouverte. C'est dans cette branche (à la pression atmosphérique) que se fait la lecture (fig. 2C) si le liquide est parvenu à la graduation 165, la pression du gaz dégagé dans la fiole est : 165 — 151 = + 14 mm de hauteur de liquide manométrique (liquide de Broodie).

Après cette lecture donnant un premier chiffre, l'ensemble est remis en agitation 15 minutes et l'on procède à la seconde mesure dans la branche ouverte, après remise au zéro (150 mm) du liquide manométrique dans la branche fermée. Il existe actuellement des appareils très perfectionnés à lecture directe.

3. Calcul du volume de gaz dégagé.

Rappelons que le système doit être calibré de telle façon que l'on puisse calculer en partant de l'observation des changements de pression (h en mm) la totalité du volume (x en mm^3) de gaz mis en jeu.

On démontre que $x = hk$ (x : gaz dégagé ; h : la dénivellation du liquide observée dans la branche ouverte $[b_1]$ du manomètre ; k : constante du flacon).

$$k = \frac{v_g \frac{273}{T} + V_f \alpha}{P_o}$$

V_g : volume de la phase gazeuse du flacon quand le niveau du liquide de Broodie est à la graduation 150.

T : température absolue du bain-marie.

V_f : volume du liquide placé dans la fiole.

α : solubilité du gaz ambiant — c'est-à-dire celui qui se dégage — dans le liquide du flacon à la température T.

P_o : 10 lorsque le liquide manométrique est le liquide de Broodie.

On emploie un « thermobaromètre » au cours de ces mesures. C'est un ensemble fiole-manomètre, préparé en même temps, et placé dans les mêmes conditions que les autres mais dont la fiole ne contient que de l'eau distillée ou le liquide ayant servi à mettre les microorganismes en suspension. Son rôle est d'indiquer les variations de pression dues aux très faibles variations de la température du bain-marie. On fait une lecture (a) sur le manomètre de mesure et une lecture (b) sur le thermobaromètre. La variation réelle est la différence algébrique (a-b).

II. - Dosage manométrique de l'Acide L-Malique à l'aide de Lactobacillus-arabinosus

L'acide l-malique est décarboxylé en acide lactique sous l'influence des bactéries lactiques. On peut donc doser cet acide en mesurant la quantité de gaz carbonique dégagé.

En 1948, RENTSCHLER (7) a décrit une méthode manométrique pour étudier la décarboxylation de l'acide l-malique des vins par **Bacterium gracile.** La même année, KORKES et OCHOA (8) étudient la transformation quantitative du l(-)malate en lactate par des cellules lavées de **Lactobacillus arabinosus.**

NOSSAL (9 et 10) étudie également en 1951 et 1952 la décarboxylation enzymatique de l'acide l-malique.

Enfin BOSSET et DUPUY (11), puis KOLAR (12), proposent chacun une méthode manométrique de dosage de l'acide l-malique dans les milieux fermentés.

Sous la direction de E. PEYNAUD, en 1963, nous avons adopté le mode opératoire de KOLAR (12) pour doser l'acide l-malique dans les vins ; dans un premier temps, nous avons effectué l'étude du dosage en solution simple, puis dans des vins enrichis en anhydride sulfureux pour connaître l'influence de ce corps sur le dosage.

1. Description de la méthode expérimentale.

La décarboxylation de l'acide malique est obtenue grâce aux enzymes (non isolés) présents dans une suspension de bactéries lactiques. La solution à doser et la suspension de bactéries sont mises en présence, en anaérobiose, et le dégagement gazeux est mesuré avec les manomètres.

a) Préparation de la suspension de bactéries :

La souche utilisée est une souche de **Lactobacillus arabinosus** 17/5 ATCC 8014.

— **Culture :** la bactérie est repiquée aseptiquement dans des tubes contenant 10 ml du milieu suivant :

Glucose	2	%
Acide dl-malique	2	%
Extrait de levure Difco	2	%
Acétate de sodium	1	%
Phosphate de potassium (dipotassique)	0,1	%
Solution saline de Wright et Skegg	5	ml

Cette solution saline contient elle-même, par ml :

Sulfate de magnésium	40	mg
Chlorure de sodium	2	mg
Sulfate de manganèse	2	mg
Sulfate ferreux	2	mg

Le milieu est amené à pH = 5,5 par addition de soude et stérilisé à l'autoclave 20 minutes à 100 °C, deux fois, à 24 heures d'intervalle.

BOSSET et DUPUY (11) ont employé un milieu un peu différent contenant 2,7 % d'acide malique, de l'extrait de bœuf, de la « bactotryptone » ajusté à pH 4,2.

Les bactéries doivent être repiquées deux fois successivement sur ce milieu avant de servir à l'ensemencement de 750 cm^3 du même milieu placé dans un erlenmeyer de 1 litre.

L'incubation se fait à 30 °C pendant 24 heures. On sépare les bactéries par centrifugation. Les bactéries sont ensuite lavées deux fois à l'eau stérile qui est éliminée par centrifugation. Le produit de cette récolte (3 g de poids frais par litre de milieu, d'après KOLAR) est mis en suspension dans 30 ml d'une solution normale de chlorure de potassium contenant 0,45 g de chlorure de manganèse et 0,30 g de phosphate monopotassique.

BOSSET et DUPUY utilisent de leur côté un tampon phosphaté à pH 7 de concentration égale à 0,067 M.

La suspension bactérienne et la solution d'acide malique de référence sont conservées au réfrigérateur à +4 °C.

b) **Manipulation.**

Les mesures se font à l'appareil de Warburg, à 25 °C et à pH 5,5.

La solution à étudier est placée dans la fiole en présence du tampon à pH 5,5, et la suspension bactérienne dans le diverticule latéral, également en présence du tampon. Après équilibre de la température et remplacement de l'air par l'azote, on renverse le contenu du diverticule dans la fiole par une légère inclinaison de celle-ci. Les enzymes bactériens et la solution à doser sont ainsi mis en contact, c'est le temps « zéro » pour les mesures.

Dans un dosage bien conduit, la décarboxylation de 1 mg d'acide l-malique est terminée au bout de 30 minutes, mais il est prudent de poursuivre l'expérience afin d'effectuer une mesure de vérification après 45 minutes. Pour calculer la quantité d'acide malique dégradé à partir du volume de gaz carbonique dégagé, on admet que 1 mg d'acide malique libère 166 mm^3 de gaz carbonique.

En suivant ce mode opératoire, nous avons dosé l'acide l-malique :

— en solution simple dans l'eau ;

— dans un vin blanc additionné de quantités connues d'acide l-malique ;

— dans des vins rouges ;

— dans des moûts de raisins blancs et de raisins rouges.

Ces diverses solutions ne contenaient pas d'anhydride sulfureux libre. Nous avons étudié par la suite l'influence de l'acide sulfureux sur la validité du dosage :

— de l'acide malique en solution simple ;

— de l'acide malique dans les vins lorsque l'acide sulfureux s'y trouve à l'état libre et dans le cas où il s'y trouve totalement combiné.

Nous exposons ici les résultats de cette étude.

2. Résultats expérimentaux.

a) Solutions simples d'acide l-malique.

Nous disposons d'un témoin sans acide malique et de solutions contenant de 0,25 mg à 1 mg d'acide malique dans la prise d'essai, ce qui correspond à des valeurs de 500 mg à 2 g par litre.

Le tableau 1 donne les résultats obtenus en µl de gaz carbonique. La dernière ligne de chiffres représentant la conversion des volumes de CO_2 en g d'acide malique. L'examen de ces chiffres montre que l'on retrouve avec une grande précision les quantités d'acide malique contenues dans les solutions.

b) Addition d'acide l-malique à un vin qui n'en contenait pas.

Un vin blanc sec des Premières Côtes de Bordeaux reçoit 500 mg par litre, 1 g par litre et 2 g par litre d'acide malique, ce qui donne en définitive pour une prise d'essai de 0,5 ml : 0,25 mg, 0,50 mg, 1 mg ; le tableau 2 indique les volumes de gaz carbonique dégagé.

TABLEAU 1

Dosage de l'acide l-malique en solution dans l'eau.
Volume de gaz carbonique dégagé en µl en fonction du temps.

Numéros / temps en mn	Témoin	F_1	F'_1	F_2	F'_2	F_3	F'_3	F_4	F'_4
15	8.5	40	41,5	77,5	79,7	126	122	159	156
30	9.0	40	42,1	81,2	83,9	131	125	164	166
40	9.0	40	42,7	82,6	85,3	132	126	164	166
45	9.0		42,7	82,6	85,3	132	126		
Acide malique en mg calculé à partir de ces chiffres		0,24	0,26	0,50	0,51	0,79	0,76	0,99	1,00
Acide malique réellement présent en mg	0	0,25		0,50		0,75		1,00	

TABLEAU 2

Dosage dans le vin après des additions connues.
Les chiffres représentent également les volumes de CO_2 dégagés au cours du dosage.

Numéros / Temps	Témoin	F_1	F'_1	F_2	F_3
15	4,0	38,1	36,8	83,6	165
30	—	—	37,6	85,0	168
35	6,0	38.1	39,1	86,4	168
50	6,0	38,1	39,1	86,4	—
Acide malique en mg calculé		0,23 mg		0,51	1,01
Acide malique réellement présent en mg		0,25 mg		0,50	1 mg

TABLEAU 3

Dosage de l'acide l-malique des Vins Rouges.
Comparaison avec l'estimation chromatographique.

Numéros	Méthode manométrique acide malique en g/l	Estimation chromatographique acide malique en g/l
A	0,25 0,21	Traces
B	1,64 1,54	1
C	2,62 2,47	2,5

TABLEAU 4

Dosage de l'acide l-malique des moûts.
Comparaison avec la méthode chimique.

Type	Méthode chimique		Méthode manométrique	
	meq/l	g/l	meq	g
« Lafite » Merlot :				
A	241	16,1	246	16,5
B	59	3,9	52	3,5
« Pape Clément » Merlot:				
A	210	14,1	236	15,8
B	71	4,7	67	4,5
C	31	2,1	33	2,2

TABLEAU 5

Influence de l'anhydride sulfureux libre
sur le dosage de l'acide l-malique.
Volume en µl de gaz carbonique dégagé en fonction du temps.

SO_2 l en mg/l Durée en mn	22	51	51	83	180
30	46,5	56,0	35,4	32,6	38,0
45	57,3	64,4	47,7	41,2	42,1
60	97,8	96,6	87,7	82,3	55,7
75	97,8	97,2	87,9	82,4	66,6
Acide malique calculé en g par litre	1,15	1,15	1,06	0,99	0,80

* L'échantillon contenait 1,15 g/l d'acide l-malique.

TABLEAU 6

Influence de l'anhydride sulfureux libre
sur le dosage de l'acide l-malique.
Volume en µl de gaz carbonique dégagé en fonction du temps.

SO_2 l en mg/l / Durée en mn	Témoin 0	47	47	140	140	236	236
15	112	120	128	107	99,5	71,0	78,3
20	137	128	139	120	117	106	100
35	141	139	144	121	120	116	104
45	142	139	144	124	126	118	118
60	142	—	—	124	126	118	118
Acide malique calculé en g/l	1,71	1,71		1,51		1,42	

* L'échantillon contient 1,71 g/l d'acide l-malique.

TABLEAU 7

Dosage de l'acide l-malique dans le vin sulfité
à des doses variables en présence de SO_2 libre ou combiné.
Les dégagements de gaz carbonique sont exprimés en µl.

Numéros / Temps en mm	Témoin	144 mg/l SO_2		204 mg/l SO_2		416 mg/l SO_2	
		libre	combiné	libre	combiné	libre	combiné
20	62,5	78,0	69,0	65,7	56,1	19,3	94,2
30	132	136	143	135	117	81,7	147
50	152	138	153	145	141	108	151
70	156	144	159	145	151	116	152
90	157	144	159	145	161	120	152
Acide malique calculé en g/l	**1,88**	1,73	**1,91**	1,75	**1,93**	1,44	**1,82**

* L'échantillon du vin contient 2,0 g/l d'acide malique.

c) **Dosage de l'acide malique dans les vins rouges et dans les moûts.**

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau 3. Les concentrations trouvées sont en accord avec l'estimation chromatographique.

Une série d'analyses est faite sur des moûts de raisins mûrs dont la teneur en acide malique est connue par dosage chimique, effectués par MAURIÉ.
Les résultats sont exposés dans le tableau 4.

On note toujours une très bonne concordance des résultats effectués en double par la méthode manométrique et une assez bonne concordance avec la méthode chimique. Malgré les écarts que l'on peut constater, la méthode manométrique est certainement plus sûre que la méthode chimique.

d) **Influence de la teneur en anhydride sulfureux libre sur le dosage.**

KOLAR (12) a montré que l'alcool aux concentrations du vin, et le sucre aux concentrations du moût, ne gênent pas le dosage. Il reste à voir si l'acide sulfureux libre des vins blancs ne bloque pas la décarboxylation.

Un vin blanc contenant 1,15 g par litre d'acide malique reçoit des doses croissantes d'anhydride sulfureux. Une partie de cet anhydride sulfureux est naturellement combinée dans le vin, le reste est à l'état libre au moment du dosage. L'examen du tableau 5 montre combien l'acide sulfureux retarde la décarboxylation. Pour 80 mg par litre de SO_2 libre, 75 minutes ne suffisent pas pour que se termine la décarboxylation. D'autres essais ont été faits avec différentes doses d'anhydride sulfureux ; ils sont rapportés dans le tableau 6.

Nous pouvons conclure que 50 mg par litre d'anhydride sulfureux libre n'ont aucun effet sur la décarboxylation : le dosage peut être effectué sans erreur dans le temps normal. Des doses plus fortes, 80, 100 et 140 mg par litre, ralentissent la décarboxylation et la rendent incomplète (12 % dans le dernier cas considéré). La présence à dose élevée d'acide sulfureux libre dans les vins est donc un inconvénient pour le dosage manométrique de l'acide l-malique.

Nous avons donc cherché à éliminer cet inconvénient en étudiant l'effet de l'anhydride sulfureux sous forme combinée. L'anhydride sulfureux est combiné par addition d'éthanal (en solution fraîchement distillée). Malgré les doses très élevées d'anhydride sulfureux ajouté (jusqu'à 250 mg par litre), le dosage devient possible, l'inhibition très légère de la décarboxylation pouvant être négligée.

En faisant des mesures parallèles sur le vin sulfité à des doses variables, puis additionné ou non d'éthanal, nous avons toujours constaté que l'acide sulfureux libre retardait la décarboxylation et affectait le résultat final, alors que l'anhydride sulfureux, combiné par addition suffisante d'éthanal, ne le modifiait pas. Les résultats expérimentaux conduisant à cette conclusion sont exposés dans le tableau 7.

III. - Conclusion

La méthode enzymatique de dosage de l'acide l-malique à l'aide de **Lactobacillus arabinosus** par mesure manométrique est sensible, spécifique et précise. Elle permet de déterminer des teneurs d'acide malique faibles.

Elle peut être appliquée au vin directement ; dans le cas où celui-ci contient beaucoup d'anhydride sulfureux libre, il suffit de le combiner par addition d'éthanal, pour disposer à nouveau d'une méthode de dosage très précise.

BIBLIOGRAPHIE

(1) UMBREIT W.W., BURRIS R.M. and STAUFFER J.F. : **Manometric Techniques,** 3e ed., Burgess Publishing Co.

(2) GATET L. : Recherches biochimiques sur la maturation des fruits, **Ann. de physiol.,** 1939, **15,** 987-1061.

(3) SAULNIER-BLACHE P. : Etude du développement du raisin, I : Croissance, accumulation des protéines et respiration pendant le passage de la phase végétative à la maturation, **Ann. physiol. vég.,** 1963, **5,** 217-228.

(4) LAFON M. : Sur quelques caractères physiologiques et biochimiques des levures du vin, **Ann. Inst. Pasteur,** 1956, **91,** 91.

(5) PEYNAUD E., DOMERCQ S., BOIDRON A.M., LAFON-LAFOURCADE S. : Etude des levures Schizosaccharomyces métabolisant l'acide l-malique. **Archiv. für Mikrobiol.,** 1964, **48,** 150-165.

(6) RIBÉREAU-GAYON G., PEYNAUD E., LAFOURCADE S. et LAFON M. : **Bull. Soc. Chim. biol.,** 1958, **40,** 189.

(7) RENTSCHLER H. : Methode für die quantitative Bestimmung der Apfelsaüre, **Mitteil. Geb. Lebensm. Unters. Hygiene,** 1948, **39,** 30.

(8) KORKES and OCHOA S. : Adaptive conversion of malate to lactate and carbon dioxide by **Lactobacillus arabinosus, J. Biol. chem.,** 1948, **176,** 463-64.

(9) NOSSAL P.M. : The decarboxylation of malic acid by **Lactobacillus arabinosus, Bioch. J.,** 1951, **49,** 407.

(10) NOSSAL P.M. : Estimation of l(-)malate and fumarate by malic decarboxylase of **Lactobacillus arabinosus, Bioch. J.,** 1952, **50,** 349.

(11) BOSSET R. et DUPUY P. : Détermination de l'acide l-malique dans les boissons fermentées par décarboxylation enzymatique, **Ann. Technol. Agric.,** 1958, **4,** 441.

(12) KOLAR G.F. : Manometric determination of l(-)malic acid in Grape, Musts and Wines, **Amer. J. Enol. Vitic.,** 1962, **13,** 99.