PROPRIETES DE L'ENZYME MALIQUE DES BACTERIES LACTIQUES ISOLEES DE VINS

Mme S. LAFON-LAFOURCADE
Institut d'Œnologie, Université de Bordeaux,
Institut National de la Recherche Agronomique

Nous avons dressé pour une centaine de bactéries isolées de vins, un inventaire de leur richesse en enzyme malique et les avons classées suivant le caractère adaptatif ou constitutif de cette enzyme. Cette étude établit que la majorité des bactéries possèdent une enzyme constitutive, mais que le caractère adaptatif se retrouve avec des souches de presque toutes les espèces, sauf cependant pour celles qui appartiennent au groupe des lactobacilles hétérolactiques.

On rencontre encore quelques bacilles hétérolactiques apparemment dépourvus d'enzyme malique ; le caractère constitutif de l'enzyme malique se rencontre fréquemment chez les coques, qui peuvent être considérés comme les bactéries malolactiques typiques et les véritables agents de cette transformation dans les conditions de la pratique. Nous avans sélectionné parmi les coques, une vingtaine de souches à potentiel enzymatique élevé. C'est sur ces propriétés que reposent les critères de base de la sélection des souches destinées à des ensemencements bactériens pour induire la fermentation malolactique dans la pratique.

Le comportement différent des bactéries lactiques vis-à-vis de l'acide L malique suivant la nature du test utilisé permet de supposer qu'il existe plusieurs sortes d'enzyme malique d'activité, de localisation et de diffusion différentes ; il n'est pas exclu encore que la fermentation lactique de l'acide L malique puisse s'opérer par des voies différentes.

L'intérêt œnologique que présentent les bactéries lactiques des vins réside dans leur capacité à transformer l'acide L malique en acide L (+) lactique. Nous avons démontré que les processus de cette dégradation se ramènent vraisemblablement à une réaction enzymatique simple (PEYNAUD et **al.**, 1968). Il s'agit en somme d'une simple décarboxylation. La cellule bactérienne peut être considérée comme le support d'un potentiel plus ou moins important d' « enzyme malique », agent de la fermentation lactique de l'acide malique ou fermentation malolactique.

Une des propriétés fondamentales de l'enzyme malique relève, sans conteste, de son caractère « constitutif » ou « adaptif ». On la dit

« constitutive » lorsqu'elle fait partie intégrante et constante du stock enzymatique de la cellule ; elle est « adaptive » si, inexistante à l'origine, elle est susceptible d'être induite dans la cellule par la présence de certaines substances contenues dans le milieu de culture bactérien, et en particulier par l'acide L malique lui-même.

BLANCHARD et **al.** (1950), analysant le rôle de la biotine dans le métabolisme de **Lactobacillus arabinosus,** ont découvert que les cellules de cette bactérie deviennent extrêmement actives vis-à-vis de l'acide L malique lorsqu'elles sont précultivées en présence de cet acide. NATHAN (1961) a précisé le caractère spécifique de cette induction : parmi les trente acides carboxyliques étudiés, seuls le fumarate, le mésaconate et le DL méthylsuccinate présentent cette propriété mais à un degré très faible et l'acide L malique est donc pratiquement le seul inducteur de l'enzyme malique. D'après RADLER (1967) la présence de son stéréoisomère, l'acide D malique, à forte concentration, inhibe l'action de l'enzyme ; cette inhibition ne se manifesterait cependant pas encore pour des teneurs en acide D malique doubles de celles de l'acide L malique.

Le caractère de l'enzyme malique des bactéries lactiques du cidre a été étudié par WHITING et COGGINS (1963) : il est variable selon les souches. RADLER (1967) a confirmé ce résultat pour huit bactéries d'espèces différentes.

Un travail approfondi concernant un nombre important de bactéries lactiques isolées des vins n'avait pas été mené jusqu'ici ; il présente un double intérêt, au point de vue théorique et technologique. Nous avons déterminé les caractères de l'enzyme malique d'une centaine de souches bactériennes, en les cultivant parallèlement en présence et en l'absence d'acide DL malique et en testant leur activité vis-à-vis de l'acide L malique. L'étude a porté sur 42 bacilles, dont 14 homofermentaires et 52 hétérofermentaires et 58 coques dont 6 homofermentaires et 52 hétérofermentaires. A l'exception de quelques souches de référence provenant de collections étrangères, toutes les bactéries ont été isolées de vins et appartiennent à la collection de la Station œnologique établie par Mme S. SAPIS-DOMERCQ. Ces bactéries ont fait l'objet de plusieurs travaux de classification et nous utilisons pour les désigner la nomenclature établie par les chercheurs de la Station œnologique (PEYNAUD, 1967 ; PEYNAUD et DOMERCQ, 1967, 1968, 1970).

TECHNIQUES OPÉRATOIRES

Les bactéries sont cultivées à 30° C sur milieu MRS modifié comportant ou non 5 g d'acide DL malique par litre.

Composition (pour 1 litre) du milieu MRS modifié : Tryptone Difco 10 g ; extrait de viande 10 g ; extrait de levure 5 g ; glucose 2 g ; fructose 2 g ; arabinose 2 g ; xylose 2 g ; phosphate dipotassique 2 g ; acétate de sodium 5 g ; acide citrique 2 g ; sulfate d'ammonium 2 g ; sulfate de magnésium 0,2 g ; sulfate de manganèse 0,05 g. Le milieu est ajusté à pH 4,8.

Après quatre passages de trois à quatre jours chacun sur ces milieux, les cellules sont lavées et recueillies par centrifugation à 9.000 tours par minute à la température de 0° C.

Le milieu d'expérience a la composition suivante par litre : phosphate dipotassique 2 g ; sulfate de magnésium 0,125 g ; sulfate de manganèse 0,025 g ; acide L malique 50 à 70 milliéquivalents. Le milieu est ajusté à pH 4,0. Il est réparti dans des tubes à essai à raison de 10 ml par tube et stérilisé à 115° C pendant 10 minutes. Après refroidissement on ajoute 10 — 20 — 50 mg de bactéries fraîches, en suspension dans l'eau, et on porte à incubation à 30° C. Des dosages d'acidité totale sont effectués après 5, 24 et éventuellement 48 heures. Dans cette expérimentation, nous avons fait varier les conditions de poids de bactéries mises en œuvre et de durée d'action pour mieux contrôler le phénomène de dégradation de l'acide malique et comparer les bactéries entre elles. Dans une codification de ce test, on pourrait choisir des conditions fixes, par exemple 50 mg de bactéries fraîches pour 10 ml et une durée d'essai de 5 heures.

La différence d'acidité totale dans le milieu d'expérience avant et après addition d'acide L malique donne la teneur exacte du milieu en cet acide. La disparition de la moitié de l'acidité totale dans les tubes soumis à l'essai signifie une transformation complète de l'acide L malique.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

L'activité enzymatique des bactéries lactiques vis-à-vis de l'acide L malique se développe avec des intensités variables selon les souches et le mode de préculture bactérienne utilisé. Le tableau I donne des exemples typiques des quatre cas rencontrés :

TABLEAU I

Exemples de dégradation enzymatique de l'acide L malique

		Leuco. oinos 1		Pedio. cerevisiae 2		Leuco. gracile 3	Pedio. cerevisiae 4	Lacto. brevis 5	Lacto. hilgardii 6
Préculture	Poids de bactéries (g/l)	5 h	24 h	5 h	24 h	24 h	24 h	24 h	24 h
Sans acide malique	1	13	50	19	49	4	3	50	0
	2	26	50	30	50	4	3	50	0
	5	43	50	41	50	4	3	50	0
Avec acide malique	1	13	50	19	50	16	50	10	0
	2	26	50	30	50	24	50	12	0
	5	43	50	41	50	42	50	16	0

Les résultats sont exprimés en milliéquivalents d'acide malique transformé par litre ; 50 milliéquivalents correspondent à la transformation complète de l'acide malique.

1° Beaucoup de souches transforment l'acide L malique à la même vitesse, que le milieu de préculture ait comporté ou non de l'acide L malique. Ce sont des bactéries à enzyme malique constitutive.

2° Certaines souches attaquent l'acide L malique seulement dans la mesure où elles proviennent d'un milieu qui contenait déjà cet acide. Ce sont des bactéries à enzyme malique inductible.

3° Quelques rares souches à enzyme malique constitutive présentent une activité diminuée lorsqu'elles ont été précultivées en présence d'acide DL malique.

4° Enfin d'autres souches ne manifestent aucune activité enzymatique dans les conditions d'expérience, quelle que soit la composition du milieu de préculture. Ces bactéries paraissent dépourvues d'enzyme malique.

Répartition des caractères inductible et constitutif de l'enzyme malique chez les bactéries lactiques. — Dans le tableau II, nous avons classé les 100 bactéries étudiées, suivant les quatre groupes ainsi définis.

La première observation qui s'impose est la prédominance du caractère constitutif de l'enzyme malique chez les bactéries lactiques isolées de vins : c'est le cas pour 77 p. 100 des souches essayées. Ce caractère se retrouve dans 61 p. 100 des bacilles homofermentaires, 64 p. 100 des bacilles hétérofermentaires, 83 p. 100 des coques homofermentaires, 86 p. 100 des coques hétérofermentaires.

Tout particulièrement les bactéries qui appartiennent à la famille des coques se rangent en grand nombre dans ce groupe. Ce fait possède une signification œnologique certaine. Il confirme que, dans les transformations spontanées, les coques peuvent être considérés comme les bactéries malolactiques les plus actives. Il donne encore la raison pour laquelle, d'une manière générale, les essais d'induction de fermentation malolactique par ensemencement du vin réussissent mieux lorsqu'on utilise des coques que lorsqu'on utilise des bacilles. Cependant, bien que dominant, le caractère constitutif de l'enzyme malique ne peut servir de critère de caractérisation d'une espèce bactérienne, car le caractère adaptatif se rencontre aussi pour quelques souches, presque dans chaque espèces. Ainsi parmi les bacilles homofermentaires les deux caractères se retrouvent dans les espèces **Lactobacillus plantarum** et **Lactobacillus casei.** Pour six coques homofermentaires appartenant à l'espèce **Pediococcus cerevisiae,** cinq possèdent une enzyme malique constitutive et un seul

TABLEAU II

Répartition des bactéries étudiées en fonction de la nature de l'enzyme malique

	Bacilles homolactiques **Lactobacillus**	Bacilles hétérolactiques **Lactobacillus**	Coques homolactiques **Pediococcus**	Coques hétérolactiques **Leuconostoc**	Total des souches
Enzyme malique constitutif	4 **Streptobacterium** 3 **casei** 2 **plantarum**	10 **hilgardii** 6 **fructivorans** 2 **brevis**	5 **cerevisias**	34 **oinos** 11 **gracile**	77
Enzyme malique adaptatif	4 **plantarum** 1 **casei**		1 **cerevisiae**	3 **oinos** 2 **gracile**	11
Inhibition par l'acide malique		1 **brevis** 1 **hilgardii**			2
Test d'enzyme malique négatif		6 **hilgardii** 3 **brevis** 1 **desidiosus**			10

une enzyme malique inductible. Parmi les coques hétérofermentaires appartenant aux espèces **Leuconostoc gracile** et **Leuconostoc oinos**, 9 p. 100 des souches présentent une enzyme malique inductible.

En résumé, le caractère adaptatif ou constitutif de l'enzyme malique paraît lié à la souche, ce qui rejoint les observations de WHITING et COGGINS. Mais la majorité des souches et tous les lactobacilles hétérofermentaires possèdent l'enzyme constitutive. Cependant BARRE (1969) a observé des lactobacilles hétérofermentaires à activité inductible.

Il existe, en outre, quelques rares souches de lactobacilles à enzyme malique constitutive qui développent une activité enzymatique plus faible vis-à-vis de l'acide L malique après plusieurs passages sur des milieux riches en acide DL malique. On pourrait penser qu'il s'agit de bactéries particulièrement sensibles à la forme D de l'acide malique.

D'autres bactéries lactiques isolées de vins donnent des tests négatifs et semblent totalement dépourvues d'enzyme malique. On les trouve exclusivement parmi le groupe des bacilles hétérofermentaires. Elles appartiennent aux espèces **Lactobacillus desidiosus, Lactobacillus hilgardii** (37 p. 100 des souches) **Lactobacillus brevis** (60 p. 100 des souches). Il faut souligner que ce groupe ne comporte pas de souches à enzyme inductible. Les autres microorganismes testés : **L. fructivorans, L. hilgardii, L. brevis,** (64 p. 100) ont une enzyme malique constitutive.

Sélection des souches à des fins technologiques. — Pour être utilisées à l'ensemencement des vins et provoquer la fermentation malolactique, les bactéries lactiques doivent posséder un fort potentiel enzyme malique, de préférence de caractère constitutif. En effet, pour mener à son terme la dégradation malolactique, la bactérie doit de préférence comporter un enzyme malique dont l'activité est indépendante du milieu de culture. En effet, le processus commencé en présence d'une forte concentration en acide L malique se poursuit dans un milieu qui s'appauvrit progressivement, de telle sorte que les dernières générations bactériennes ne trouveraient plus l'acide malique nécessaire à l'induction de l'enzyme.

Parmi les souches à enzyme malique constitutive, nous avons sélectionné 25 souches susceptibles de dégrader 75 à 100 p. 100 des 50 milliéquivalents d'acide L malique par litre, en 24 heures, à la dose de 1g de bactéries (en poids frais) par litre. Parmi ces souches les plus actives, nous relevons 5 souches de lactobacilles homolactiques et 5 autres hétérolactiques, une souche de **Pediococcus** et 14 souches de **Leuconostoc.**

La richesse en enzyme malique et le caractère constitutif sont certainement deux qualités importantes à considérer dans la sélection d'une souche d'ensemencement dans la pratique. Mais ces caractères ne suffisent pas, d'autres facteurs interviennent, en particulier la résistance à l'alcool et au pH bas (LAFON-LAFOURCADE et **al.**, 1968).

Comparaison de différents tests de fermentation de l'acide malique. — Nous avons essayé de déterminer la richesse en enzyme malique et de définir le caractère adaptatif ou constitutif de cet enzyme pour un grand nombre de bactéries lactiques isolées de vins, au moyen de cellules non proliférantes introduites dans un milieu synthétique contenant de l'acide L malique, sans autre élément nutritif azoté ou carboné. En outre, le délai imparti et la masse bactérienne mise en œuvre ne permettaient ni croissance, ni adaptation au milieu, mais seulement la réaction de dégradation malolactique.

Parallèlement à nos travaux, ces mêmes souches ont été étudiées par S. DOMERCQ en ce qui concerne leur aptitude à faire fermenter l'acide L malique dans le jus de raisin dilué et enrichi en aliments azotés, pendant leur croissance à partir des sucres, et leur capacité à se développer sur l'acide L malique comme seule source de carbone dans un milieu synthétique de culture (milieu de CARR : caséine hydrolysée, extrait de levure, sels minéraux).

Toutes les données ainsi obtenues concordent pour les bacilles homofermentaires et pour les coques homo et hétérofermentaires. Ces bactéries font fermenter l'acide L malique à des pH plus ou moins élevés dans le jus de raisin, elles se développent assez bien sur cet acide et sont suffisamment pourvues en enzyme malique de l'un ou l'autre caractère. Mais les bacilles hétérofermentaires ont des réponses différentes à ces différents tests, comme le montre le tableau III.

Un fort pourcentage des bacilles hétérofermentaires ont des propriétés constantes vis-à-vis de l'acide L malique (groupe 1); ils sont bien pourvus en enzyme malique constitutive, ils se développent aisément sur l'acide L malique et le font fermenter dans le jus de raisin.

A l'opposé, une souche, **Lactobacillus hilgardii** Cv 123, se montre parfaitement inactive vis-à-vis de l'acide L malique ; elle est dépourvue d'enzyme malique, ne se développe pas sur cet acide et ne le fait pas fermenter dans le jus de raisin (groupe 2).

TABLEAU III

Classement des bacilles hétérolactiques suivant leur réponse aux différents tests de fermentation de l'acide malique
(Ce tableau donne seulement quelques exemples)

		Nature de l'enzyme malique	Croissance sur acide malique	pH-seuil de fermentation malolactique sur moût de raisin
Groupe 1	12 souches			
L. hilgardii	BC 151	constitutif	+	3,2
L. hilgardii	DD 21	constitutif	+	3,0
L. brevis	C 12	constitutif	+	3,0
L. fructivorans	Bn 1	constitutif	+	3,4
Groupe 2	1 souche			
L. hilgardii	CV 123	inactif	—	pas de fermentation
Groupe 3	2 souches			
L. hilgardii	Bz 21	constitutif	—	3,8
L. fructivorans	Ra 11	constitutif	—	3,0
Groupe 4	6 souches			
L. hilgardii	An 1	inactif	—	3,8
L. brevis	L 5	inactif	—	3,8
Groupe 5	1 souche			
L. hilgardii	Is	constitutif	+	pas de fermentation

Deux autres souches de **Lactobacillus hilgardii** et **Lactobacillus fructivorans** possèdent une enzyme malique constitutive, attaquent l'acide L malique dans le jus de raisin mais ne se développent pas sur l'acide L malique (groupe 3).

Un certain nombre d'autres souches de **Lactobacillus hilgardii, Lactobacillus brevis** et **Lactobacillus desidiosus** ne provoquent pas la dégradation malolactique dans le milieu d'expérience mais provoquent une fermentation malolactique dans le jus de raisin (groupe 4). Diverses hypothèses peuvent expliquer ce fait. On peut penser qu'il existe suivant les souches de bactéries des enzymes maliques de nature et de localisation différentes dans les cellules, plus ou moins diffusibles dans le milieu, ou même que la dégradation de l'acide malique s'effectue par des voies différentes selon qu'il s'agit de cellules non proliférantes ou d'un phénomène couplé avec celui de la croissance bactérienne. On comprend que suivant l'état endogène ou exogène de l'enzyme malique, suivant qu'il

exige ou non la pénétration de l'acide malique dans les cellules, la réponse test utilisé peut être positive ou négative, et différente si les cellules sont mortes ou vivantes.

Enfin nous avons observé le cas d'une souche de **Lactobacillus hilgardii,** possédant une enzyme malique constitutive et cependant n'attaquant pas l'acide L malique pendant sa croissance sur jus de raisin même au-dessus de pH 4,0 (groupe 5) ; la présence et la transformation d'une grande quantité de sucre peuvent peut-être gêner la fermentation de l'acide malique.

BIBLIOGRAPHIE

BLANCHARD M.L., KORKES S., DEL CAMPILLO A. et OCHOA S., 1950. Function of biotin in the metabolism of **Lactobacillus arabinosus, J. Biol. Chem., 187,** 875.

BARRE P., 1969. Taxonomie numérique de lactobacilles isolés du vin. **Ark. Mikrobiol., 68,** 74-76.

LAFON-LAFOURCADE S., DOMERCQ S. et PEYNAUD E., 1968. Etude de l'ensemencement des vins par les bactéries de la fermentation malolactique. **Conn. Vigne Vin, 2,** 83.

NATHAN H., 1961. Introduction of malic enzyme and of oxalacetate decarboxylase in three lactic acid bacteria. **J. Gen. Microbiol., 25,** 415.

PEYNAUD E., 1967. Etudes récentes sur les bactéries lactiques du vin. II[e] Symposium International d'Œnologie, Bordeaux-Cognac.

PEYNAUD E. et DOMERCQ S., 1967. Etude de quelques bacilles homolactiques isolés de vins. **Archiv für Mikrob., 57,** 255.

PEYNAUD E. et DOMERCQ S., 1967. Etude de quelques coques homolactiques isolés de vins. **Rev. Ferm. Ind. alim.,** Bruxelles, **22,** 133.

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

PEYNAUD E., LAFON-LAFOURCADE S. et GUIMBERTEAU G., 1968. Uber den Mechanismus des Apfelsäure-Milchsäure-Gärung, **Mitteillungen, 5,** 343.

PEYNAUD E. et DOMERCQ S., 1968. Etude de quatre cents souches de coques hétérolactiques isolées de vins. **Ann. Inst. Pasteur Lille, 19,** 159.

PEYNAUD E. et LAFON-LAFOURCADE S., 1969. Nature de l'enzyme malique des bactéries lactiques isolées de vins. **C.R. Acad. Sci., 270,** 228.

PEYNAUD E. et SAPIS-DOMERCQ S., 1970. Etude de deux cent cinquante souches de bacilles hétérofermentaires isolés de vins. **Archiv. für Mikrob., 70,** 348.

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

WHITING G.C. et COGGINS R.A., 1963. Metabolism of malate and citrate by lactic acid bacteria. **Ann. Rept. Agr. Hort. Res. Sta. Long Ashton,** p. 157.