



**HAL**  
open science

**Réacteur à enzyme malolactique et NAD. Production de l'enzyme malolactique de leuconostoc oenos 84-06 ; Mise au point d'un réacteur à enzyme malolactique et NAD ; Application à la fermentation malolactique des vins**

Bernadette Festaz-Furet

► **To cite this version:**

Bernadette Festaz-Furet. Réacteur à enzyme malolactique et NAD. Production de l'enzyme malolactique de leuconostoc oenos 84-06 ; Mise au point d'un réacteur à enzyme malolactique et NAD ; Application à la fermentation malolactique des vins. Biotechnologies. Université Jean Monnet - Saint-Etienne, 1991. Français. NNT: . tel-01070731

**HAL Id: tel-01070731**

**<https://theses.hal.science/tel-01070731v1>**

Submitted on 2 Oct 2014

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# THÈSE

présentée devant  
L'UNIVERSITÉ DE SAINT-ÉTIENNE

pour l'obtention du  
DIPLOME DE DOCTORAT  
en Génie Biologique et Médical

par  
Bernadette FETAZ-FURET

---

**RÉACTEUR À ENZYME MALOLACTIQUE ET NAD**  
**PRODUCTION DE L'ENZYME MALOLACTIQUE DE *Leuconostoc oenos* 84-06**  
**MISE AU POINT D'UN RÉACTEUR À ENZYME MALOLACTIQUE ET NAD**  
**APPLICATION À LA FERMENTATION MALOLACTIQUE DES VINS**

---

Soutenue le 22 novembre 1991

## JURY

Monsieur J.C. Healy  
Madame A. Lonvaud-Funel  
Monsieur G. Bardeletti  
Monsieur L. Simard  
Monsieur C. Tran-Minh



# THÈSE

présentée devant  
L'UNIVERSITÉ DE SAINT-ÉTIENNE

pour l'obtention du  
DIPLÔME DE DOCTORAT  
en Génie Biologique et Médical

par  
Bernadette FETAZ-FURET

---

**RÉACTEUR À ENZYME MALOLACTIQUE ET NAD**  
**PRODUCTION DE L'ENZYME MALOLACTIQUE DE *Leuconostoc oenos* 84-06**  
**MISE AU POINT D'UN RÉACTEUR À ENZYME MALOLACTIQUE ET NAD**  
**APPLICATION À LA FERMENTATION MALOLACTIQUE DES VINS**

---

Soutenue le 22 novembre 1991

## JURY

Monsieur J.C. Healy

Madame A. Lonvaud-Funel

Monsieur G. Bardeletti

Monsieur L. Simard

Monsieur C. Tran-Minh



*A mes parents  
A Jacky avec tout mon amour  
A la petite graine qui grandit dans mon ventre...*

*« L'expérience de chacun est le trésor de tous. »*

*Gérard De Nerval*



Ce travail a été réalisé dans le laboratoire de Biotechnologie de l'École Nationale Supérieure des Mines de Saint-Étienne sous la direction Monsieur C. TRAN-MINH. Je le remercie de m'avoir accueillie et de m'avoir fourni tous les moyens nécessaires à la réalisation de ces recherches.

Je voudrais exprimer toute ma reconnaissance à Madame A. LONVAUD-FUNEL, Professeur à l'Institut d'Œnologie de Bordeaux qui m'a reçue dans son laboratoire, et m'a ouvert les portes du vaste domaine de la microbiologie et de la biochimie du vin. Ses conseils tout au long de cette étude et son expérience m'ont été d'un grand enseignement. Je remercie également l'ensemble de son équipe.

Je remercie Monsieur le Professeur J.-C. HEALY, de la Faculté de Médecine de Saint Etienne d'avoir proposé et soutenu ce projet et d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse.

J'adresse mes très sincères remerciements à Madame le Professeur A. LONVAUD-FUNEL de l'Institut d'Œnologie de Bordeaux et à Monsieur le Professeur G. BARDELETTI, de l'Université Cl. Bernard de Lyon d'avoir accepté d'évaluer ce mémoire en qualité de rapporteurs et de membres du jury.

Mes remerciements vont également à Monsieur L. SIMARD et à Monsieur C. TRAN-MINH pour avoir accepté de participer au jury chargé d'examiner cette thèse.





Je tiens à exprimer toute ma sympathie à L. SIMARD pour sa collaboration, son enthousiasme et son soutien durant toute cette thèse. Qu'à travers lui soit remerciée la société HOSPAL-COT qui m'a fourni les réacteurs.

J'exprime toute ma reconnaissance à F. LANTREIBECQ pour sa participation et ses conseils avertis et à H. VAILLANT pour sa compétence et son aide tout au long de ce travail.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à l'ensemble des membres de l'École des Mines qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail. Mes remerciements vont au personnel du laboratoire de Biotechnologie et tout particulièrement à D. CHAVANNE et à M-C. BARTHOLIN pour leur sympathie et leur aide permanente et efficace, à H. BESSET et à A-M. DANNA pour leurs coups de main.

Je remercie également J-M. JEZEQUEL et S. MOTTIN pour leur assistance et leurs précieux conseils en électronique et en informatique.

J'adresse à C. QUINCELET et à R. GUILLEMET toute mon amitié ; leur soutien m'a été infiniment précieux.

Enfin, je souhaite bon courage et mes sincères vœux de réussite à Florence, Françoise, Isabelle, Georges, Gilles, Helmut, Jean-Pascal et Satish.

Je dois beaucoup à cet outil fantastique qu'est le Macintosh® et à ses différents logiciels (Word, Excel, Super Paint, Cricket Graph, 4D, Draw, Claris CAD) qui m'ont accompagnée tout au long de mes travaux, lors de la rédaction de cet ouvrage et lors de la soutenance de mon diplôme.





Ce travail a été réalisé grâce au soutien financier :

- de la région Rhône-Alpes qui m'a alloué une bourse d'étude pendant la durée de cette thèse,
- de l'École des Mines de Saint-Étienne,
- de la Fondation Rhône-Alpes-Futur.

#### **AVERTISSEMENT**

Bien qu'une demande de brevet ait été déposée pour les résultats concernant les réacteurs, certains détails et certaines interprétations ont volontairement été occultés pour des raisons de confidentialité.



<b>INTRODUCTION</b> .....	1
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	
<b>I-HISTORIQUE</b> .....	5
<b>II-TAXONOMIE</b> .....	7
<b>III-FACTEURS INTERVENANT SUR LA CROISSANCE ET L'ACTIVITÉ MALOLACTIQUE DES BACTÉRIES LACTIQUES DANS LE VIN</b> .....	10
III-1 PH .....	10
III-2 ALCOOL.....	10
III-3 TEMPÉRATURE.....	10
III-4 OXYGENE ET DIOXYDE DE CARBONE .....	11
III-5 SULFITAGE .....	11
III-6 PROCÉDÉ DE VINIFICATION .....	11
III-7 RELATIONS ENTRE LES BACTÉRIES LACTIQUES ET LES AUTRES MICROORGANISMES .....	11
<b>IV-LES EFFETS DE LA FERMENTATION MALOLACTIQUE</b> .....	13
IV-1 DÉSACIDIFICATION.....	13
IV-2 STABILISATION BIOLOGIQUE.....	13
IV-3 MODIFICATION DE LA COMPOSITION DU VIN ET DES QUALITÉS ORGANOLEPTIQUES [Davis <i>et al.</i> , 1985 ; Lonvaud-Funel, 1986].....	13
<b>V-AMÉLIORATION DE LA FERMENTATION MALOLACTIQUE</b> .....	15
V-1 LIMITATION DE L'ACTION DES INHIBITEURS.....	15
V-2 TECHNIQUES DIVERSES .....	15
V-3 UTILISATION DE LEVAINS MALOLACTIQUES .....	15
V-4 GÉNIE GÉNÉTIQUE.....	17
V-5 RÉACTEURS À BACTÉRIES LACTIQUES OU À ENZYME MALOLACTIQUE.....	18
V-5-1 Réacteurs à bactéries lactiques.....	18
V-5-2 Réacteurs à enzyme malolactique .....	24

<b>VI-MÉCANISME BIOCHIMIQUE DE LA FERMENTATION MALOLACTIQUE</b> .....	25
<b>VII-TECHNIQUES DE PURIFICATION DE L'ENZYME MALOLACTIQUE</b> .....	27
<b>VII-1 PURIFICATION</b> .....	27
<b>VII-1-1 <i>Lactobacillus plantarum</i></b> .....	27
<b>VII-1-1-1 Lonvaud [1975], Lonvaud <i>et al.</i> [1977]</b> .....	27
<b>VII-1-1-2 Caspritz et Radler [1983]</b> .....	27
<b>VII-1-2 <i>Lactobacillus murinus</i></b> .....	28
<b>Strasser de Saad <i>et al.</i> [1984]</b> .....	28
<b>VII-1-3 <i>Lactobacillus</i> sp.</b> .....	28
<b>Chagnaud [1989]</b> .....	28
<b>VII-1-4 <i>Leuconostoc mesenteroides</i></b> .....	28
<b>VII-1-4-1 Lonvaud-Funel et Strasser de Saad [1982]</b> .....	28
<b>VII-1-4-2 Lonvaud-Funel [1986]</b> .....	29
<b>VII-1-4-3 Radler et Battermann [résultats cités par Radler 1986]</b> .....	29
<b>VII-1-5 <i>Leuconostoc œnos</i></b> .....	29
<b>VII-1-5-1 Spettoli <i>et al.</i> [1982 a b ]</b> .....	29
<b>VII-1-5-2 Mc Cord et Ryu [1985]</b> .....	30
<b>VII-1-5-3 Lonvaud-Funel [1986]</b> .....	30
<b>VII-1-5-4 Naouri <i>et al.</i> [1990 a]</b> .....	30
<b>VII-1-6 Étude comparative de Battermann et Radler [1991]</b> .....	31
<b>VII-2 STœCHIOMÉTRIE DE LA RÉACTION MALOLACTIQUE</b> .....	31
<b>VII-3 CONCLUSION SUR LA PURIFICATION</b> .....	34
<b>VIII-PROPRIÉTÉS CINÉTIQUES DE L'ENZYME MALOLACTIQUE</b> .....	35
<b>VIII-1 ETUDE CINÉTIQUE</b> .....	35
<b>VIII-1-1 Affinité de l'enzyme malolactique pour les différents substrats</b> ....	35
<b>VIII-1-2 Remplacement de Mn<sup>++</sup> par d'autres ions divalents</b> .....	36
<b>VIII-2 INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE</b> .....	36
<b>VIII-3 INFLUENCE DU PH</b> .....	37
<b>VIII-3-1 Comportement vis-à-vis de l'acide malique</b> .....	37
<b>VIII-3-2 Comportement vis-à-vis du NAD</b> .....	38
<b>VIII-4 INFLUENCE DES INHIBITEURS</b> .....	38
<b>VIII-5 ACTION DE QUELQUES EFFECTEURS ENZYMATIQUES</b> .....	39

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

<b>I-PRODUCTION BACTÉRIENNE</b> .....	41
I-1 MICROORGANISME.....	41
I-1-1 Description de <i>Leuconostoc oenos</i> .....	41
I-1-2 Identification.....	41
I-2 MILIEUX DE CULTURE DES BACTÉRIES.....	42
I-2-1 Milieu d'isolement.....	42
I-2-2 Milieux d'identification.....	42
I-2-3 Milieux de culture.....	42
I-3 TECHNIQUES DE CULTURE .....	44
I-3-1 Conservation de la souche .....	44
I-3-2 Préculture .....	44
I-3-3 Culture .....	44
I-4 DÉNOMBREMENT DES BACTÉRIES .....	45
 <b>II-EXTRACTION ET PURIFICATION DE L'ENZYME MALOLACTIQUE</b> .....	 46
II-1 PROTOCOLE GÉNÉRAL.....	46
II-2 RÉCUPÉRATION DES CELLULES .....	46
II-3 EXTRACTION DE L'ENZYME MALOLACTIQUE .....	48
II-4 PURIFICATION DE L'ENZYME MALOLACTIQUE.....	48
II-4-1 Élimination des principaux contaminants .....	48
II-4-2 Techniques chromatographiques.....	48
II-4-2-1 Appareillage .....	48
II-4-2-2 Caractéristiques des colonnes .....	49
II-4-2-3 Chromatographie de filtration sur gel.....	49
II-4-2-3-1 Principe .....	49
II-4-2-3-2 Caractéristiques des gels.....	49
II-4-2-3-3 Conditions opératoires .....	50
II-4-2-4 Chromatographie d'affinité.....	50
II-4-2-4-1 Principe .....	50
II-4-2-4-2 Caractéristiques des gels.....	50
II-4-2-4-3 Conditions opératoires .....	50
II-4-2-5 Chromatographie d'échange d'ions.....	50
II-4-2-5-1 Principe .....	51



II-4-2-5-2 Caractéristiques des gels.....	51
II-4-2-5-3 Conditions opératoires.....	51
II-4-3 Concentration et dialyse des extraits .....	51
II-4-4 Techniques électrophorétiques.....	52
II-4-4-1 Appareillage.....	52
II-4-4-2 Conditions d'électrophorèse .....	52
II-4-4-3 Colorations.....	52
II-4-5 Électrofocalisation.....	54
II-4-5-1 Appareillage.....	54
II-4-5-2 Principe.....	54
II-4-5-3 Conditions d'électrofocalisation .....	54
<b>III-MESURE DES ACTIVITÉS ENZYMATIQUES .....</b>	<b>56</b>
III-1 ACTIVITÉ MALOLACTIQUE.....	56
III-1-1 Principe.....	56
III-1-2 Appareillage.....	57
III-1-3 Mode opératoire .....	58
III-1-4 Calcul.....	59
III-2 ACTIVITÉ LACTATE-DÉSHYDROGÉNASE.....	60
III-2-1 Activité lactate-déshydrogénase (LDH) totale.....	60
III-2-2 Activité L-lactate-déshydrogénase.....	60
III-2-3 Activité D-lactate-déshydrogénase.....	60
III-3 ACTIVITÉ ENZYME "MALIQUE" .....	61
<b>IV-DOSAGE DES DIFFÉRENTS CONSTITUANTS.....</b>	<b>62</b>
IV-1 DOSAGE DES PROTÉINES.....	62
IV-2 DOSAGE DE L'ACIDE L-MALIQUE .....	62
IV-3 DOSAGE DE L'ACIDE LACTIQUE.....	62
IV-4 DOSAGE DES SUCRES RÉDUCTEURS .....	63
IV-5 DOSAGE DU GLUCOSE.....	64
IV-6 DOSAGE DE L'ÉTHANOL.....	64
<b>V-EXPÉRIMENTATIONS SUR LES VINS .....</b>	<b>65</b>
V-1 LEVURE.....	65
V-2 VINS.....	65

<b>VI-RÉACTEUR À ENZYME MALOLACTIQUE.....</b>	<b>66</b>
VI-1 TECHNIQUES DE FIXATION DE L'ENZYME ET DU COENZYME .....	66
VI-1-1 Technique de fixation covalente de l'enzyme malolactique sur membrane plane et fibres creuses de polyamide.....	66
VI-1-2 Technique de fixation covalente de l'enzyme malolactique et du NAD sur membrane plane et fibres creuses de polyamide .....	66
VI-2 RÉACTEUR.....	67
VI-3 APPAREILLAGE .....	68
VI-3-1 Utilisation du circuit interne du réacteur.....	68
VI-3-2 Utilisation du circuit interne et du circuit externe du réacteur.....	68
VI-3-3 Contrôle du pH dans les deux circuits du réacteur.....	68

## **RÉSULTATS - PREMIERE PARTIE PRODUCTION D'ENZYME MALOLACTIQUE**

<b>CHAPITRE I - PRODUCTION BACTÉRIENNE .....</b>	<b>71</b>
I-1 IDENTIFICATION DE <i>LEUCONOSTOC ÆNOS</i> .....	71
I-2 CHOIX D'UN MILIEU ET D'UN PROTOCOLE DE CULTURE .....	73
I-2-1 Milieu de culture .....	73
I-2-2 Caractéristiques de la préculture.....	74
I-2-3 Évolution de l'activité malolactique des cellules et de la composition du milieu de culture au cours du cycle de croissance.....	76
<b>CHAPITRE II - EXTRACTION DE L'ENZYME MALOLACTIQUE.....</b>	<b>79</b>
II-1 PASSAGES SUCCESSIFS AUX ULTRASONS.....	79
II-2 ACTION DU LYSOZYME .....	80
II-3 CONGÉLATION DU CULOT BACTÉRIEN.....	80
<b>CHAPITRE III - PURIFICATION DE L'ENZYME MALOLACTIQUE .</b>	<b>83</b>
III-1 ÉLIMINATION DES ACIDES NUCLÉIQUES ET PRÉCIPITATIONS AU SULFATE D'AMMONIUM .....	83
III-1-1 Élimination des acides nucléiques.....	83
III-1-2 Précipitations au sulfate d'ammonium.....	84
III-2 CHROMATOGRAPHIE DE FILTRATION SUR GEL .....	84
III-2-1 Ultrogel AcA 34.....	84
III-2-1-1 Séparation.....	84

III-2-1-2 Détermination de la masse moléculaire relative .....	87
III-2-2 Fractogel TSK HW-55 (F).....	88
III-3 CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITÉ.....	88
III-4 CHROMATOGRAPHIE D'ÉCHANGE D'IONS.....	89
III-5 ÉLECTROFOCALISATION PRÉPARATIVE .....	90
<b>CHAPITRE IV - ACTIVITÉ DE L'ENZYME MALOLACTIQUE .....</b>	<b>93</b>
IV-1 MILIEU DE MESURE DE L'ACTIVITÉ MALOLACTIQUE .....	93
IV-2 CONSERVATION DE L'ACTIVITÉ MALOLACTIQUE AU COURS DU TEMPS .....	93
IV-2-1 Conservation en fonction de la température et de l'étape de purification .....	93
IV-2-2 Conservation des extraits chromatographiés .....	94
IV-3 ÉTUDE CINÉTIQUE DE L'ENZYME MALOLACTIQUE.....	96
IV-3-1 Détermination des constantes cinétiques.....	96
IV-3-2 Étude de l'activité malolactique en fonction du pH.....	98
IV-4 IMPORTANCE DU NAD.....	98
IV-4-1 Activité malolactique en absence de NAD .....	98
IV-4-2 Remplacement du NAD.....	101
IV-4-3 Rôle du NAD .....	101
<b>CHAPITRE V - CONCLUSIONS À LA PRODUCTION D'ENZYME....</b>	<b>103</b>
V-1 PRODUCTION BACTÉRIENNE.....	103
V-2 EXTRACTION ET PURIFICATION DE L'ENZYME MALOLACTIQUE .....	103
V-3 ACTIVITÉ MALOLACTIQUE.....	104

## **RÉSULTATS - DEUXIEME PARTIE**

### **RÉACTEUR À ENZYME MALOLACTIQUE**

#### **CHAPITRE I**

<b>IMMOBILISATION DE L'ENZYME MALOLACTIQUE.....</b>	<b>105</b>
I-1 IMMOBILISATION SUR UNE SURFACE RÉDUITE.....	105
I-1-1 Immobilisation sur membrane Pall .....	105
I-1-2 Immobilisation sur fibres creuses de polyamide.....	105
I-2 IMMOBILISATION SUR ULTRAFILTRE U 2000 .....	106
I-2-1 Technique de prise d'échantillons .....	107
I-2-2 Milieu à pH 6.....	108

I-2-2-1 Avec NAD .....	108
I-2-2-2 Sans NAD .....	110
I-2-3 Milieu à pH 3,3.....	110
<b>CHAPITRE II</b>	
<b>IMMOBILISATION DE L'ENZYME MALOLACTIQUE ET DU NAD.....</b>	<b>113</b>
II-1 ESSAIS EN MILIEU SYNTHÉTIQUE .....	113
II-2 ESSAIS AVEC LE VIN .....	116
<b>CHAPITRE III - RÉACTEUR À ENZYME MALOLACTIQUE</b>	
<b>LIBRE ET À NAD IMMOBILISÉ.....</b>	<b>119</b>
<b>CHAPITRE IV - CONTRÔLE DU PH.....</b>	<b>123</b>
<b>CONCLUSION</b>	
1 Production et purification de l'enzyme malolactique .....	125
2 Importance du NAD.....	125
3 Réacteur et vinification.....	126
4 Autres domaines.....	127
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>129</b>
<b>ANNEXE .....</b>	<b>141</b>



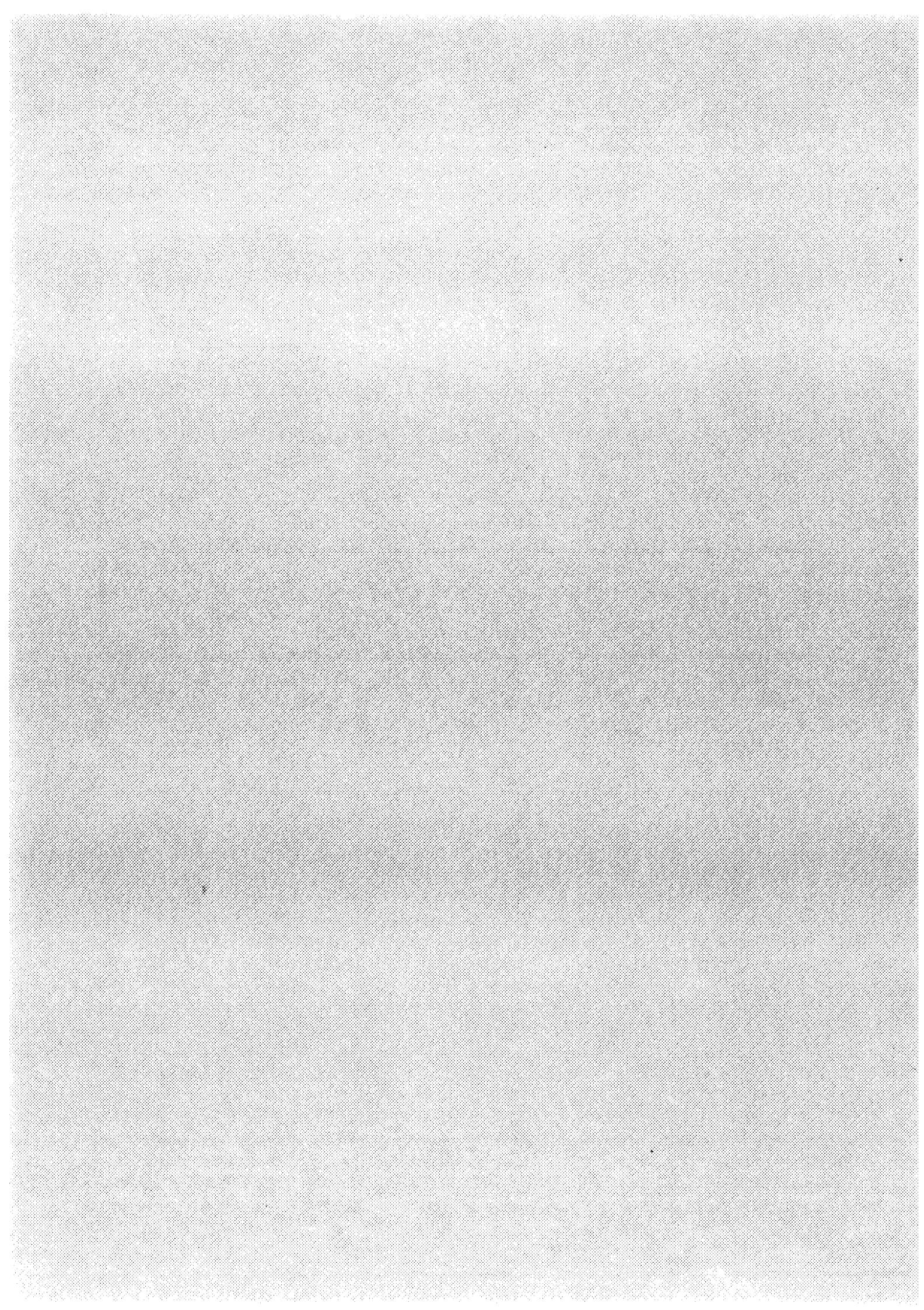
## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADH	alcool-déshydrogénase
ADN	acide désoxyribonucléique
ADP	adénosine diphosphate
AL-DH	aldéhyde-déshydrogénase
AMP	adénosine monophosphate
ARN	acide ribonucléique
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	adénosine triphosphate
C	milieu de Carr
cell. immobil.	cellules immobilisées
chr.	chromatographie
CM	carboxyméthyl
CMC	1-cyclohexyl-3-(2-morpholinoéthyl) carbodiimide métho-p-toluène sulfonate
CT	milieu de Carr au jus de tomate
d	débit
DEAE	diéthyl aminoéthyl
DNase	désoxyribonucléase
DTT	dithiotréitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	acide éthylène diamine tétraacétique
EML	enzyme malolactique
F-6-P	fructose-6-phosphate
FML	fermentation malolactique
G-6-P	glucose-6-phosphate
G6P-DH	glucose-6-phosphate-déshydrogénase
GB	milieu de Guilloux-Benatier
GOT	glutamate-oxaloacétate-transaminase
GPT	glutamate-pyruvate-transaminase
GY	glucose yeast extract media
HK	hexokinase
IEF	isoelectric focusing
<i>L. brevis</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>
<i>L. fructivorans</i>	<i>Lactobacillus fructivorans</i>
<i>L. mesenteroides</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>L. murinus</i>	<i>Lactobacillus murinus</i>

<i>L. ænos</i>	<i>Leuconostoc ænos</i>
<i>L. plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
LDH	lactate-déshydrogénase
MA	milieu acide
MB	milieu de base
MDH	malate-déshydrogénase
ML	milieu pour <i>L. ænos</i>
MRS	Man Rogosa Sharpe
NAD <sup>+</sup>	nicotinamide adénine dinucléotide (forme oxydée)
NADH+H <sup>+</sup>	nicotinamide adénine dinucléotide (forme réduite)
NADP <sup>+</sup>	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (forme oxydée)
NADPH+H <sup>+</sup>	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (forme réduite)
<i>P. pentosaceus</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
PGI	phosphoglucose-isomérase
ph.	phosphate
PMNL	poids moléculaire nominal limite
ppm	part per million (1/10 <sup>6</sup> )
R	rendement
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Sch.</i>	<i>Schizosaccharomyces</i>
SDS	sodium dodécyl sulfate
sp.	espèce indéterminée
subsp.	sous espèce
Tc	taux de conversion
TEAE	triéthyl aminoéthyl
Temed	N,N,N',N' tétraméthyléthylènediamine
Tris	tris (hydroxyméthyl)-amino méthane
ts	temps de séjour

# INTRODUCTION

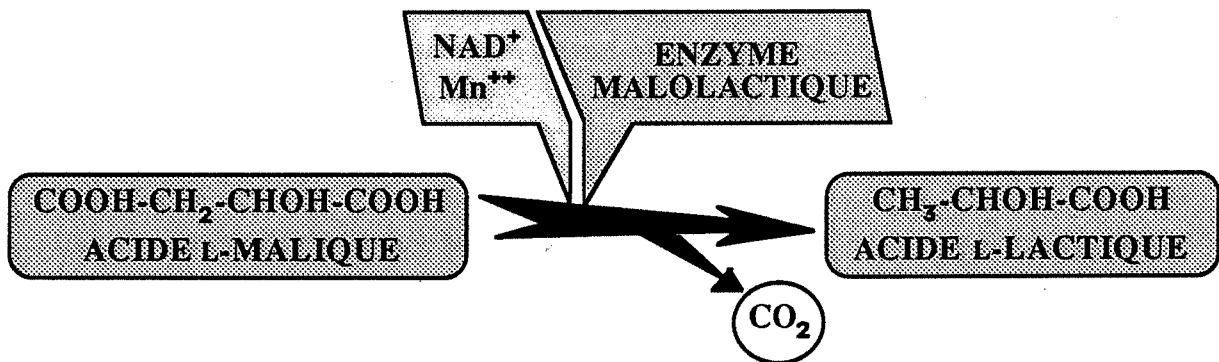




La fermentation malolactique (FML) est la deuxième fermentation du vin. Elle intervient après la fermentation alcoolique. C'est la décarboxylation de l'acide L-malique en acide L-lactique, en présence des cofacteurs NAD et manganèse.

Ce n'est pas une véritable fermentation, car il n'y a pas de production d'énergie.

La réaction est réalisée par l'enzyme malolactique qui est présente dans certaines bactéries lactiques du vin des genres *Leuconostoc*, *Lactobacillus* et *Pediococcus*.



La FML est une étape nécessaire à l'affinage de nombreux vins : elle améliore leurs qualités gustatives et la désacidification les rend plus souples. Cependant, mal contrôlée ou mal conduite, la FML peut dévier et provoquer l'altération des vins.

Elle est aussi nécessaire à la stabilisation biologique des vins. Elle survient de façon variable, soit immédiatement après la fermentation alcoolique, soit plus tard, au printemps suivant, soit même les années suivantes. Or il faut que la FML soit achevée avant la mise en bouteilles.

C'est pourquoi la FML doit être réalisée le plus rapidement possible après la fermentation alcoolique, et dans les meilleures conditions.

Le vin, par son pH acide ( $\text{pH} = 3$ ) et la présence de nombreux inhibiteurs (acides dicarboxyliques, alcool, anhydride sulfureux...) est un milieu défavorable à la FML. Pour le moment, le vinificateur qui recherche la FML a peu de moyens à sa disposition.

Il essaie de contrôler la température qui doit être d'environ 20°C. Il peut modérer le sulfitage de la vendange, ce qui favorise la croissance bactérienne.

Il peut provoquer une désacidification chimique avec des produits à base de tartrate et carbonate de calcium.

Il trouve dans le commerce des levains de bactéries lactiques, mais leur ensemencement reste une pratique délicate.

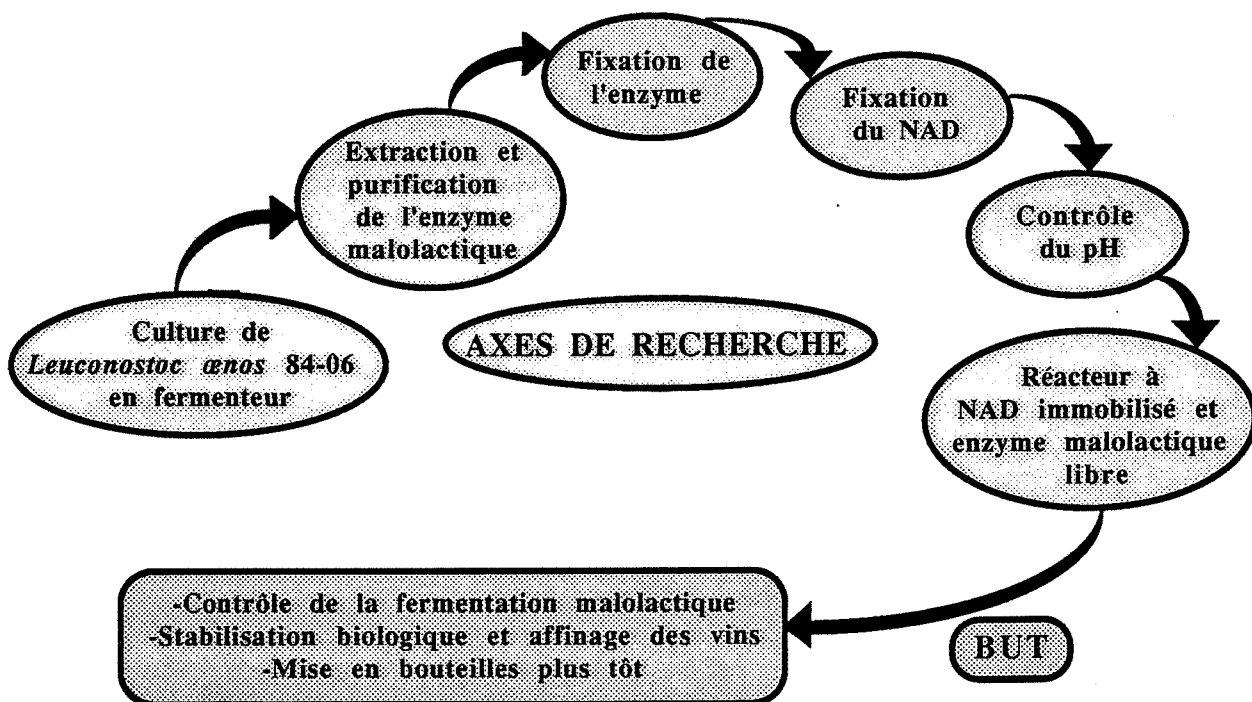
Malgré tout, le déclenchement de la fermentation malolactique est toujours aléatoire.

C'est pour cela que depuis quelques années, de nombreuses études ont été entreprises pour la favoriser. Les recherches dans ce but se sont étendues à de nombreux domaines tels que la sélection et la stimulation des souches de bactéries, la réactivation de bactéries congelées ou lyophilisées, le génie génétique, l'étude de réacteurs à bactéries immobilisées.

Jusqu'à maintenant, la réalisation de réacteurs à enzyme malolactique immobilisée semblait difficilement envisageable.

La région Rhône-Alpes ainsi que la fondation Rhône-Alpes-Futur ont souhaité lever le "verrou" technologique que représente cette transformation et nous ont demandé d'étudier plus précisément l'enzyme responsable de la fermentation malolactique, ainsi que son utilisation pour la fabrication d'un réacteur à enzyme immobilisée.

Voici les principales voies de recherche mises en œuvre dans ce but :



---

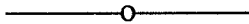
- L'enzyme malolactique n'existe pas dans le commerce. C'est pourquoi nous avons dû l'extraire de microorganismes. Nous avons choisi une bactérie particulièrement performante pour la fermentation malolactique, *Leuconostoc oenos* 84-06. Elle sera cultivée en fermenteur sur un milieu induisant la fabrication de l'enzyme malolactique.

- Une technique d'extraction et de purification de l'enzyme sera mise au point de façon à obtenir rapidement une protéine relativement pure et stable, utilisée pour la fabrication du réacteur.

- Nous étudierons l'immobilisation de l'enzyme malolactique de façon à retenir l'enzyme à l'intérieur du réacteur.

- Les cofacteurs, c'est-à-dire : le NAD et le manganèse, sont nécessaires à la réaction. Le manganèse se trouve en quantité suffisante dans le vin en fermentation, mais le NAD est absent. Nous envisagerons la fixation du NAD dans le réacteur.

- L'enzyme malolactique est inactive au pH du vin. Nous adapterons notre réacteur aux conditions particulières de pH nécessaires pour que l'activité malolactique s'exprime.





# BIBLIOGRAPHIE

### *Le vin*

*Longtemps, dans l'atmosphère humide des caveaux,  
Sous la voûte profonde et de nitre imprégnée!  
Sous la poussière et sous les toiles d'araignée,  
Le jeune vin vieillit dans des flacons nouveaux.*

*Il faut que dans le calme et l'ombre des tombeaux  
La sublime liqueur dure plus d'une année,  
Avant que d'accomplir la noble destinée  
D'exalter un instant nos cœurs et nos cerveaux,*

*Ainsi, Chaze, il en est de la pensée humaine ;  
C'est par un très secret et très lent phénomène  
Qu'elle se plie enfin au rythme harmonieux,*

*Un doux sonnet mûrit comme un bordeaux suave  
Et tu fais bien, ami, qui né dans une cave,  
De lire des beaux vers en buvant tes vins vieux,*

*François Coppée (Écrit vers 1870, Poésies diverses)*

## I-HISTORIQUE

Dès le XVII<sup>e</sup> siècle, des textes décrivent l'amélioration de vins par une baisse possible de l'acidité totale, après une période de "travail" au printemps, correspondant à la floraison de la vigne. En 1858, Pasteur reconnaît la nature microbienne des fermentations lactiques lors de ses travaux sur la fermentation alcoolique. En 1866, il pense que l'intervention des bactéries lactiques est nuisible à la qualité du vin, et entraîne des maladies. Muller-Thurgau [1891] attribue la diminution de l'acidité du vin à la présence de bactéries lactiques. Koch [1900] isole et observe les premières bactéries lactiques. Il induit la fermentation malolactique en inoculant ces microorganismes. Il reconnaît aussi que la baisse d'acidité correspond globalement à la baisse de l'acide malique. En 1901, Möslinger et Seifert présentent chacun de leur côté le bilan de la réaction :

acide malique = acide lactique + gaz carbonique

Cette réaction correspond à la fermentation malolactique (FML). Muller-Thurgau *et al.* [1913] considèrent que la présence des bactéries lactiques, entraînant une baisse de l'acidité, peut être bénéfique aux qualités organoleptiques du vin. Ils établissent la première classification des bactéries isolées du vin ou d'autres boissons fermentées.

Peu à peu le phénomène est décrit dans les différentes régions viticoles de France : en Anjou [Moreau, 1906], dans le midi de la France [Mestrezat, 1908 ; Astruc, 1925], en Bordelais, en Alsace [Rosensthiel, 1908] et en Bourgogne [Ferré, 1922].

De 1937 à 1946, Ribéreau-Gayon et Peynaud effectuent un travail important dans les crus du Bordelais.

En 1952 la chromatographie sur papier permet de suivre de façon simple la disparition de l'acide malique [Marsh *et al.*, 1952].

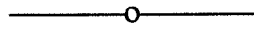
Des rapports arrivent des régions viticoles du monde entier et montrent l'universalité du phénomène et son intérêt dans l'élaboration de nombreux vins rouges et de certains vins blancs : Australie [Fornachon, 1957], Allemagne [Radler, 1958], Californie [Ingraham *et al.*, 1960], Japon [Yoshizumi, 1963], Uruguay [Poittevin, *et al.* 1963], Afrique du Sud [Du Plessis, *et al.* 1963].

L'implication des bactéries lactiques dans la vinification a été le sujet d'un nombre considérable de travaux qui ont été rassemblés dans les revues de Vaughn [1955], Kunkee [1967], Beelman et Gallander [1979], Wibowo *et al.* [1985] et Davis *et al.* [1985].



Au départ, la décarboxylation de l'acide malique a été considérée comme le résultat de l'action de l'enzyme malique et de la lactate-déshydrogénase [Korkes *et al.*, 1948, 1950 ; Kaufmann *et al.*, 1951].

Peynaud [1968] étudie des formes optiques de l'acide lactique présentes dans le vin et dans les cultures bactériennes et montre que l'acide malique est toujours transformé en acide L-lactique. Il conclut que la décarboxylation de l'acide malique est directe et ne nécessite pas le concours des lactate-déshydrogénases. Ceci est démontré en 1973 par Schütz et Radler qui séparent l'enzyme malolactique de *Lactobacillus plantarum* de la lactate-déshydrogénase.



## II-TAXONOMIE

Les bactéries lactiques rencontrées dans le vin appartiennent principalement à trois genres : *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Lactobacillus*. Ce sont des bactéries à Gram positif, anaérobies facultatives ou microaérophiles, non mobiles et ne sporulant pas. Elles sont capables de dégrader l'acide malique en acide lactique et gaz carbonique. Elles peuvent être homofermentaires ou hétérofermentaires.

Les souches homofermentaires produisent uniquement de l'acide lactique à partir des hexoses (glucose, fructose...).

Les souches hétérofermentaires produisent en plus de l'acide lactique, de l'alcool, du gaz carbonique, de l'acide acétique et d'autres produits secondaires.

Les souches homofermentaires obligatoires et hétérofermentaires facultatives fermentent les hexoses de façon homofermentaire, mais peuvent également fermenter les pentoses de façon hétérofermentaire dans certaines conditions de limitation en hexoses, en présence de pentoses agissant comme inducteurs [Kandler et Weiss, 1986].

Les principales souches de bactéries lactiques rencontrées dans les vins en fermentation sont les suivantes :

Famille	Genre espèce	Type fermentaire	Forme
<i>Streptococcaceae</i>	<i>Leuconostoc oenos</i>	hétérofermentaire	coque
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>		
	<i>Pediococcus damnosus (cerevisiae)</i>	homofermentaire	
	<i>Pediococcus pentosaceus</i>		
<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus fructivorans</i>	hétérofermentaire obligatoire	bacille
	<i>Lactobacillus hilgardii</i>		
	<i>Lactobacillus brevis</i>		
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	homofermentaire obligatoire hétérofermentaire facultatif	
	<i>Lactobacillus casei</i>		
	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>		

**Tableau 1** : Principales bactéries lactiques isolées dans des vins en fermentation.

Ces bactéries sont présentes à la surface des grappes et des feuilles et se retrouvent dans le jus de raisin en fermentation. Les différentes espèces ne se multiplient pas pendant la fermentation alcoolique, une sélection s'opère en fonction de la résistance des souches à l'alcool et au pH. En général, seul *Leuconostoc oenos* résiste et est capable de se développer après cette première fermentation. Dans la majorité des cas, la FML est donc réalisée par

*L. ænos*. Dans les vins moins acides, *Pediococcus cerevisiae* et *P. pentosaceus* peuvent conduire cette transformation.

En fin de FML, à un pH supérieur à 3,5, le vin peut être altéré par la croissance de *Pediococcus* et de *Lactobacillus*. Dans ces cas-là, la population de *L. ænos* diminue rapidement ce qui suggère des relations antagonistes entre *L. ænos* et les espèces contaminantes [Wibowo *et al.*, 1985 ; Manca de Nadra *et al.*, 1987].

Les taxonomistes ont traditionnellement séparé les trois genres *Lactobacillus*, *Pediococcus* et *Leuconostoc* de par leurs différences morphologiques. Cependant, phylogénétiquement, les membres de ces genres peuvent être en relation. La classification est en pleine évolution.

Le genre *Leuconostoc* est divisé en quatre espèces : *Leuconostoc mesenteroides* (*L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum*, *L. mesenteroides* subsp. *cremonis*), *Leuconostoc paramesenteroides*, *Leuconostoc lactis* et *Leuconostoc ænos* [Garvie, 1986].

Dans une étude des caractères phénotypiques des espèces de *Leuconostoc*, Milliere *et al.* [1989] divisent le genre en trois groupes, dont l'un formé de *L. ænos* uniquement, mais concluent que, pour obtenir une identification complète, des études génétiques utilisant des hybridations ADN/ADN doivent être réalisées. Yang *et al.* [1989] et Martinez-Murcia *et al.* [1990] proposent une analyse comparative des séquences des ARNr 16 S pour différencier la branche des *Leuconostoc* des autres branches de *Lactobacillus* et les *Leuconostoc* entre eux. Ces travaux montrent que *L. ænos* est une espèce phylogénétiquement distincte des autres *Leuconostoc*.

L'espèce *L. ænos* ne semble pas homogène et pourrait être divisée en deux sous-espèces sur la base des réactions de fermentation des pentoses ; Garvie [1967, 1974] et Tracey *et al.* [1987] concluent que des recherches sont nécessaires pour séparer les souches de cette espèce.

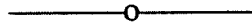
En 1990, Dicks *et al.* étudient les relations génotypiques entre différentes souches de *Leuconostoc* en réalisant une analyse numérique des protéines solubles totales, une analyse de la composition en base des ADN et des tests d'hybridations ADN-ADN. Leurs résultats indiquent que *L. ænos* est sur le plan génomique homogène et la division en différentes espèces n'est pas justifiée.

Dans la pratique, l'identification des bactéries lactiques du vin est réalisée à l'aide de tests d'assimilation de différents substrats, par la nature stéréochimique de l'acide lactique formé à partir du glucose, la comparaison de certaines enzymes et la mesure du pourcentage d'homologie entre les ADN. Les tests biochimiques sont simplifiés par l'utilisation de galeries API-System, mais les résultats obtenus sont parfois ambigus. A la suite de ces

---

observations, Lonvaud-Funel *et al.* [1989] ont mis au point une technique d'identification spécifique, fiable et rapide de *L. ænos* à l'aide de sondes d'ADN. Les auteurs veulent étendre cette méthode à la détection des souches contaminantes du vin.

Ces différents travaux montrent une certaine diversité et une complexité au sein des souches de bactéries lactiques liées sans doute à la faculté qu'ont ces bactéries à s'adapter aux conditions environnantes.



### III-FACTEURS INTERVENANT SUR LA CROISSANCE ET L'ACTIVITÉ MALOLACTIQUE DES BACTÉRIES LACTIQUES DANS LE VIN

De nombreux paramètres influencent la croissance et l'activité des bactéries lactiques au cours de la vinification [Wibowo *et al.*, 1985, 1988 ; Davis *et al.*, 1986, 1988 ; Lonvaud-Funel, 1986].

#### III-1 PH

Le pH du vin intervient à plusieurs niveaux :

- La croissance des bactéries lactiques est impossible en dessous de pH 3. A partir de pH 3 et à mesure que le pH augmente, le taux de croissance bactérienne diminue, en conséquence, l'activité métabolique des bactéries augmente.

- Le pH est un facteur de sélection des espèces se développant dans le vin. Entre les pH 3 et 3,5, seuls les *Leuconostoc* résistent, en particulier *L. ænos*. La présence des espèces de *Pediococcus* et de *Lactobacillus* augmente lorsque le pH dépasse 3,5 et avoisine 4. Ces espèces peuvent alors aussi bien conduire la FML, que se développer et altérer le vin en fin de fermentation.

- Le pH influence l'activité métabolique des bactéries lactiques. La dégradation de l'acide malique et la production de diacétyl sont favorisées par des pH inférieurs à 3,5, alors que la dégradation de l'acide tartrique et le métabolisme des sucres entraînant une augmentation de l'acidité volatile apparaissent à des pH supérieurs à 3,5.

#### III-2 ALCOOL

L'alcool est connu depuis longtemps pour ses qualités antiseptiques et sa présence dans le vin a un effet inhibiteur sur les bactéries lactiques. La sensibilité à l'alcool varie selon les souches, les *Lactobacillus* étant plus résistants que les *Leuconostoc*. Les espèces de bactéries lactiques ne survivent pas au delà de 15% d'éthanol. L'activité malolactique diminue rapidement au-dessus de 10% d'éthanol.

La résistance à l'alcool de certaines bactéries lactiques serait due à une différence de constitution lipidique de leurs membranes [Desens *et al.*, 1988].

#### III-3 TEMPÉRATURE

La température optimale de croissance des différentes espèces de bactéries lactiques varie de 20 à 36°C pour les *Leuconostoc*, de 25 à 32°C pour les *Pediococcus* et de 28 à 40°C pour les *Lactobacillus*. La température optimale d'activité malolactique des bactéries est environ 37°C.

A la température des chais, entre 10 et 17°C, la croissance et l'activité des bactéries lactiques sont ralenties.

### III-4 OXYGENE ET DIOXYDE DE CARBONE

De nombreux avis contradictoires ont été donnés en ce qui concerne les effets stimulants ou inhibiteurs de l'oxygène ou du gaz carbonique. Selon Kelly *et al.* [1989] la présence d'oxygène semble inhiber *L. ænos*. Son développement est aussi important en anaérobiose avec une atmosphère saturée en gaz carbonique ou en azote. Le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) ne semble donc pas stimuler la croissance de *L. ænos*.

### III-5 SULFITAGE

L'anhydride sulfureux (SO<sub>2</sub>) est utilisé depuis longtemps en vinification d'une part comme antioxydant et d'autre part pour contrôler le développement des levures et des bactéries. La croissance des bactéries lactiques est compromise à des concentrations supérieures à 60 mg/l en SO<sub>2</sub>. L'activité malolactique ne se produit plus à 100 mg/l.

Ces valeurs varient énormément en fonction des souches.

Les effets de chaque facteur : pH, température, présence d'alcool et de SO<sub>2</sub> sont interdépendants. La probabilité d'obtenir une FML complète décroît lorsque le pH descend vers 3, la concentration en éthanol dépasse 15%, la concentration en SO<sub>2</sub> total dépasse 50 mg/l et la température descend au-dessous de 15°C.

### III-6 PROCÉDÉ DE VINIFICATION

Des pratiques particulières de vinification peuvent affecter la croissance et l'activité des bactéries lactiques. Certaines techniques de clarification éliminent la flore malolactique indigène. Le contact prolongé du moût avec les parties solides du raisin stimule l'activité malolactique. La thermovinification utilisée pour extraire les colorants, ainsi que l'addition d'agents protecteurs, semblent défavoriser la FML.

### III-7 RELATIONS ENTRE LES BACTÉRIES LACTIQUES ET LES AUTRES MICROORGANISMES

Le vin en fermentation renferme différents types de microorganismes qui se trouvent en relations synergiques ou antagonistes.

La croissance des bactéries lactiques est ralentie pendant la fermentation alcoolique par la croissance des levures qui utilisent les principaux éléments énergétiques et qui produisent des substances inhibitrices, en particulier l'alcool. Les acides gras issus du métabolisme levurien : acides hexanoïques, octanoïques et décanoïques ont des propriétés particulièrement toxiques pour les bactéries lorsqu'ils sont combinés entre eux [Lonvaud-Funel *et al.*,

1988a]. Les effets peuvent être plus ou moins importants selon la souche de levure utilisée. D'autre part, pendant la fermentation alcoolique et au cours de leur autolyse, les levures libèrent dans le vin des vitamines, des acides aminés et des peptides qui favorisent la croissance des bactéries lactiques et stimulent la FML. Les acides aminés et les extraits levuriens annulent l'effet toxique des acides gras. Les bactéries lactiques accélèreraient la lyse des levures en fin de fermentation alcoolique [Lonvaud-Funel *et al.*, 1988b, Edwards *et al.*, 1989].

L'infection des raisins par *Botritis cinerea* ou par des bactéries acétiques semble stimuler la croissance des bactéries lactiques.

Les bactéries lactiques peuvent entrer en compétition entre elles. En présence d'espèces de *Pediococcus*, *L. œnos* est rapidement éliminé.

Enfin certains *L. œnos* peuvent être infectés par des bactériophages, ce qui provoque des arrêts de FML par lyse bactérienne. Le risque d'altération du vin par la croissance de *Lactobacillus* ou de *Pediococcus* résistants est alors important. Il est préconisé d'inoculer des cultures mixtes de sensibilités différentes aux bactériophages.

## IV-LES EFFETS DE LA FERMENTATION MALOLACTIQUE

Selon la région viticole, le cépage, le vin que l'on veut obtenir, la FML peut être ou non recherchée. La FML est bénéfique parce qu'elle réduit l'acidité, elle apporte une meilleure stabilité biologique et elle améliore les qualités organoleptiques du vin, mais elle peut être parfois défavorable [Davis *et al.*, 1985].

### IV-1 DÉSACIDIFICATION

La réduction de l'acidité est souhaitée dans les régions froides où les vins sont très acides. Le vin est alors assoupli.

Dans les régions plus chaudes les vins sont moins acides, la désacidification les rend fades et favorise la croissance de bactéries contaminantes.

L'élimination de l'acide malique n'est pas désirée dans certains vins blancs car elle s'accompagne de la perte de qualités telles que la fraîcheur et le fruité.

### IV-2 STABILISATION BIOLOGIQUE

Le vin qui a subi la FML est microbiologiquement plus stable. Si un vin est mis en bouteille avant d'avoir effectué la FML, la réaction peut se produire plus tard entraînant la formation de gaz et de dépôts indésirables.

Malgré tout, après la FML, il reste encore dans le vin des composés susceptibles d'être fermentés par des bactéries lactiques contaminantes. La stabilité biologique est alors assurée par l'ajout de SO<sub>2</sub> ou par filtration stérilisante.

### IV-3 MODIFICATION DE LA COMPOSITION DU VIN ET DES QUALITÉS ORGANOLEPTIQUES [Davis *et al.*, 1985, Lonvaud-Funel, 1986]

Pendant la FML, les bactéries lactiques qui se développent métabolisent d'autres constituants du vin que l'acide malique pour assurer leur croissance. Le fait que ces modifications chimiques entraînent des modifications de l'arôme a été très souvent controversé. Si les modifications chimiques ont été prouvées par analyse, la dégustation ne permet pas toujours de les mettre en évidence et une description plus précise des caractéristiques organoleptiques est nécessaire.

L'acide citrique est, après l'acide malique, le principal composé dégradé au cours de la FML. Son métabolisme produit de l'acide acétique, de l'acide lactique, du diacétyl et de l'acétoïne. Ces deux dernières substances interviennent dans la complexité du bouquet. Le diacétyl est apprécié à des concentrations de 1 à 4 mg/l, mais au-delà, il donne un goût de beurre rance. L'acétoïne ne doit pas dépasser la concentration de 150 mg/l.



Les concentrations de diacétyl et d'acétoïne évoluent au cours de la vinification. Ces deux composés sont produits par les levures puis par les bactéries lactiques durant la FML et diminuent ensuite pendant la conservation du vin.

L'acide tartrique peut être dégradé et donner la maladie de la tourne.

Les bactéries peuvent, dans certains cas, dégrader le glycérol issu du métabolisme du glucose, ce qui conduit à la maladie de l'amertume.

Les sucres des moûts de raisin (hexoses et pentoses) non fermentés par les levures sont utilisés comme substrats carbonés par les bactéries lactiques au cours de la FML. Leur métabolisme produit des acides L- et D-lactique, acétique, de l'éthanol, du glycérol et certains polyols tels que le mannitol. Ce métabolisme est limité, mais, dans certains accidents de vinification, les bactéries utilisent plus abondamment les sucres et produisent des quantités plus importantes d'acides acétique et lactique : c'est la piquêre lactique.

La présence d'histamine dans certains vins a été mise sur le compte des bactéries lactiques. La décarboxylation de l'histidine par l'histidine-décarboxylase conduit à la production d'histamine qui peut déclencher des réactions physiologiques de type allergique chez des personnes sensibles, suite à l'ingestion de vin riches en histamine. Or l'histidine-décarboxylase n'a pas été mise en évidence chez les bactéries lactiques du vin. Ough *et al.* [1987] ont montré que ces dernières ne sont pas impliquées dans ce métabolisme.

Le pH du vin semble jouer un rôle important à deux niveaux :

- il oriente le métabolisme des bactéries lactiques,
- il peut accroître la perception des substances aromatiques par les œnologues.



## V-AMÉLIORATION DE LA FERMENTATION MALOLACTIQUE

L'intérêt de réaliser la fermentation malolactique a poussé depuis longtemps les vinificateurs à rechercher tous les moyens la favorisant.

Les premiers moyens mis en œuvre ont été d'empêcher l'action des inhibiteurs, puis de favoriser et de stimuler la croissance de la flore malolactique naturelle. L'inoculation des vins par des souches commerciales de bactéries lactiques a permis d'avoir dans certains cas de bons résultats. Les voies de la recherche s'étendent maintenant à de nombreux domaines, tels que la fabrication de souches hyperproductrices d'enzyme malolactique par génie génétique, ou la mise au point de réacteurs à bactéries lactiques.

Davis *et al.* [1985], Lonvaud-Funel [1986] et Chagnaud [1989] ont décrit l'évolution des techniques et les différents problèmes rencontrés.

### V-1 LIMITATION DE L'ACTION DES INHIBITEURS

Il s'agit de tous les procédés qui ont pour but de favoriser la croissance et l'activité des bactéries lactiques présentes naturellement dans le vin en fermentation.

Le sulfitage de la vendange doit être modéré ( maximum 40 à 50 mg/l de SO<sub>2</sub> ) car l'anhydride sulfureux a un effet anti-bactérien.

La température des chais ou des cuves doit être maintenue entre 16 et 25°C.

Le choix des souches de levures réalisant la fermentation alcoolique est important car il peut favoriser ou non la multiplication des bactéries lactiques [Feuillat *et al.*, 1985 ; Wibowo *et al.*, 1985].

### V-2 TECHNIQUES DIVERSES

Une désacidification chimique peut être provoquée par des produits à base de tartrate et de carbonate de calcium [Geoller-Vlalatte, 1982].

La dégradation de l'acide malique a été réalisée par des *Schizosaccharomyces japonicus* et *octosporus* [Novella *et al.*, 1986] et *Sch. malidevorans* [Thornton *et al.*, 1986], *Sch. pombe* [Beelman *et al.*, 1979 ; Auriol *et al.*, 1987], mais l'acide malique est transformé en alcool plutôt qu'en acide lactique.

### V-3 UTILISATION DE LEVAINS MALOLACTIQUES

Depuis de nombreuses années, dans certaines régions, la technique du pied de cuve a été largement pratiquée. Les ferments malolactiques d'une cuve ayant réalisé la FML peuvent servir à ensemer une cuve n'ayant pas démarré. Ceux-ci peuvent également être

conservés au froid d'une année sur l'autre et utilisés pour inoculer les vins de la nouvelle année [Duteurtre, 1986]. Ce procédé a ses limites car les vins traités doivent être semblables.

Delfini [1988] s'est inspiré de cette pratique et travaille sur un prototype de fermenteur à deux zones. La zone de fond de cuve comporte des moûts en fermentation, riches en levures, dont le pH est moins bas que celui de la zone supérieure. Les bactéries lactiques s'y multiplient plus facilement et étendent leur activité métabolique à la masse du liquide supérieur. Cette technique conduit à des résultats prometteurs et la possibilité d'utiliser le fermenteur dans un système continu est à l'étude.

L'utilisation de levains malolactiques, ou "cultures starters", qui a pour but de déclencher la FML, s'est développée et de nombreuses souches de bactéries lactiques, pour la plupart des *L. œnos*, sont apparues sur le marché sous forme congelée ou lyophilisée. Cette dernière méthode est très répandue, mais présente des inconvénients : les bactéries doivent être réactivées avant d'êtreensemencées, leur viabilité diminue fortement lors de l'addition dans le vin et le coût est important (5 à 15 francs l'hectolitre de vin selon la souche utilisée). De nombreuses recherches tendent à améliorer ce procédé.

Dans les études sur les facteurs induisant la FML, Wibowo *et al.* [1988] montrent que différentes souches de *L. œnos* ne conduisent pas avec la même efficacité la dégradation de l'acide malique sur un même vin, et qu'une même souche n'a pas la même efficacité sur des vins différents. Ceci est dû à la composition du vin, en particulier au pH et aux teneurs en SO<sub>2</sub>, en éthanol et en composés phénoliques [Feuillat *et al.*, 1985]. De ce fait, il apparaît nécessaire qu'un large choix de *L. œnos* soit proposé sur le marché de façon à adapter cette méthode à la fabrication de vins de régions et de cépages différents.

De nombreux travaux ont montré le rôle essentiel joué par les composés azotés, en particulier les autolysats de levures qui peuvent activer soit la croissance bactérienne, soit la dégradation de l'acide malique par les bactéries lactiques. Des études sont en cours pour déterminer la structure des fractions oligopeptidiques responsables de ces activations [Feuillat *et al.*, 1985 ; Guilloux-Benatier *et al.*, 1985].

Plusieurs auteurs ont mis au point des protocoles et des milieux de réactivation pour les différentes souches commerciales de "cultures starters" [Davis *et al.*, 1985].

Lonvaud-Funel [1986] préconise l'addition d'enveloppes cellulaires de levures juste après la fermentation alcoolique pour stimuler plus efficacement les bactéries lactiques indigènes, et 24 heures avant l'inoculation de "cultures starters". Ces enveloppes agissent en absorbant des substances toxiques de la fermentation alcoolique et peuvent être utilisées par les bactéries comme éléments nutritifs.

L'ensemencement par des bactéries lactiques commerciales à 10<sup>9</sup> cellules/ml, réactivées avec un milieu au moût de raisin et autolysat de levures (0,5%), à pH 4,5 est

maintenant fiable [Lonvaud-Funel, 1986]. Reeves *et al.* [1987] remplacent le moût de raisin par du jus de pommes.

Prahl *et al.* [1988] induisent la FML en inoculant la vendange avec une préparation industrielle lyophilisée de *Lactobacillus plantarum*. La FML se déclenche rapidement et se termine pendant la première phase de la fermentation alcoolique. L'avantage de cette technique est sa facilité de mise en œuvre, elle est limitée par la sensibilité des bactéries au SO<sub>2</sub> libre.

Malgré tout, le déclenchement ainsi que le déroulement de la FML restent aléatoires dans de nombreux cas.

Récemment, Daeschel *et al.* [1991] ont isolé une souche de *L. ænos* résistante à la nisine. Ce polypeptide bactérien produit par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* est actif contre les bactéries à Gram positif et est utilisé dans l'industrie alimentaire pour empêcher la croissance de *Clostridium botulinum*. Les auteurs contrôlent spécifiquement la FML en introduisant de la nisine dans le vin, ce qui inhibe la flore malolactique naturelle, et en ensemençant le vin traité avec les souches sélectionnées résistantes à la nisine.

#### V-4 GÉNIE GÉNÉTIQUE

La génétique des bactéries lactiques a été largement étudiée pour les souches ayant un intérêt dans l'industrie laitière, telles que les *Lactobacillus* et les *Streptococcus*. Des travaux sur les souches intervenant en œnologie se développent dans deux voies ayant pour but d'augmenter l'activité malolactique initiale : soit par clonage et amplification du gène de l'enzyme malolactique, soit par sélection de mutants hyperproductifs.

Les premiers travaux dans ce domaine ont été de cloner le gène responsable de l'activité malolactique de *L. ænos* dans *Escherichia coli* [Lautensach *et al.*, 1984] et de *Lactobacillus delbrueckii* dans *E. coli* et dans des levures [Snow *et al.*, 1984 ; Williams *et al.*, 1984 ; Snow, 1985]. L'objectif final était de transférer l'information génétique nécessaire à la FML, d'une espèce de bactéries lactiques dans une levure du vin ; la levure issue du génie génétique réaliserait ainsi simultanément les fermentations alcoolique et malolactique. Mais dans les deux cas l'expression du gène malolactique dans la cellule hôte est très basse, et l'ADN cloné est très instable.

Une nouvelle approche du clonage des gènes peut être envisagée avec le développement de systèmes très efficaces tels que la transformation de protoplastes, l'électroporation [Aukrust *et al.*, 1988 ; David *et al.*, 1989 ; Badii *et al.*, 1989] chez des bactéries lactiques. Selon les auteurs, les problèmes d'instabilité décrits pour *E. coli* seraient résolus par cette méthode.

La construction d'un vecteur navette capable de s'exprimer chez *Lactobacillus* sp. 89 et *E. coli* a été réalisée par Chagnaud [1989] en vue du clonage du gène de l'enzyme malolactique de *Lactobacillus* sp.. La transformation s'effectue par électroporation. Cependant, l'instabilité et la diminution du taux de croissance de la souche transformée limitent cette voie d'amélioration des propriétés malolactiques de la souche.

L'activité malolactique est codée par un gène chromosomique chez les *Streptococcus* [Renault *et al.*, 1987], et chez *L. ænos* [Cavin *et al.*, 1989].

Lonvaud-Funel [1986] suggère l'étude des plasmides de *L. ænos* ; la nature des fonctions pour lesquelles ils codent pourrait être liée aux mécanismes de défense contre les divers inhibiteurs présents dans le vin.

Renault *et al.* [1989] ont isolé et séquencé le gène *mleR* nécessaire à l'induction et à l'expression de la FML chez *Lactococcus lactis*. Le produit de ce gène est homologue à une famille de régulateurs positifs.

Des méthodes de caractérisation de mutants hyperproducteurs ou déficients en activité malolactique ont été mises au point pour *L. ænos* [Lautensach *et al.*, 1987 ; Cavin *et al.*, 1989], pour *Streptococcus lactis* [Renault *et al.*, 1987] ou pour d'autres bactéries lactiques [Chagnaud, 1989 ; Chagnaud *et al.*, 1990 ; Daeschel *et al.*, 1987]. Des mutants déficients en activité malolactique ont été isolés. Ces mutants pourront servir, dans une seconde étape, de souches réceptrices pour le clonage du gène de l'enzyme malolactique par une complémentation directe [Renault *et al.*, 1987].

## V-5 RÉACTEURS À BACTÉRIES LACTIQUES OU À ENZYME MALOLACTIQUE

La phase de croissance des bactéries lactiques n'est pas nécessaire à la FML des vins. La masse de bactéries présente dans le vin agit comme une préparation enzymatique brute [Lafon-Lafourcade, 1970]. Ces observations ont montré la possibilité de réaliser la désacidification des vins en continu sur des supports contenant des bactéries ou des enzymes immobilisées.

### V-5-1 Réacteurs à bactéries lactiques

Les premiers essais furent entrepris par Divies et Siess [1976] qui étudièrent le catabolisme de l'acide malique en milieu synthétique par *Lactobacillus casei* emprisonné dans un gel de polyacrylamide, en réacteur agité. La constante de Michaelis (ou  $K_m$  représentant la concentration en substrat pour laquelle la vitesse de la réaction enzymatique est la moitié de la vitesse maximale) des cellules incluses ( $1,25 \cdot 10^{-2}$  M) augmente par rapport à celle des cellules libres ( $5 \cdot 10^{-3}$  M), car le substrat diffuse moins facilement à travers le support. Si le réacteur est alimenté en continu avec le milieu nutritif des bactéries, le  $K_m$  ( $6,25 \cdot 10^{-3}$  M) est proche du  $K_m$  des cellules libres. L'activité d'un tel réacteur peut être maintenue pendant une période de douze mois.

En 1980, Lee et Pack en Corée, immobilisent des cellules de *L. œnos* ML 34 dans du gel de polyacrylamide dont la taille des particules est de 1,5 mm d'épaisseur par 0,5 à 1,5 mm de diamètre. La transformation de l'acide malique d'un milieu synthétique est testée dans un réacteur agité. La température et le pH optimaux des cellules immobilisées augmentent par rapport à ce qui est obtenu pour les cellules libres. La vitesse maximale de la réaction de 10,53 mmol malate . h<sup>-1</sup> pour les cellules libres, passe à 4,63 pour les cellules immobilisées. Le K<sub>m</sub> est de 5,52 mM pour les cellules libres et de 4,65 mM pour les cellules immobilisées. La réduction de la vitesse de réaction des cellules immobilisées est due à la barrière physique constituée par le gel. Le traitement par les cellules immobilisées d'un vin contenant 50 ppm de SO<sub>2</sub> n'est pas efficace, par contre, le traitement du jus de raisin avant fermentation et addition de SO<sub>2</sub>, entraîne une diminution de 50% de l'acide malique en 12 heures.

En 1981, une équipe japonaise, Totsuka et Hara, met au point un réacteur à *Leuconostoc mesenteroides* immobilisés dans du gel d'agar ou dans du gel d'alginate de calcium, en "batch" ou en colonne à cinq sections. 90% de l'acide malique contenu dans du vin rouge est décarboxylé en continu pendant 60 jours, à un débit de 0,2 volume par heure (40 ml/h).

L'équipe de Spettoli à Padoue en Italie, est celle qui a le plus travaillé sur des réacteurs à bactéries lactiques immobilisées, appliqués à la FML des vins. Les premiers travaux en 1982 [a et b] sont effectués sur des *L. œnos* immobilisés dans des sphères d'alginate de calcium. Dans des solutions modèles, l'activité est maximale à pH 4 et à 15% d'éthanol. Elle reste constante pendant 9 heures, puis décroît graduellement et elle arrive à 60% du maximum après 36 jours. Pour un vin comportant 8,96 mg/l de SO<sub>2</sub>, l'acide malique a totalement disparu en trois jours et est converti pour 88,5% en acide lactique. Pour un vin renfermant 21 mg/l de SO<sub>2</sub>, 46% de l'acide malique disparaît en 16 heures et est transformé pour 83,5% en acide lactique. La réaction ne se produit pas lorsque le vin a 32 mg/l de SO<sub>2</sub>.

Au même moment, Gestrelus [1982] publie ses travaux sur un réacteur en colonne renfermant des *L. œnos* dans des sphères d'alginate de calcium. Il obtient 100% de disparition de l'acide malique pour un temps de séjour de deux heures. La demi-vie du réacteur est de 40 jours si le vin fourni comporte suffisamment d'acide malique. Les qualités organoleptiques du vin obtenu sont bonnes.

En 1984, Rossi et Clementi testent l'activité de *L. œnos* immobilisé dans un gel de polyacrylamide. La concentration optimale des cellules dans le gel est de 13% (poids humide par volume). Le pH optimum d'activité est de 5,25 pour les cellules libres ou immobilisées.

L'optimum de température se situe entre 40°C et 50°C pour les cellules immobilisées, et entre 45°C et 55°C pour les cellules libres. En milieu synthétique à pH 5,5, le taux de conversion de l'acide malique par les cellules immobilisées est de 71% en dix minutes ; il est de 76% en une heure pour du moût à pH 3,3.

Cuenat et Villetaz [1984] expérimentent un réacteur constitué d'une colonne garnie de sphères d'alginate de calcium renfermant des *L. œnos*. Ce réacteur permet la désacidification en continu de 105 litres de Chasselas en 17,5 heures, et de 25 litres de Marsanne en 5,5 heures, mais fonctionne moins bien avec un Gamay plus acide. Les qualités organoleptiques sont bonnes, mais l'activité malolactique diminue après quelques heures de travail.

Aux États-Unis, Mc Cord et Ryu [1985] utilisent du  $\kappa$ -carragheenan comme support d'immobilisation de *L. œnos* PSU-1. Lorsque du milieu synthétique est fourni aux cellules immobilisées, l'activité spécifique est de 10 mmol malate  $\cdot$  h<sup>-1</sup>  $\cdot$  g<sup>-1</sup> cellules sèches avec un K<sub>m</sub> de 5,4 mM. Ces résultats sont comparés avec ceux obtenus pour les cellules libres qui ont une activité spécifique de 18 mmol malate  $\cdot$  h<sup>-1</sup>  $\cdot$  g<sup>-1</sup> cellules sèches et un K<sub>m</sub> de 2 mM. Ils expliquent cette baisse d'activité par la perte de cellules lors de l'immobilisation.

En 1984, l'équipe de Spettoli étudie la formation de produits secondaires dans des vins ayant réalisé la FML en réacteur à bactéries immobilisées et montrent qu'un tel traitement ne semble pas altérer la qualité du vin.

Suite à la baisse d'activité observée avec du gel d'alginate de calcium et au fait qu'à des concentrations modérées en phosphate (de 50 à 900 mg/l dans le vin) ce gel se désintègre, Spettoli *et al.* [1987] ont utilisé eux aussi du  $\kappa$ -carragheenan auquel ils ajoutent 10% de silice. La demi-vie est de 2 jours sans silice et 4 jours avec silice. Le rendement de la réaction malolactique est de 89%. La silice n'affecte pas la formation des produits secondaires. Avec *Lactobacillus* sp. 48, la demi-vie est de 8 jours et le rendement de 98%. D'autres essais sont réalisés avec *Lactobacillus* sp. 48 [Crapisi *et al.*, 1987a] immobilisé dans du  $\kappa$ -carragheenan à 2% et 5% de Pentagel™ (silice bentonite). La demi-vie du réacteur est étendue à 46 jours. Pour un temps de séjour de 1 h 57 min, le rendement de la transformation de l'acide malique en acide lactique est de 78,4% avec la disparition de 68,5% d'acide malique. De faibles pH (3,15) et des concentrations en SO<sub>2</sub> de 0,2 mg/l n'affectent pas l'activité des cellules immobilisées. Les propriétés organoleptiques des vins obtenus ne semblent pas altérées. Donc la silice améliore notablement la durée de vie du réacteur.

Cette équipe a aussi comparé l'activité de différentes souches de bactéries lactiques immobilisées dans le gel précédent [Crapisi *et al.*, 1987b]. La disparition de l'acide malique

et sa conversion en acide lactique ne sont pas complètes. La durée de vie des réacteurs et la modification des qualités organoleptiques du vin dépendent des souches utilisées. *Lactobacillus brevis* 481 semble être la souche la mieux adaptée au contrôle de la FML par un réacteur à bactéries immobilisées.

En 1989, Truck *et al.* mettent au point un réacteur à lit fluidisé et à *L. œnos* immobilisé dans du gel d'alginate de calcium, dont la durée de vie est de trois jours et qui peut être régénéré.

Une équipe de Montpellier [Naouri *et al.*, 1990] publie une étude sur un bio-réacteur à lit fluidisé et à cellules immobilisées en gel d'alginate de calcium, et conclut qu'un système de bioconversion en "batch" est mieux adapté qu'un système en continu. *L. œnos* ATCC 23278 semble la plus apte à traiter des vins difficiles, bien que *Lactobacillus* sp. 89 présente un intérêt pour l'obtention de vins de très bonnes qualités "diététiques". La durée de vie des biocatalyseurs est de 2 à 6 jours, respectivement sans et avec régénération.

Ces nombreux travaux démontrent la possibilité de réaliser le contrôle de la FML des vins par un réacteur à bactéries immobilisées. Ce type de réacteur présente de nombreux avantages :

- les bactéries peuvent être réutilisées à condition qu'elles restent actives,
- le vin désacidifié contient peu de bactéries lactiques car elles sont retenues dans le réacteur : ceci diminue le danger de formation de produits secondaires indésirables et permet une filtration rapide,
- la FML peut être effectuée à un moment déterminé par des bactéries sélectionnées et le taux de bioconversion peut être ajusté en fonction de l'équilibre organoleptique optimal du vin.

Cependant, ce système montre quelques faiblesses telles que le danger d'une infection des bactéries par des phages, la perte d'activité malolactique au cours du temps et les modifications des qualités organoleptiques du vin [Cuenat et Villetaz, 1984].

Les travaux sont très avancés, mais aucune application n'est encore commercialisée.

Le Tableau 2 résume et compare les données concernant les réacteurs à bactéries immobilisées.



Références		Microorganisme	Support d'immobilisation	Type de réacteur	Durée de vie
Divies et Siess France Dijon Viller-Les-Nancy	1976	<i>Lactobacillus casei</i> non proliférant	gel de polyacrylamide	réacteur agité ("batch")	12 mois
Lee et Pack Corée Séoul	1980	<i>Leuconostoc ænos</i> ML 34	gel de polyacrylamide	réacteur agité ("batch")	quelques heures
Totsuka et Hara Japon Tokyo	1981	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	gel d'agar, gel d'alginate de calcium	"batch", colonne	90% d'activité pendant 60 jours
Spettoli <i>et al.</i> Italie Padoue	1982a 1982b	<i>Leuconostoc ænos</i> ML 34	sphères d'alginate de calcium à 1,67%	"batch"	60% d'activité à 36 jours
Gestrelus Danemark	1982	<i>Leuconostoc ænos</i>	sphères d'alginate de calcium	colonne	1/2 vie : 40 jours
Rossi et Clementi Italie Pérouse	1984	<i>Leuconostoc ænos</i> *	gel de polyacrylamide	"batch"	
Cuenat et Villetaz Suisse Bâle Nyon	1984	<i>Leuconostoc ænos</i>	sphères d'alginate de calcium	colonne	quelques heures
Mc Cord et Ryu USA Davis	1985	<i>Leuconostoc ænos</i> PSU 1	κ-carragheenan à 3%		
Spettoli <i>et al.</i> Italie Padoue	1984	<i>Leuconostoc ænos</i> ML 34	sphères d'alginate de calcium	colonne	1/2 vie : 15 jours
Spettoli <i>et al.</i> Italie Padoue	1987	<i>Leuconostoc ænos</i> ML 34	κ-carragheenan à 4% + silice 10%	colonne	1/2 vie : 2 jours sans silice 4 jours avec silice
		<i>Lactobacillus</i> sp. 48			8 jours
Crapisi <i>et al.</i> Italie Padoue	1987a	<i>Lactobacillus</i> sp. 48	κ-carragheenan à 2% + Pentagel™ 5%	colonne h : 19cm ø : 1,5cm	1/2 vie : 46 jours
Crapisi <i>et al.</i> Italie Padoue	1987b	<i>Leuconostoc ænos</i> 341	κ-carragheenan à 2% + Pentagel™ 5%	colonne	10 jours
		<i>Leuconostoc ænos</i> 231			
		<i>L. fructivorans</i> 461			
		<i>Lactobacillus brevis</i> 481			
Truck <i>et al.</i> Allemagne Stuttgart	1989	<i>Leuconostoc ænos</i>	sphères d'alginate de calcium à 2%	réacteur à lit fluidisé	régénération tous les 3 jours
Naouri <i>et al.</i> France Montpellier	1990	<i>Leuconostoc ænos</i> ATCC 23 278	sphères d'alginate de calcium à 2,5%	réacteur à lit fluidisé, en continu ou en discontinu	2 jours sans régénération
		<i>Lactobacillus</i> sp. 89			6 jours avec régénération

**Tableau 2** : Comparaison des différents types d'immobilisation de bactéries lactiques pour la fermentation malolactique des vins.

Milieu testé	(d) débit ou (ts) temps de séjour	Caractéristiques $V_m^*$ , $K_m^*$ , $R^*$ , $T_c^*$			Qualités organoleptiques	Remarques, problèmes
milieu synthétique		cellules libres : $K_m=5.10^{-3}M$ cell. immobil.: $K_m=1,25.10^{-2}M$ réacteur : $K_m=6,25.10^{-3}M$				alimentation du réacteur avec le milieu nutritif des bactéries
milieu synthétique		cellules libres	$K_m$ $5,52.10^{-3}$	$V_m$ $10,5.10^{-3}$		le gel ralentit la réaction
vin blanc 50ppm SO <sub>2</sub>	(ts) 12 h	cell. immobil.	$4,65.10^{-3}$	$4,63.10^{-3}$		
jus de raisin	(ts) 12 h	Tc 5%				
vin	(d) 0,2 vol/h : 40 ml/h (ts) 5 h	Tc 90%				
milieu synthétique		Activité max. à pH4, 15% éthanol				activité constante pendant 9 heures, puis baisse graduelle
vin SO <sub>2</sub> 8,96 mg/l	(ts) 3 jours	R 88,8% - Tc 100%				
vin SO <sub>2</sub> 21 mg/l	(ts) 16 h	R 83,5% - Tc 46%				
vin SO <sub>2</sub> 32 mg/l		R 0 - Tc 0				
vin à faible teneur en SO <sub>2</sub>	(ts) 2 h	Tc 100%			bonnes	le réacteur doit être alimenté en acide malique
milieu synthétique moût	(ts) 10 min	Tc 71%				
	(ts) 1 h	Tc 76%				
Chasselas	(d) 6 l/h (ts) 50 min	Tc 100%			bonnes	l'activité malolactique des bactéries diminue après quelques heures
Marsanne	(d) 4,5 l/h (ts) 1 h 7min	Tc 100%				
Gamay	(d) 4,8 l/h (ts) 1 h 2min	Tc 73%				
milieu synthétique		cellules libres	$K_m$ $2.10^{-3}$	$V_m$ $18.10^{-3}$		perte d'activité des cellules immobilisées
vin rouge Roboso	(d) 0,8 vol/h (ts) 1 h 15 min	cell. immobil.	$5,4.10^{-3}$	$10.10^{-3}$		
		R 87,2% - Tc 98,7%			bonnes	le traitement du vin n'altère pas ses qualités
vin Durello	(d) 0,64 vol/h (ts) 1 h 34 min	R 89% - Tc 77,1%			produits secondaires non affectés	la silice augmente la durée de vie du réacteur
		R 98% - Tc 84,6%				
vin Durello	(d) 0,51 vol/h (ts) 2 h	R 78,4% - Tc 68,5%			bonnes	le Pentage!™ augmente la durée de vie du réacteur
vin Durello	(d) 0,51 vol/h (ts) 1 h 57 min	R 76,3% - Tc 62,1%			dépendent de la souche	L. brevis semble être la souche la plus adaptée à l'immobilisation en vue du contrôle de la FML.
		R 79% - Tc 70,9%				
		R 77% - Tc 74,7%				
		R 80% - Tc 68,5%				
Riesling	(ts) 6 h	Tc 100%				
vin du Pouget		R 77% - Tc 95%				le système en "batch" est mieux adapté
		R 99% - Tc 95%				

$V_m^*$  : M . h<sup>-1</sup> . g cellule<sup>-1</sup>,  $K_m^*$  : M

$T_c^*$  (%) =  $\frac{\text{mole d'acide malique disparu}}{\text{mole d'acide malique initial}} \times 100$ ,  $R^*$  (%) =  $\frac{\text{mole d'acide lactique apparu}}{\text{mole d'acide malique disparu}} \times 100$

cell. immobil. : cellules immobilisées

Note : Pour pouvoir faire une étude comparative, nous avons utilisé les rapports suivants :

$$\begin{aligned} \text{Rendement : } R(\%) &= \frac{\text{concentration molaire d'acide lactique apparu}}{\text{concentration molaire d'acide malique disparu}} \times 100 \\ &= \frac{\text{mole d'acide lactique apparu}}{\text{mole d'acide malique disparu}} \times 100 \end{aligned}$$

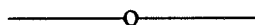
$$\text{Taux de conversion du malate : } Tc(\%) = \frac{\text{mole d'acide malique disparu}}{\text{mole d'acide malique initial}} \times 100$$

Donc les rendements de l'équipe italienne donnés en g/g, ou en g . l<sup>-1</sup>/g . l<sup>-1</sup> ont été recalculés en mol/mol ou en M/M.

### V-5-2 Réacteurs à enzyme malolactique

Jusqu'à maintenant, la réalisation de réacteurs à enzyme malolactique semblait difficilement envisageable car l'enzyme nécessite du NAD et son pH optimum : 5,75 est très éloigné de celui du vin : pH 3 - 3,5. De plus, le NAD est très instable à pH acide [Gestrelus, 1982 ; Cuenat *et al.*, 1984 ; Davis *et al.*, 1985].

Spettoli *et al.* en 1982[b] ont immobilisé de l'enzyme malolactique partiellement purifiée dans des gels d'alginate de calcium. L'augmentation du pH optimum de l'enzyme lors de l'immobilisation et la baisse d'activité de l'enzyme immobilisée (-87%) ont conduit les auteurs à expérimenter l'immobilisation des cellules entières et à abandonner celle de l'enzyme.



## VI-MÉCANISME BIOCHIMIQUE DE LA FERMENTATION MALOLACTIQUE

La fermentation malolactique, c'est-à-dire la décarboxylation de l'acide malique en acide lactique par l'enzyme malolactique, ne libère pas d'énergie utilisable pour la croissance des bactéries [Kunkee, 1967 ; Renault *et al.*, 1988]. Il ne s'agit donc pas d'une véritable fermentation. «Cependant, le terme de fermentation adopté par analogie à la fermentation alcoolique, est consacré par l'usage» [Lonvaud-Funel, 1986].

Différentes voies de dégradation de l'acide malique en acide lactique sont possibles. Lonvaud *et al.* [1977] proposent le schéma suivant :

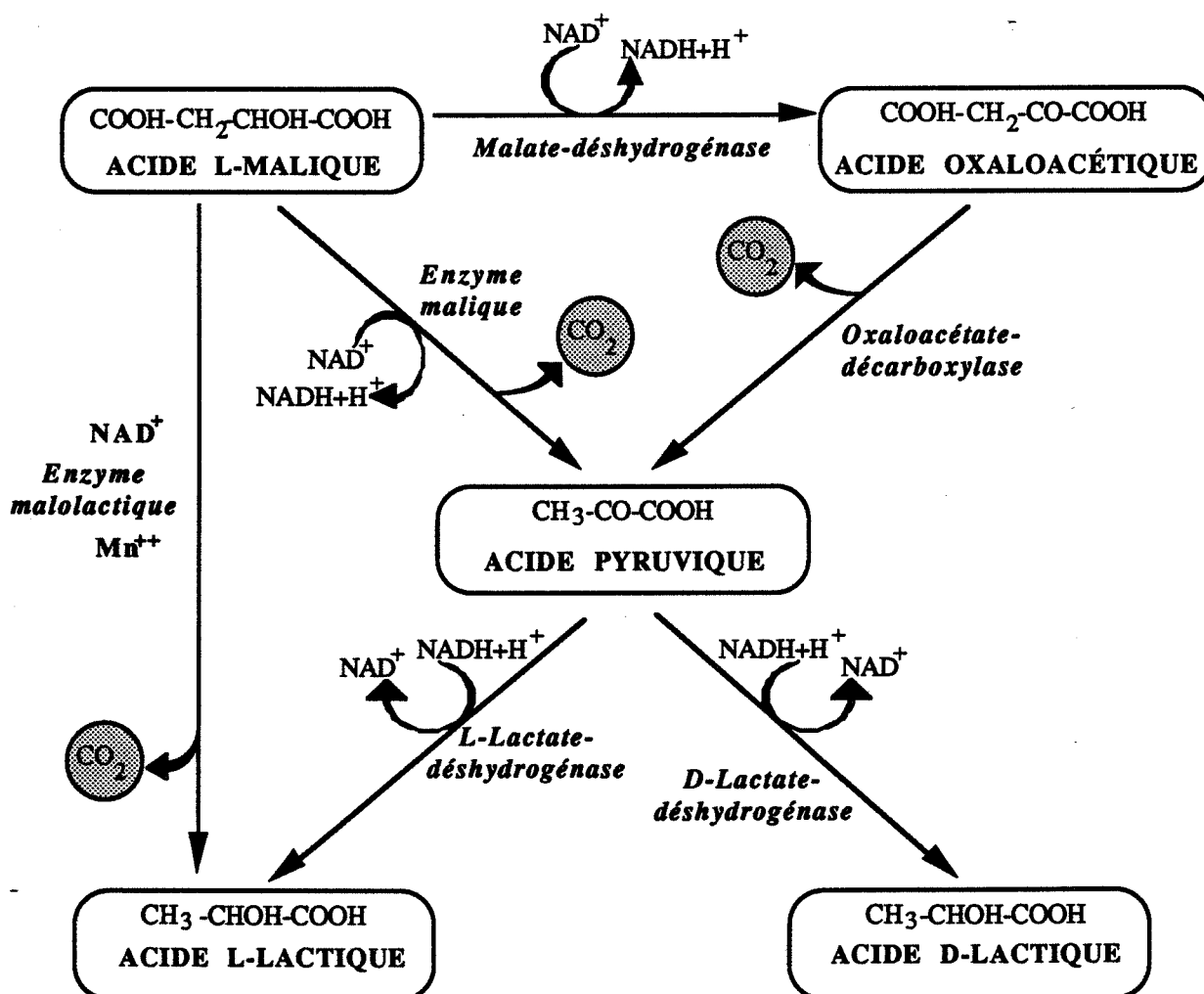


Schéma 1 : Différentes voies de dégradation de l'acide malique chez les microorganismes.

Dans les premières études sur l'enzymologie de la conversion du malate en lactate et  $\text{CO}_2$ , Korkes *et al.* [1948, 1950] pensent que cette transformation résulte de l'action de deux

enzymes : l'enzyme malique et la lactate-déshydrogénase. Une activité oxaloacétate-décarboxylase est aussi présente dans l'extrait qu'ils étudient.

Kaufmann *et al.* [1951] montrent que l'acide pyruvique n'est pas un intermédiaire libre, qu'il se trouve lié à l'enzyme et réduit en lactate très rapidement.

En 1967, Kunkee écarte la voie : malate-déshydrogénase → oxaloacétate-décarboxylase → lactate-déshydrogénase, car la malate-déshydrogénase a un pH optimum à 10 et n'est pas active au pH du vin.

En 1968, Peynaud observe que l'acide malique est toujours transformé en acide L-lactique, par des souches de *Leuconostoc*, alors que d'autres substances telles que le glucose, l'acide pyruvique, l'acide citrique donnent de l'acide D-lactique seul ou en mélange. La formation d'un intermédiaire n'est pas probable. Il conclut que la décarboxylation de l'acide malique est directe et ne nécessite pas le concours des lactate-déshydrogénases.

Schütz et Radler en 1973 séparent l'activité malolactique de l'activité lactate-déshydrogénase de *Lactobacillus plantarum*.

Il semble que depuis ces travaux la plupart des auteurs ayant travaillé sur ce sujet confirme la transformation directe de l'acide malique en acide lactique [Lonvaud et Ribéreau-Gayon, 1973 ; Lonvaud *et al.*, 1977 ; Lonvaud-Funel et Strasser de Saad, 1982 ; Caspritz et Radler, 1983 ; Strasser de Saad *et al.*, 1984-1985 ; Spettoli *et al.*, 1984 ; Chagnaud *et al.*, 1989 ; Naouri *et al.*, 1990 ; Battermann et Radler, 1991]. L'enzyme est formée de deux sous-unités identiques de masse moléculaire relative 65 000 chacune en moyenne, les différences observées d'un auteur à l'autre sont dues aux techniques et aux conditions d'analyse [Battermann et Radler, 1991].

En 1984, Williams *et al.* transfèrent le gène de l'enzyme malolactique de *Lactobacillus helveticus* dans *Escherichia coli* et *Saccharomyces cerevisiae*. L'expression du fragment de 5 kb est une protéine dont la masse moléculaire relative est de 65 000, ce qui confirme les résultats précédents.

En accord avec Kunkee, Lonvaud *et al.* [1977] ont proposé un nom caractéristique à l'enzyme des bactéries du vin, le terme trivial d'enzyme malolactique. Ce terme a été adopté. Cette enzyme ne figure pas encore dans la nomenclature officielle. Au point de vue biochimique, il s'agit d'une malate-décarboxylase. Lautensach et Subden [1984] emploient le terme de malate carboxylase.

## VII-TECHNIQUES DE PURIFICATION DE L'ENZYME MALOLACTIQUE

La purification de l'enzyme malolactique a été effectuée à partir de différents microorganismes par des procédés biochimiques classiques.

Note : l'activité spécifique est exprimée en U/mg, c'est-à-dire en :

•  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ formé} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ protéine}$   
ou en :  $\mu\text{mol acide malique dégradé} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ protéine}$ ,  
sauf lorsque cela est précisé.

### VII-1 PURIFICATION

#### VII-1-1 *Lactobacillus plantarum*

##### VII-1-1-1 Lonvaud [1975], Lonvaud et al. [1977]

Cette équipe de Bordeaux a choisi une souche de *L. plantarum* ayant une activité malolactique appréciable. Les bactéries sont cultivées sur milieu de Carr à pH 4,8, enrichi avec de l'acide D-L-malique à 20 g/l, du glucose à 40 g/l et du jus de tomate ; elles sont broyées par deux passages dans un fractionneur de cellules réfrigéré. L'extrait acellulaire est débarrassé des substrats endogènes et des sels par filtration sur gel de Sephadex® G-25. Il est ensuite purifié par précipitation des protéines par la chaleur (40°C) et le chlorure de manganèse, puis à 4°C par le sulfate de protamine, et enfin par précipitation fractionnée par le sulfate d'ammonium à 60% et 90%. Des fractions très actives vis-à-vis du malate sont obtenues après filtration sur gel Sephadex® G-100. L'enzyme malolactique est séparée de la L-lactate-déshydrogénase (L-LDH) par chromatographie d'adsorption sur hydroxyapatite et électrofocalisation préparative. Le point isoélectrique est de 4,35.

A partir d'un extrait brut dont l'activité spécifique est de 3 U/mg, un extrait partiellement purifié a été obtenu, avec une activité spécifique de 90 U/mg. L'enzyme a donc été purifiée 30 fois.

##### VII-1-1-2 Caspritz et Radler [1983]

Ils ont purifié l'enzyme malolactique de *L. plantarum* B 38. Les bactéries sont cultivées sur milieu de *L. ænos* modifié par addition d'acide malique à 10 g/l, et à pH 5,5 - 6. Elles sont broyées à l'aide d'un homogénéiseur, en cellule réfrigérée. Les acides nucléiques et les nucléoprotéines sont éliminés par précipitation au sulfate de protamine. La préparation enzymatique est ensuite purifiée par une chromatographie d'échange d'ions sur TEAE 23-cellulose, puis par chromatographie hydrophobe sur colonne de Phenyl-Sepharose® CL-4B, et enfin par électrofocalisation préparative. Le point

isoélectrique est de 4,4. Après avoir été purifiée 48 fois, une protéine homogène est obtenue. Elle a une très forte activité spécifique : 265 U/mg. La masse moléculaire relative a été estimée par électrophorèse sur gradient de gel de polyacrylamide, à environ 140 000. Après traitement au SDS, l'enzyme malolactique est divisée en deux sous-unités apparemment identiques, de masse moléculaire relative d'environ 70 000 chacune.

### VII-1-2 *Lactobacillus murinus*

#### Strasser de Saad et al. [1984]

Les bactéries, *L. murinus* CNRZ 313, sont cultivées sur milieu LAPTg, pH 6, modifié par addition d'acide L-malique à 5 g/l. Les cellules sont désintégrées aux ultrasons. Après centrifugation, l'extrait brut est précipité par la chaleur et le chlorure de manganèse, puis à 4°C, par le sulfate de protamine et le sulfate d'ammonium à 40% puis à 75% de saturation. La préparation est filtrée sur Ultrogel® AcA 34, et chromatographiée sur deux types de résines échangeuses d'ions : DEAE-Sephadex® A-50 et CM-Sephadex® C-25. L'extrait est alors filtré sur Sepharose® 6B. La protéine a été purifiée 79 fois et a une activité spécifique de 92 U/mg. Cet échantillon montre une seule bande protéique en électrophorèse sur gel de polyacrylamide et a une masse moléculaire relative, déterminée par électrophorèse et par filtration sur gel, de 220 000. Après traitement au SDS, une seule bande protéique est obtenue pour une masse moléculaire relative d'environ 110 000. Ceci correspond à la moitié de l'enzyme malolactique intacte, et les auteurs pensent que cette enzyme est constituée de deux sous-unités apparemment identiques.

### VII-1-3 *Lactobacillus* sp.

#### Chagnaud [1989]

Les bactéries sont cultivées sur milieu MRS modifié par addition d'acide D-L-malique. Les cellules sont désintégrées aux ultrasons. L'extrait brut est précipité au chlorure de manganèse, au sulfate de protamine, puis au sulfate d'ammonium à 40% et 70% de saturation. Après dialyse, la préparation enzymatique est passée sur un échangeur d'anions : Q Sepharose® Fast Flow, puis sur hydroxyapatite, et successivement sur gel de Sephacryl® 300 HR et de Sephadex® G-150. L'enzyme a été purifiée 142 fois et a une activité spécifique de 214 U/mg. L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide montre une seule bande protéique et la masse moléculaire relative a été estimée par filtration sur gel à 120 000. Une seule bande apparaît lors de l'électrophorèse en présence de SDS ; sa masse moléculaire relative a été estimée à 60 000, donc l'enzyme malolactique semble être formée de deux sous-unités identiques. Le point isoélectrique de l'enzyme est de 4,5.

### VII-1-4 *Leuconostoc mesenteroides*

#### VII-1-4-1 Lonvaud-Funel et Strasser de Saad [1982]

L'enzyme malolactique de *L. mesenteroides* a été partiellement purifiée.

Les bactéries sont cultivées sur milieu de Carr modifié par addition de jus de tomate, d'acide D-L-malique à 20 g/l et de glucose et ajusté à pH 4,8. Les cellules bactériennes sont lysées par un désintégrateur à ultrasons. L'extrait brut est obtenu après centrifugation ; il est débarrassé des acides nucléiques et des nucléoprotéines par précipitation par le chlorure de manganèse et la chaleur (40°C) ; la présence de malate stabilise l'extrait vis-à-vis de la dénaturation thermique. Un traitement complémentaire à 4°C par le sulfate de protamine permet d'éliminer totalement les nucléoprotéines. L'extrait est ensuite soumis à une précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium à 40% : l'enzyme malolactique se trouve alors dans le surnageant ; elle est précipitée à 75% de saturation en sulfate d'ammonium. La purification se poursuit par filtration sur gel : Ultrogel® AcA 34. Après dialyse, l'extrait est soumis à une électrofocalisation sur colonne LKB. Le point isoélectrique est de 4,35. La préparation enzymatique présente une activité spécifique de 73 U/mg ; elle a été purifiée 10 fois ; la masse moléculaire relative déterminée par calibration de la colonne d'Ultrogel® AcA 34, a été estimée à 235 000. L'existence de deux sous-unités n'a pas été montrée, mais elle est supposée par l'étude de l'activité cinétique de l'enzyme.

#### VII-1-4-2 Lonvaud-Funel [1986]

Une autre technique de purification a été expérimentée avec des extraits de *L. mesenteroides*. Il s'agit de la chromatographie d'affinité sur Blue Sepharose® CL-6B. Les protéines présentant une bonne affinité pour le colorant (ligand pour les enzymes à cofacteurs nucléotidiques) sont retenues, notamment l'enzyme malolactique. La colonne est ensuite éluée pour récupérer la protéine.

#### VII-1-4-3 Radler et Battermann [résultats cités par Radler, 1986]

Ils ont purifié l'enzyme malolactique d'une autre souche de *L. mesenteroides*. L'électrophorèse sur gel montre que la protéine de la préparation enzymatique la plus active a une masse moléculaire relative d'environ 70 000, mais cette protéine tend à former des agrégats et une masse moléculaire relative de 140 000 a été déterminée par ultracentrifugation.

### VII-1-5 *Leuconostoc ænos*

#### VII-1-5-1 Spettoli et al. [1982 a.b.]

Cette équipe a travaillé sur l'enzyme malolactique de *L. ænos* ML 34. Les bactéries sont cultivées sur un milieu au jus de tomate contenant de l'acide L-malique. Les cellules sont désintégrées aux ultrasons. Après centrifugation et dialyse, l'extrait brut est déposé sur une colonne de chromatographie d'affinité : AGNAD™ Type 3, composée d'Agarose-Hexane-NAD<sup>+</sup>. L'activité malolactique n'est pas retenue et est éluée au volume mort, alors que la lactate-déshydrogénase est fixée par la colonne AGNAD™ Type 3, spécifique des enzymes NAD dépendantes.



L'enzyme malolactique a été purifiée 5,2 fois et a une activité spécifique de 10,26 ppm CO<sub>2</sub> . min<sup>-1</sup> . mg<sup>-1</sup> protéine correspondant à 233 U/mg.

Spettoli *et al.* ont essayé d'autres types de supports pour la chromatographie d'affinité.

- [1983] Après deux passages sur 5'AMP Sepharose 4B, le degré de purification augmente 6,5 fois. Lorsque la chromatographie d'affinité est suivie d'une chromatographie de perméation de gel sur Bio-Gel® A-1.5m, l'enzyme malolactique est purifiée 37 fois. L'activité spécifique est de 531 U/mg. La masse moléculaire relative déterminée sur Bio-Gel® A-1.5m est d'environ 130 000.

- [1984a] AGNAD™ Type 1 et Affi-Gel® blue mènent à des taux de purification plus bas : 1,04 et 2,4 fois respectivement.

- $\beta$ -NAD-agarose et 2',5' ADP Sepharose® 4B ne permettent pas la séparation de la L-lactate-déshydrogénase.

#### VII-1-5-2 Mc Cord et Ryu [1985]

Ils ont essayé de purifier l'enzyme malolactique de *L. œnos* PSU 1 avec la même technique que celle utilisée par Caspritz et Radler [1983] pour *L. plantarum* (cf 1-1-2). L'extrait enzymatique est purifié 21 fois et a une activité spécifique de 16,8 U/mg. Mais la D-LDH contamine l'extrait purifié et les auteurs ne sont pas arrivés à séparer les deux activités, ni par électrophorèse, ni par électrofocalisation.

#### VII-1-5-3 Lonvaud-Funel [1986]

Elle a purifié l'enzyme malolactique de *L. œnos* GM. Après broyage aux ultrasons, l'extrait acellulaire est traité par la nucléase DNase I pour éliminer les acides nucléiques, puis au sulfate d'ammonium à 40% puis 75% de saturation. Le dernier précipité est filtré sur Ultrogel® AcA 34 ; les deux activités : enzyme malolactique et L-lactate déshydrogénase (L-LDH) sont présentes. Les fractions les plus actives sont incubées avec le gel d'affinité Blue Sepharose® CL-6B, et du tampon phosphate 0,1 M pH 6 contenant MnCl<sub>2</sub> 1 mM + malate 20 mM + NAD<sup>+</sup> 0,5 mM. Dans ces conditions particulières, le gel fixe l'activité L-LDH. L'activité malolactique est restituée à 87% dans les fractions éluées. L'activité spécifique est deux fois plus importante que celle de l'extrait déposé.

#### VII-1-5-4 Naouri *et al.* [1990a]

Les bactéries sont cultivées sur un milieu au jus de tomate, puis désintégrées aux ultrasons. L'extrait brut obtenu est traité au chlorure de manganèse, au sulfate de protamine puis au sulfate d'ammonium à 40% et 80% de saturation. Le surnageant obtenu est dialysé puis déposé sur une colonne de chromatographie d'échange d'ions Q Sepharose® Fast Flow, puis sur une colonne d'hydroxyapatite et enfin sur une colonne de Sephadex G-200. La préparation enzymatique obtenue présente une activité spécifique de 85 U/mg ; elle a été purifiée 136 fois. La masse moléculaire relative a été estimée à 132 000

sur Sephadex G-200. Après une électrophorèse en présence de SDS, l'enzyme montre deux sous-unités identiques de masse moléculaire relative d'environ 66 000. Le point isoélectrique est de 4,3.

L'évolution de l'activité spécifique des enzymes : lactate-déshydrogénase (LDH) et enzyme malolactique (EML) au cours de la purification de l'enzyme malolactique de *L. ænos* est résumée dans le Tableau 3 :

Références →	Spettoli <i>et al.</i> , 1982a		Spettoli <i>et al.</i> , 1984		McCord <i>et al.</i> , 1985	Naouri <i>et al.</i> , 1990
	LDH (U/mg)	EML (U/mg)	LDH (U/mg)	EML (U/mg)	EML (U/mg)	EML (U/mg)
Étapes de purification ↓						
Extrait brut	79,4	44,8	201	14,1	0,8	0,627
Sulfate d'ammonium						2,63
Sulfate de protamine					1,2	
Chromatographie échange d'ions					5,6	12
Chromatographie d'affinité	0	233	57,3	25,2		
Chromatographie d'affinité			0,91	93,1		
Chromatographie hydrophobe					16,8	
Chromatographie d'adsorption						44,7
Chromatographie filtration sur gel			0	531,2		85,1
Taux de purification (fois)		5,2		37,74	21	136

Tableau 3 : Activités spécifiques de la lactate-déshydrogénase et de l'enzyme malolactique de *L. ænos* au cours de la purification de l'enzyme malolactique.

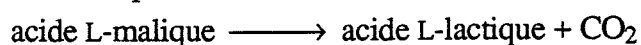
### VII-1-6 Étude comparative de Battermann et Radler [1991]

Battermann et Radler ont publié début 1991 une étude comparative de l'enzyme malolactique et de l'enzyme malique de différentes souches de bactéries lactiques. Les résultats qu'ils exposent sont en accord avec ceux que nous venons de présenter.

### VII-2 STÉCHIOMÉTRIE DE LA RÉACTION MALOLACTIQUE

Après avoir purifié l'extrait enzymatique, son activité est testée. Les quantités de L-malate consommé et de L-lactate et CO<sub>2</sub> formés sont déterminées.

Tous les auteurs s'accordent pour confirmer la stœchiométrie de la réaction :



La réaction se fait avec l'enzyme malolactique, en absence de L-LDH et d'enzyme malique.

Références	Lonvaud, 1975	Caspritz et Radler, 1983	Strasser de Saad <i>et al.</i> , 1984	Chagnaud <i>et al.</i> , 1989	Lonvaud-Funel et Strasser de Saad, 1982
Microorganisme	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i> B38	<i>Lactobacillus murinus</i> CNRZ313	<i>Lactobacillus</i> sp.	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Élimination des acides nucléiques et des nucléoprotéines	<ul style="list-style-type: none"> <li>•↓ MnCl<sub>2</sub> 40°C</li> <li>•↓ sulfate de protamine</li> <li>•↓ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 60% puis 90%</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•↓ sulfate de protamine</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•↓ MnCl<sub>2</sub> 40°C</li> <li>•↓ sulfate de protamine</li> <li>•↓ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 40% puis 75%</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•↓ MnCl<sub>2</sub> 40°C</li> <li>•↓ sulfate de protamine</li> <li>•↓ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 40% puis 70%</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•↓ MnCl<sub>2</sub> 40°C</li> <li>•↓ sulfate de protamine</li> <li>•↓ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 40% puis 75%</li> </ul>
Étapes de purification  chromatographie : chr. électrofocalisation : IEF	<ul style="list-style-type: none"> <li>•chr. gel filtration Sephadex G-100</li> <li>•IEF colonne LKB gradient de saccharose 0 à 50% ampholines 2% pH 4 - 4,5</li> <li>pI = 4,35</li> <li>•chr. d'adsorption hydroxyapatite</li> <li>•chr. gel filtration Sephadex G-100</li> <li>•IEF</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•chr. échange d'ions TEAE 23-cellulose</li> <li>•chr. hydrophobe Phenyl Sepharose CL-4B</li> <li>•IEF plaque horizontale Sephadex IEF 5% ampholines 6% pH 4 - 6</li> <li>pI = 4,4</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•chr. gel filtration Ultrogel AcA 34</li> <li>•chr. échange d'ions DEAE-Sephadex A-50</li> <li>CM-Sephadex C-25</li> <li>•chr. gel filtration Sepharose 6B</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•chr. échange d'ions Q Sepharose Fast Flow</li> <li>•chr. d'adsorption hydroxyapatite</li> <li>•chr. gel filtration Sephacryl 300 HR</li> <li>•chr. gel filtration Sephadex G-150</li> <li>M<sub>r</sub> 120 000</li> <li>•IEF plaque horizontale ampholines 2% pH 3 - 10</li> <li>pI = 4,5</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•chr. gel filtration Ultrogel AcA 34</li> <li>M<sub>r</sub> 235 000</li> <li>•IEF colonne LKB gradient de glycérol 0 à 50% ampholines 2% pH 3,5 - 5</li> <li>pI = 4,35</li> </ul>
Électrophorèse	gel de polyacrylamide à 5,5%	gel de polyacrylamide gradient 4/30 M <sub>r</sub> 140 000	gel de polyacrylamide gradient 4/30 M <sub>r</sub> 220 000	gel de polyacrylamide à 7%, avec gel de concentration : 4%	
Électrophorèse + SDS		M <sub>r</sub> 70 000 (x 2)	M <sub>r</sub> 110 000 (x 2)	M <sub>r</sub> 60 000 (x 2)	

Tableau 4 : Techniques de purification de l'enzyme malolactique pour les différents microorganismes.

Lonvaud-Funel, 1986	Spettoli <i>et al.</i> , 1982b et 1984	Spettoli <i>et al.</i> , 1983	Mc Cord et Ryu, 1985 et 1988	Lonvaud-Funel, 1986	Naouri <i>et al.</i> , 1989
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Leuconostoc oenos</i> ML34	<i>Leuconostoc oenos</i> ML34	<i>Leuconostoc oenos</i> PSU-1	<i>Leuconostoc oenos</i>	<i>Leuconostoc oenos</i> ATCC 23278
<ul style="list-style-type: none"> <li>•↓ MnCl<sub>2</sub> 40°C</li> <li>•↓ sulfate de protamine</li> <li>•↓ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 40% puis 75%</li> </ul>			<ul style="list-style-type: none"> <li>•↓ sulfate de protamine</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•nucléase : DNase I</li> <li>•↓ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 40% puis 75%</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•↓ MnCl<sub>2</sub> 40°C</li> <li>•↓ sulfate de protamine</li> <li>•↓ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 40% puis 80%</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>•<u>chr. gel filtration</u> Sephadex G-25</li> <li>•<u>chr. d'affinité</u> Blue Sepharose CL-6B</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li><u>chr. d'affinité</u></li> <li>•AGNAD Type 3 : sépare MLA de LDH</li> <li>•AGNAD Type 1 et Affi-Gel blue : ⇒↓ du degré de purification</li> <li>•βNAD Agarose et 2',5'ADP Sepharose 4B ne séparent pas MLA de LDH</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•<u>chr. d'affinité</u> 5'AMP Sepharose 4B, 2 fois</li> <li>•<u>chr. gel filtration</u> Bio-Gel A-1.5m</li> <li><math>M_r</math> 130 000</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•<u>chr. échange d'ions</u> TEAE 23-cellulose</li> <li>•<u>chr. hydrophobe</u> Phenyl Sepharose CL-4B</li> <li>•<u>IEF ampholines</u> pH 4 - 6,5</li> <li>•<u>chr. gel filtration</u> <math>M_r</math> 138 000</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•<u>chr. gel filtration</u> Ultrogel AcA 34</li> <li>•<u>chr. d'affinité</u> Blue Sepharose CL-6B</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•<u>chr. échange d'ions</u> Q Sepharose Fast Flow</li> <li>•<u>chr. d'adsorption</u> hydroxyapatite</li> <li>•<u>chr. gel filtration</u> Sephadex G-200 <math>M_r</math> 132 000</li> <li>•<u>chromatofocalisation</u> (Pharmacia) pH 4 - 5</li> <li><math>pI = 4,3</math></li> </ul>
			gel de polyacrylamide à 7,5%		gel de polyacrylamide à 7% avec gel de concentration : 4%
			$M_r$ 65 500 (x 2)		$M_r$ 66 000 (x 2)

↓ : précipitation

MLA : activité malolactique, LDH : lactate-déshydrogénase

### VII-3 CONCLUSION SUR LA PURIFICATION

Le Tableau 4 résume les étapes de la purification de l'enzyme malolactique, à partir des extraits bruts, pour les différents microorganismes.

La purification de l'enzyme malolactique pose des problèmes différents selon la souche de bactérie lactique utilisée. Les principales difficultés sont la séparation entre l'enzyme malolactique et d'autres enzymes contaminant l'extrait, telles que l'enzyme malique et la L-LDH.

L'activité L-LDH a été éliminée après électrofocalisation d'extraits de *L. plantarum* par Lonvaud [1975 et 1977]. De même, par Spettoli *et al.* [1984] avec *L. ænos*, par chromatographie d'affinité sur AGNAD™ Type 3 ou 5' AMP-Sepharose® 4B, par Lonvaud-Funel [1986] avec *L. ænos* par chromatographie d'affinité sur Blue Sepharose® CL6B, par Strasser de Saad *et al.* [1984], après filtration de l'extrait enzymatique de *L. murinus* sur une colonne de chromatographie de Sepharose® 6B.

La chromatographie d'affinité semble un bon moyen pour séparer l'activité L-LDH de l'activité malolactique, que ce soit avec Blue Sepharose® CL 6B ou AGNAD™ Type 3.

Une faible activité de l'enzyme malique est détectée dans les extraits de *L. mesenteroides* purifiés par Lonvaud-Funel et Strasser de Saad [1982].

Caspritz et Radler [1983], observent une activité oxaloacétate décarboxylase dans les extraits purifiés de *L. plantarum*.

Mc Cord et Ryu [1985], détectent une activité D-LDH dans les extraits purifiés de *L. ænos*.

La chromatographie sur échangeur d'anions : Q Sepharose® Fast Flow semble une technique nouvelle intéressante par ses performances de séparation et par sa rapidité.

## VIII-PROPRIÉTÉS CINÉTIQUES DE L'ENZYME MALOLACTIQUE

### VIII-1 ETUDE CINÉTIQUE

#### VIII-1-1 Affinité de l'enzyme malolactique pour les différents substrats

L'acide malique et le NAD<sup>+</sup> sont considérés comme les deux substrats de l'enzyme malolactique et les cinétiques sont étudiées en fonction de leurs concentrations. L'influence de la concentration en chlorure de manganèse est traitée de la même manière. La méthode utilisée est celle de Lineweaver et Burk.

Les constantes de Michaelis de l'enzyme malolactique pour l'acide malique, le NAD et le manganèse ont été déterminées pour différents microorganismes.

Auteur	Lonvaud, 1975	Caspritz <i>et al.</i> , 1983	Strasser de Saad <i>et al.</i> , 1984-1985	Chagnaud <i>et al.</i> , 1989	Lonvaud-Funel, 1986	Spettoli <i>et al.</i> , 1984	Naouri <i>et al.</i> , 1990
Bactérie étudiée	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus murinus</i>	<i>Lactobacillus</i> sp.	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Leuconostoc œnos</i>	<i>Leuconostoc œnos</i>
pH optimum	5,8 - 6		5,5	5,5	5,75	5,8	5
pH d'étude	6	6	6	6	6	5,8	6
t(°C) d'étude	25	37	37	37	25	30	37
<b>K<sub>m</sub> (M)</b>							
Acide malique	4,5.10 <sup>-3</sup>	9,5.10 <sup>-3</sup>	2,41.10 <sup>-5</sup>	4,1.10 <sup>-3</sup>	16,7.10 <sup>-3</sup>	2,8.10 <sup>-3</sup>	1,7.10 <sup>-2</sup>
NAD	3,2.10 <sup>-5</sup>	5,9.10 <sup>-5</sup>	4,5.10 <sup>-7</sup>	0,185	4,3.10 <sup>-5</sup>	1,3.10 <sup>-4</sup>	4,4.10 <sup>-5</sup>
Mn <sup>++</sup>		1,2.10 <sup>-5</sup>	1,97.10 <sup>-7</sup>	4,54.10 <sup>-5</sup>	4,6.10 <sup>-5</sup>	2,8.10 <sup>-5</sup>	1,7.10 <sup>-5</sup>

**Tableau 5 :** Constantes d'affinité de l'enzyme malolactique pour l'acide malique, le NAD et le manganèse en fonction des souches étudiées.

Les variations importantes observées peuvent être dues à la différence entre les enzymes des divers microorganismes, et aux conditions d'études.

A. Lonvaud-Funel [1986] et A.M. Strasser de Saad *et al.* [1984-1985] ont fait une étude plus poussée de la réaction enzymatique.

D'après ces auteurs, l'enzyme fonctionne selon un mécanisme séquentiel ordonné. Le NAD et le manganèse sont attachés en premier à la protéine : leurs liaisons sont indépendantes de la concentration en acide malique, Mn<sup>++</sup> agit comme un activateur allostérique. NAD et Mn<sup>++</sup> favorisent la fixation de l'acide malique. L'acide malique gêne la

fixation du NAD. A faible concentration en NAD, il y a une activation par le NAD lui-même, de type coopérativité positive homotropique.

### VIII-1-2 Remplacement de $Mn^{++}$ par d'autres ions divalents

D'autres ions divalents peuvent remplacer le  $Mn^{++}$ . Le Tableau 6 résume les études réalisées par Lonvaud-Funel [1986], Spettoli *et al.* [1984] et Naouri *et al.* [1990].

Chagnaud *et al.* [1989] ont testé l'influence des cations avec la méthode mathématique de Plackett et Burman : cette méthode est basée sur l'analyse des matrices d'Hadamard. Les cations :  $Co^{++}$ ,  $Mn^{++}$ ,  $Ba^{++}$ ,  $Mg^{++}$  ont un effet activateur alors que  $Hg^{++}$ ,  $Zn^{++}$ ,  $Cu^{++}$ ,  $Fe^{++}$  semblent avoir un effet inhibiteur. Le  $K_m$  de l'enzyme pour le cobalt est de  $4,54.10^{-5}M$ .

Auteur	Lonvaud-Funel, 1986	Spettoli <i>et al.</i> , 1984	Naouri <i>et al.</i> , 1990
Bactérie	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Leuconostoc œnos</i>	<i>Leuconostoc œnos</i>
Cofacteurs	activités relatives(%)		
$Mn^{++}$	100	100	100
$Co^{++}$	91	92	90
$Ni^{++}$	65		
$Zn^{++}$		59	29
$Mg^{++}$	70	57	16
$Fe^{++}$		45	98
$Cu^{++}$		28	31

Tableau 6 : Influence des ions divalents sur l'activité de l'enzyme malolactique des différentes souches de bactéries lactiques.

### VIII-2 INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE

Elle a été étudiée par A.M. Strasser de Saad *et al.* [1984] sur des extraits purifiés de *Lactobacillus murinus*. L'influence de la température a aussi été étudiée par l'équipe de Montpellier : Chagnaud *et al.* [1989] et Naouri *et al.* [1990].

Références	Strasser de Saad <i>et al.</i> , 1984	Chagnaud <i>et al.</i> , 1989	Naouri <i>et al.</i> , 1990
Bactérie	<i>Lactobacillus murinus</i>	<i>Lactobacillus</i> sp.	<i>Leuconostoc œnos</i>
Température optimale (°C)	37	45	37
$\Delta G$ (Kcal . mol <sup>-1</sup> )	<30°C : 16,2 >30°C : 8	<20,5°C : 41,2 >20,5°C : 7,48	16,84
Chaleur d'inactivation (Kcal . mol <sup>-1</sup> )		76,6	39,2

Tableau 7 : Influence de la température sur l'activité de l'enzyme malolactique des différentes souches de bactéries lactiques.

La variation d'énergie libre ( $\Delta G$ ) de la réaction a été calculée à partir des courbes d'Arrhenius. La courbe d'Arrhenius est biphasique avec un changement d'énergie libre à 30°C pour *L. murinus*, et à 20,5°C pour *Lactobacillus* sp..

Ces résultats indiquent un changement de conformation de la protéine, ce qui suggère la possibilité que l'enzyme soit oligomérique.

### VIII-3. INFLUENCE DU PH

Cette étude a été faite par Lonvaud-Funel *et al.* [1982 et 1986] sur *L. mesenteroides* et par Strasser de Saad *et al.* [1984] sur *L. murinus*.

#### VIII-3-1 Comportement vis-à-vis de l'acide malique

La concentration en NAD étant constante, la vitesse de réaction est mesurée en faisant varier la concentration en acide malique, et le pH de 4 à 7.

Le pH optimum est indépendant de la concentration en acide malique, et est de 5,75 pour *L. mesenteroides*, et de 5,5 pour *L. murinus*.

L'allure des courbes de vitesse de réaction en fonction de la concentration en acide malique varie en fonction du pH : sigmoïdale de pH 4 à 5,5, et michaelienne de 5,5 à 6,5.

Les représentations de Lineweaver et Burk ( $\frac{1}{V} = f\left(\frac{1}{[\text{malate}]}\right)$ ) aux pH 4, 4,5, 5 indiquent une coopérativité positive.

L'indice de coopérativité ( $n^H$  ou  $n^a$ ) a été calculé par le tracé des droites en coordonnées de Hill :

$$\log \frac{v}{V_m - v} = f(\log [\text{malate}])$$

pH	Indice de coopérativité	
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Lactobacillus murinus</i>
4	2,38	
4,5	1,64	2
5	1,38	1,3
5,5	1	1
6	1	1,5
6,5	1	1,6
7	1,4	1,8

Tableau 8 : Indice de coopérativité en fonction du pH.

Le comportement sigmoïdal de la concentration en substrat indique la possibilité que l'enzyme soit oligomérique.

Aux pH voisins du pH optimum, l'indice est égal à 1 : l'effet coopératif est masqué.



Aux pH éloignés du pH optimum, il y a une coopérativité positive pour l'acide malique.

### VIII-3-2 Comportement vis-à-vis du NAD

Pour une concentration constante en acide malique, les variations du pH et du NAD produisent toujours une réaction qui suit une cinétique michaelienne à toutes les valeurs de pH. L'affinité de l'enzyme pour le NAD et la vitesse maximale de réaction sont positivement corrélées avec le pH.

### VIII-4. INFLUENCE DES INHIBITEURS

Les valeurs des  $K_i$  sont obtenues à partir des représentations de Dixon.

Inhibiteur	Type d'inhibition	Lonvaud-Funel <i>et al.</i> , 1982 <i>L. mesenteroides</i>		Strasser de Saad <i>et al.</i> , 1984 <i>L. murinus</i>		Chagnaud <i>et al.</i> , 1989 <i>Lactobacillus</i> sp.	Naouri <i>et al.</i> , 1990 <i>L. ænos</i>
		inhibition (%)	$K_i$ (M)	inhibition (%)	$K_i$ (M)	$K_i$ (M)	$K_i$ (M)
acide citrique	compétitive		$11.10^{-3}$	40	$9,78.10^{-6}$	$4,94.10^{-3}$	$0,6.10^{-3}$
acide malonique	non compétitive	4		38	$6,4.10^{-6}$		
acide oxamique	non compétitive		$9.10^{-3}$	67	$2,73.10^{-5}$		
fructose 1-6-di-ph.	non compétitive		$32.10^{-3}$	62	$8,9.10^{-5}$		
acide L-lactique	non compétitive		0,28			$45.10^{-3}$	$16.10^{-3}$
acide succinique	compétitive	9	$78.10^{-3}$			$60.10^{-3}$	$80.10^{-3}$
acide D-tartrique	compétitive	62	$11.10^{-3}$			$13,5.10^{-3}$	$21.10^{-3}$
acide L-tartrique	compétitive	41	$12.10^{-2}$	62	$15,8.10^{-6}$		
acide mésotartrique	compétitive	46	$19.10^{-3}$				
acide fumarique		15					
acide D-malique		15					
acide oxalique		100					
éthanol	non compétitive					1,03	$20.10^{-3}$

**Tableau 9** : Constantes d'inhibition des principaux inhibiteurs de l'enzyme malolactique des différentes souches de bactéries lactiques.

L'inhibition non compétitive obtenue avec l'acide malonique (analogue structural de l'acide malique), suggère que dans la liaison acide malique - protéine, un groupe OH du substrat est impliqué. Ceci est aussi montré par l'inhibition compétitive observée avec les acides L-tartrique et L-citrique due à leur structure similaire à celle de l'acide malique.

Les principaux acides organiques dicarboxyliques présents dans le vin produisent une inhibition compétitive, ce qui explique les difficultés observées dans la pratique lors de l'initiation et de l'achèvement de la fermentation malolactique des vins.

## VIII-5. ACTION DE QUELQUES EFFECTEURS ENZYMATIQUES

Dans le cas de l'enzyme malolactique de *L. mesenteroides*, le *p*-mercuribenzoate à  $2,2 \cdot 10^{-3}$  mM inhibe la réaction enzymatique ; cette inhibition est levée par addition de dithiothréitol à  $87 \cdot 10^{-3}$  mM, ce qui indique une participation des groupes thiols, sous forme réduite, à la catalyse enzymatique [Lonvaud-Funel, 1986].

Pour l'enzyme malolactique de *L. murinus*, les agents réducteurs comme le mercaptoéthanol ou le dithiothréitol à plus forte concentration : 1 mM, inhibent l'activité malolactique, qui est restituée à 50% quand de l'acide L-malique est ajouté : l'acide malique protège l'enzyme de l'inhibition [Strasser de Saad *et al.*, 1985].

Effecteurs 0,1 mM (sauf *)	Lonvaud-Funel, 1986 <i>L. mesenteroides</i>	Strasser de Saad <i>et al.</i> , 1985 <i>L. murinus</i>	Chagnaud <i>et al.</i> , 1989 <i>Lactobacillus sp.</i>	Naouri <i>et al.</i> , 1990 <i>L. ænos</i>
	activité maximale (%)			
5-amino tétrazole			107	89
<i>N</i> -bromosuccinimide			22	31
diméthylamino-4benzaldéhyde			100	98
acide iminodiacétique			100	92
dithiothréitol (DTT) * $87 \cdot 10^{-3}$ mM * 1 mM	125	0	120	44
DTT (* 1 mM) + L-malate		45		
<i>N</i> -acétylacétone		-	100	
<i>N</i> -éthylmaléinimide			100	101
2,5-diméthoxytétrahydrofuran			98	
anhydride trifluoroacétique			103	
acide trifluoroacétique				91
acide éthylènediaminotétraacétique			0	0
acide <i>p</i> -chloromercuribenzoïque * $2,2 \cdot 10^{-3}$ mM	9,3		71	
acide <i>p</i> -chloromercuribenzoïque (* $2,2 \cdot 10^{-3}$ mM) + DTT (* $9 \cdot 10^{-3}$ mM)	111			
$\beta$ -mercaptoéthanol * 1 mM		0		
$\beta$ -mercaptoéthanol (* 1 mM) + L-malate		50		

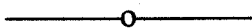
**Tableau 10** : Action de quelques effecteurs sur l'activité de l'enzyme malolactique.

Dans le cas de l'enzyme de *Lactobacillus sp.* [Chagnaud *et al.*, 1989] et de *L. ænos* [Naouri *et al.*, 1990], l'inhibition importante provoquée par le *N*-bromosuccinimide à 0,1 mM indique la présence de tryptophane, tyrosine et d'histidine dans le site actif.

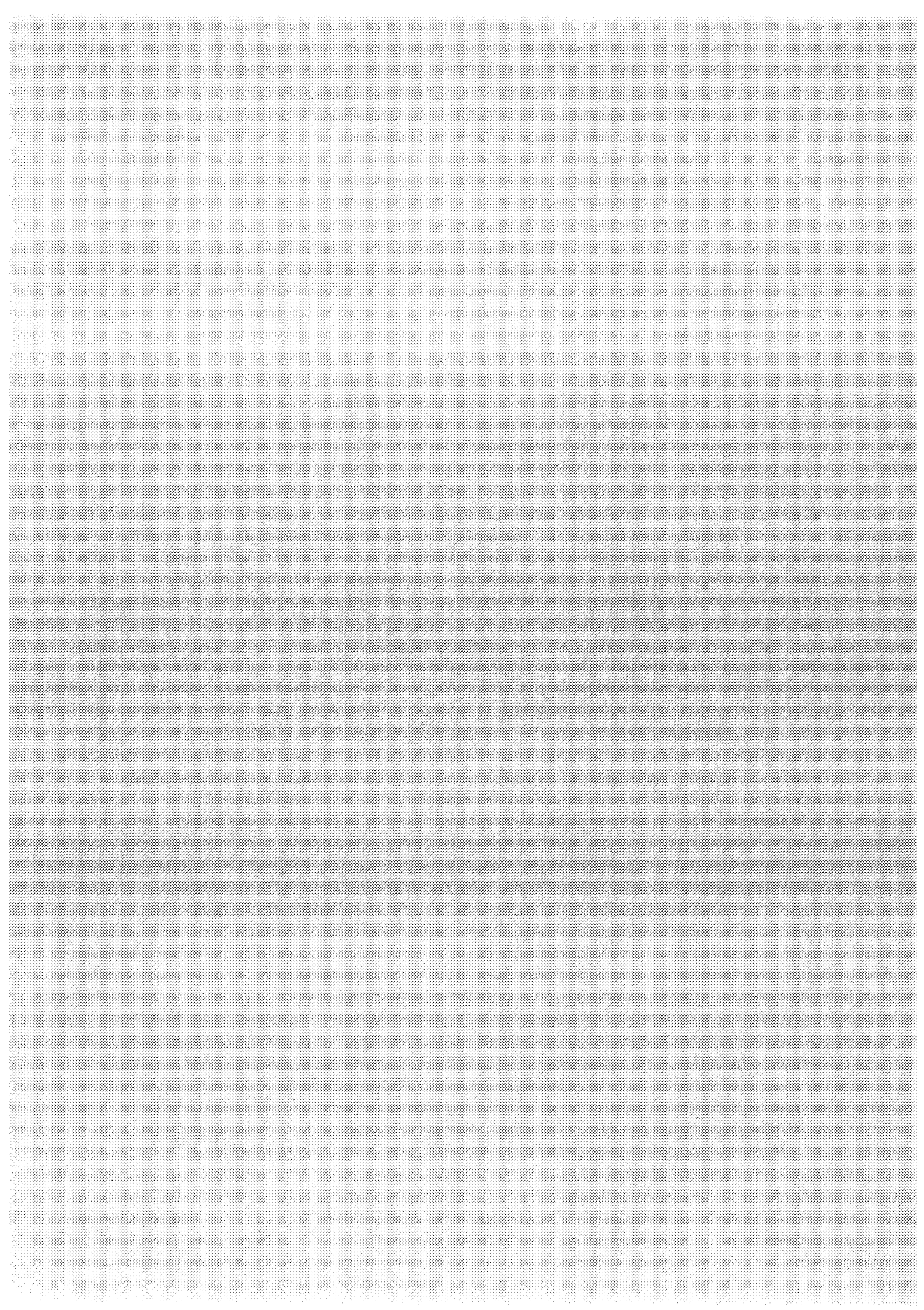
L'inhibition totale produite par l'EDTA à 0,1 mM est due à sa propriété de chélater les ions métalliques, en particulier les ions  $Mn^{++}$  nécessaires à la réaction.

Pour l'enzyme de *Lactobacillus* sp., l'action protectrice du dithiothréitol à 0,1 mM indique la présence de groupements SH de cystéines dans le site actif. L'inhibition par l'acide *p*-chloromercuribenzoïque et le mercure confirme cette hypothèse.

Pour l'enzyme de *L. ænos*, une forte inhibition est produite par l'action du dithiothréitol.



MATÉRIELS  
ET  
MÉTHODES



## I-PRODUCTION BACTÉRIENNE

### I-1 MICROORGANISME

#### I-1-1 Description de *Leuconostoc œnos*

La souche utilisée est *Leuconostoc œnos* 84-06. Elle a été isolée à l'Institut d'Œnologie de Bordeaux, par Lonvaud-Funel et Joyeux sur des moûts de raisins de Bordeaux. Elle a été retenue pour ses capacités exceptionnelles à conduire la fermentation malolactique des vins.

C'est un coque de 0,5 à 1 µm de diamètre, Gram positif, non mobile, ne formant pas de spores, anaérobie facultatif. En cours de croissance, les cellules se trouvent en paires, en tétrades ou en chaînes.

Il est catalase négatif, son métabolisme des hexoses est de type hétérofermentaire. Il fermente le glucose, le fructose, le ribose. Il ne fermente pas l'arabinose et le xylose. Il hydrolyse l'esculine.

Il n'est pas pathogène pour les plantes et les animaux.

Les souches sont conservées par repiquages en milieu MRS liquide, à 4°C.

#### I-1-2 Identification

L'identification des souches se fait sur des critères tels que la morphologie cellulaire, la réaction à la coloration de Gram, le caractère homo- ou hétérofermentaire du métabolisme du glucose, la forme stéréochimique de l'acide lactique issu du glucose et les réponses aux tests contenus dans les galeries API 50 CH. Dans ces galeries, seuls quelques tests sont intéressants pour la détermination de *L. œnos* :

- les tests de fermentation des pentoses : arabinose, ribose, xylose (4, 5, 6)
- les tests de fermentation des hexoses : glucose, fructose (11, 12)
- le test de fermentation du saccharose (31)
- le test d'hydrolyse de l'esculine (25).

La nature homo- ou hétérofermentaire de la dégradation du glucose est déterminée par le rapport des concentrations éthanol / acide lactique. La souche est hétérofermentaire si ce rapport est supérieur à 0,5.

Pour *L. œnos* 84-06, les dosages après utilisation du glucose donnent les résultats suivants :

acide D-lactique : 1,9 g/l	}	acide D-lactique / acide L-lactique = 6,55
acide L-lactique : 0,29 g/l		
éthanol		1,31 g/l
éthanol / acide lactique		0,6

## I-2 MILIEUX DE CULTURE DES BACTÉRIES

### I-2-1 Milieu d'isolement

L'isolement de *L. œnos* se fait selon la technique décrite par Lafon-Lafourcade et Joyeux [1979].

### I-2-2 Milieux d'identification

*L. œnos* se développe difficilement à un pH supérieur à 6, ce qui fait que les tests réalisés avec les galeries API 50 CH sur le milieu API 50 CHL à pH 7 donnent des résultats très faibles. Pour l'identification de *L. œnos*, le milieu API 50 CHL est remplacé par l'un des milieux suivants :

<u>milieu MRS basal pH 6</u>		<u>milieu MRS basal pH 4</u>	
extrait de levure	5 g	extrait de levure	5 g
acétate de sodium	5 g	acétate de sodium	5 g
citrate diammonique	2 g	citrate diammonique	2 g
phosphate dipotassique	2 g	phosphate dipotassique	2 g
sulfate de magnésium 7H <sub>2</sub> O	0,2 g	sulfate de magnésium 7H <sub>2</sub> O	0,2 g
sulfate de manganèse 4H <sub>2</sub> O	0,05 g	sulfate de manganèse 4H <sub>2</sub> O	0,05 g
tween 80	1 ml	tween 80	1 ml
pourpre de bromocrésol	0,17 g	bleu de bromophénol	0,17 g
eau distillée	1000 ml	eau distillée	1000 ml
pH 6		pH 4	
autoclavage 115°C 20 min		autoclavage 115°C 20 min	

### I-2-3 Milieux de culture

<u>milieu MRS modifié (MRS)</u> [De Man <i>et al.</i> , 1960]		<u>milieu acide à la tomate pour</u> <u><i>L. œnos</i> (ML)</u>	
nutrient broth	18 g	[ATCC]	
extrait de levure	4 g	peptone	10 g
glucose	20 g	extrait de levure	5 g
acétate de sodium	5 g	glucose	10 g
citrate diammonique	2 g	sulfate de magnésium 7H <sub>2</sub> O	0,2 g
phosphate dipotassique	2 g	sulfate de manganèse 4H <sub>2</sub> O	0,05 g
sulfate de magnésium 7H <sub>2</sub> O	0,2 g	jus de tomate	250 ml
sulfate de manganèse H <sub>2</sub> O	0,05 g	tween 80	1 ml
tween 80	1 ml	eau distillée	1000 ml
(pimaricine)	(0,025 g)	pH 4,8	
eau distillée	1000 ml	autoclavage 115°C 20 min	
pH 6,2			
autoclavage 115°C 20 min			

<p><u>milieu de Carr modifié (C)</u></p> <p>[Lonvaud-Funel 1986]</p> <table> <tr><td>casaminoacides</td><td>5 g</td></tr> <tr><td>extrait de levure</td><td>4 g</td></tr> <tr><td>glucose</td><td>5 g</td></tr> <tr><td>chlorure de potassium</td><td>0,45 g</td></tr> <tr><td>phosphate monopotassique</td><td>0,6 g</td></tr> <tr><td>chlorure de calcium 2H<sub>2</sub>O</td><td>0,13</td></tr> <tr><td>sulfate de magnésium 7H<sub>2</sub>O</td><td>0,13 g</td></tr> <tr><td>sulfate de manganèse H<sub>2</sub>O</td><td>0,003 g</td></tr> <tr><td>acide L-malique</td><td>5 g</td></tr> <tr><td>eau distillée</td><td>1000 ml</td></tr> </table> <p>pH 4,8 autoclavage 115°C 20 min</p>	casaminoacides	5 g	extrait de levure	4 g	glucose	5 g	chlorure de potassium	0,45 g	phosphate monopotassique	0,6 g	chlorure de calcium 2H <sub>2</sub> O	0,13	sulfate de magnésium 7H <sub>2</sub> O	0,13 g	sulfate de manganèse H <sub>2</sub> O	0,003 g	acide L-malique	5 g	eau distillée	1000 ml	<p><u>milieu de Carr modifié (CT)</u></p> <p>[Lonvaud-Funel 1986]</p> <table> <tr><td>casaminoacides</td><td>5 g</td></tr> <tr><td>extrait de levure</td><td>4 g</td></tr> <tr><td>glucose</td><td>5 g</td></tr> <tr><td>chlorure de potassium</td><td>0,45 g</td></tr> <tr><td>phosphate monopotassique</td><td>0,6 g</td></tr> <tr><td>chlorure de calcium 2H<sub>2</sub>O</td><td>0,13</td></tr> <tr><td>sulfate de magnésium 7H<sub>2</sub>O</td><td>0,13 g</td></tr> <tr><td>sulfate de manganèse H<sub>2</sub>O</td><td>0,003 g</td></tr> <tr><td>acide L-malique</td><td>5 g</td></tr> <tr><td>jus de tomate</td><td>10 ml</td></tr> <tr><td>eau distillée</td><td>1000 ml</td></tr> </table> <p>pH 4,8 autoclavage 115°C 20 min</p>	casaminoacides	5 g	extrait de levure	4 g	glucose	5 g	chlorure de potassium	0,45 g	phosphate monopotassique	0,6 g	chlorure de calcium 2H <sub>2</sub> O	0,13	sulfate de magnésium 7H <sub>2</sub> O	0,13 g	sulfate de manganèse H <sub>2</sub> O	0,003 g	acide L-malique	5 g	jus de tomate	10 ml	eau distillée	1000 ml						
casaminoacides	5 g																																																
extrait de levure	4 g																																																
glucose	5 g																																																
chlorure de potassium	0,45 g																																																
phosphate monopotassique	0,6 g																																																
chlorure de calcium 2H <sub>2</sub> O	0,13																																																
sulfate de magnésium 7H <sub>2</sub> O	0,13 g																																																
sulfate de manganèse H <sub>2</sub> O	0,003 g																																																
acide L-malique	5 g																																																
eau distillée	1000 ml																																																
casaminoacides	5 g																																																
extrait de levure	4 g																																																
glucose	5 g																																																
chlorure de potassium	0,45 g																																																
phosphate monopotassique	0,6 g																																																
chlorure de calcium 2H <sub>2</sub> O	0,13																																																
sulfate de magnésium 7H <sub>2</sub> O	0,13 g																																																
sulfate de manganèse H <sub>2</sub> O	0,003 g																																																
acide L-malique	5 g																																																
jus de tomate	10 ml																																																
eau distillée	1000 ml																																																
<p><u>milieu de Guilloux-Benatier (GB)</u></p> <p>[Guilloux-Benatier <i>et al.</i>, 1985]</p> <table> <tr><td>extrait de levure</td><td>5 g</td></tr> <tr><td>glucose</td><td>10 g</td></tr> <tr><td>acétate de sodium</td><td>5 g</td></tr> <tr><td>phosphate dipotassique</td><td>2 g</td></tr> <tr><td>sulfate de magnésium 7H<sub>2</sub>O</td><td>0,2 g</td></tr> <tr><td>sulfate de manganèse 4H<sub>2</sub>O</td><td>0,05 g</td></tr> <tr><td>acide L-malique</td><td>5 g</td></tr> <tr><td>eau distillée</td><td>1000 ml</td></tr> </table> <p>pH 4,5 autoclavage 115°C 20 min</p>	extrait de levure	5 g	glucose	10 g	acétate de sodium	5 g	phosphate dipotassique	2 g	sulfate de magnésium 7H <sub>2</sub> O	0,2 g	sulfate de manganèse 4H <sub>2</sub> O	0,05 g	acide L-malique	5 g	eau distillée	1000 ml	<p><u>Glucose yeast extract media (GY)</u></p> <p>[Mc Cord et Ryu, 1985]</p> <table> <tr><td>extrait de levure</td><td>10 g</td></tr> <tr><td>glucose</td><td>10 g</td></tr> <tr><td>phosphate monopotassique</td><td>0,68 g</td></tr> <tr><td>sulfate de magnésium 7H<sub>2</sub>O</td><td>0,57 g</td></tr> <tr><td>sulfate de manganèse H<sub>2</sub>O</td><td>0,12 g</td></tr> <tr><td>sulfate de fer 7H<sub>2</sub>O</td><td>0,03 g</td></tr> <tr><td>eau distillée</td><td>1000 ml</td></tr> </table> <p>pH 3,5 autoclavage 115°C 20 min</p>	extrait de levure	10 g	glucose	10 g	phosphate monopotassique	0,68 g	sulfate de magnésium 7H <sub>2</sub> O	0,57 g	sulfate de manganèse H <sub>2</sub> O	0,12 g	sulfate de fer 7H <sub>2</sub> O	0,03 g	eau distillée	1000 ml																		
extrait de levure	5 g																																																
glucose	10 g																																																
acétate de sodium	5 g																																																
phosphate dipotassique	2 g																																																
sulfate de magnésium 7H <sub>2</sub> O	0,2 g																																																
sulfate de manganèse 4H <sub>2</sub> O	0,05 g																																																
acide L-malique	5 g																																																
eau distillée	1000 ml																																																
extrait de levure	10 g																																																
glucose	10 g																																																
phosphate monopotassique	0,68 g																																																
sulfate de magnésium 7H <sub>2</sub> O	0,57 g																																																
sulfate de manganèse H <sub>2</sub> O	0,12 g																																																
sulfate de fer 7H <sub>2</sub> O	0,03 g																																																
eau distillée	1000 ml																																																
<p><u>milieu de base (MB)</u></p> <p>[Radler et Bröhl, 1984]</p> <table> <tr><td>Bio Trypcase</td><td>10 g</td></tr> <tr><td>extrait de levure</td><td>5 g</td></tr> <tr><td>glucose</td><td>5 g</td></tr> <tr><td>acétate de sodium</td><td>3 g</td></tr> <tr><td><b>citrate diammonique</b></td><td><b>1,8 g</b></td></tr> <tr><td>phosphate dipotassique</td><td>2 g</td></tr> <tr><td>sulfate de magnésium 7H<sub>2</sub>O</td><td>0,2 g</td></tr> <tr><td>sulfate de manganèse H<sub>2</sub>O</td><td>0,034 g</td></tr> <tr><td>sulfate de fer 7H<sub>2</sub>O</td><td>0,01 g</td></tr> <tr><td>tween 80</td><td>1 ml</td></tr> <tr><td>jus de tomate</td><td>30 ml</td></tr> <tr><td>eau distillée</td><td>1000 ml</td></tr> </table> <p>pH 6,2 autoclavage 115°C 20 min</p>	Bio Trypcase	10 g	extrait de levure	5 g	glucose	5 g	acétate de sodium	3 g	<b>citrate diammonique</b>	<b>1,8 g</b>	phosphate dipotassique	2 g	sulfate de magnésium 7H <sub>2</sub> O	0,2 g	sulfate de manganèse H <sub>2</sub> O	0,034 g	sulfate de fer 7H <sub>2</sub> O	0,01 g	tween 80	1 ml	jus de tomate	30 ml	eau distillée	1000 ml	<p><u>milieu acide (MA)</u></p> <p>[Radler et Bröhl, 1984]</p> <table> <tr><td>Bio Trypcase</td><td>10 g</td></tr> <tr><td>extrait de levure</td><td>5 g</td></tr> <tr><td><b>glucose</b></td><td><b>20 g</b></td></tr> <tr><td>acétate de sodium</td><td>3 g</td></tr> <tr><td>phosphate dipotassique</td><td>2 g</td></tr> <tr><td>sulfate de magnésium 7H<sub>2</sub>O</td><td>0,2 g</td></tr> <tr><td>sulfate de manganèse H<sub>2</sub>O</td><td>0,034 g</td></tr> <tr><td>sulfate de fer 7H<sub>2</sub>O</td><td>0,01 g</td></tr> <tr><td>tween 80</td><td>1 ml</td></tr> <tr><td>jus de tomate</td><td>30 ml</td></tr> <tr><td><b>acide L-malique</b></td><td><b>5 g</b></td></tr> <tr><td>eau distillée</td><td>1000 ml</td></tr> </table> <p>pH 4,6 autoclavage 115°C 20 min</p> <p><u>milieu acide 1 (MA1)</u> : sans jus de tomate</p>	Bio Trypcase	10 g	extrait de levure	5 g	<b>glucose</b>	<b>20 g</b>	acétate de sodium	3 g	phosphate dipotassique	2 g	sulfate de magnésium 7H <sub>2</sub> O	0,2 g	sulfate de manganèse H <sub>2</sub> O	0,034 g	sulfate de fer 7H <sub>2</sub> O	0,01 g	tween 80	1 ml	jus de tomate	30 ml	<b>acide L-malique</b>	<b>5 g</b>	eau distillée	1000 ml
Bio Trypcase	10 g																																																
extrait de levure	5 g																																																
glucose	5 g																																																
acétate de sodium	3 g																																																
<b>citrate diammonique</b>	<b>1,8 g</b>																																																
phosphate dipotassique	2 g																																																
sulfate de magnésium 7H <sub>2</sub> O	0,2 g																																																
sulfate de manganèse H <sub>2</sub> O	0,034 g																																																
sulfate de fer 7H <sub>2</sub> O	0,01 g																																																
tween 80	1 ml																																																
jus de tomate	30 ml																																																
eau distillée	1000 ml																																																
Bio Trypcase	10 g																																																
extrait de levure	5 g																																																
<b>glucose</b>	<b>20 g</b>																																																
acétate de sodium	3 g																																																
phosphate dipotassique	2 g																																																
sulfate de magnésium 7H <sub>2</sub> O	0,2 g																																																
sulfate de manganèse H <sub>2</sub> O	0,034 g																																																
sulfate de fer 7H <sub>2</sub> O	0,01 g																																																
tween 80	1 ml																																																
jus de tomate	30 ml																																																
<b>acide L-malique</b>	<b>5 g</b>																																																
eau distillée	1000 ml																																																



Le jus de tomate est ajouté au milieu, car il contient un dérivé glucopyranosique de l'acide pantothénique, probablement l'acide 4'-o-( $\beta$ -glucopyranosyl)D-pantothénique, qui est nécessaire au développement de *L. œnos* [Garvie, 1986].

Le jus de tomate en pack (Casino) est centrifugé à 2 000 g pendant 10 minutes. Le surnageant est dilué 4 fois et filtré (filtres Millipore 8  $\mu$ m, 0,8  $\mu$ m, 0,45  $\mu$ m, 0,22  $\mu$ m).

### I-3 TECHNIQUES DE CULTURE

La souche a été fournie par l'Institut d'Enologie de Bordeaux, en boîte de Pétri sur le milieu décrit par Lafon-Lafourcade et Joyeux [1979]. Elle a été repiquée sur 10 ml de milieu de Carr en tubes, puis sur 100 ml en fioles erlenmeyer.

L'étude du choix du milieu de culture a été faite sur 100 ml de chacun des milieux testés, en fioles erlenmeyer. Les différents milieux ont étéensemencés à 10% à partir de la culture sur milieu de Carr.

Pour la suite, le protocole suivant a été utilisé :

	Préculture sur milieu de base MB	Culture sur milieu acide MA
Étude du milieu de culture	fiole erlenmeyer 100 ml	fiole erlenmeyer 1 litre
Production d'enzyme	fiole erlenmeyer 1 litre	fermenteur 10 litres

Tableau 12 : Techniques de culture selon les différents types d'expériences.

#### I-3-1 Conservation de la souche

La souche est cultivée sur milieu liquide MRS modifié, à 28°C et sans agitation jusqu'en fin de phase exponentielle de croissance, c'est-à-dire au bout de 2 à 4 jours. Elle est alors conservée à 4°C et repiquée tous les 4 à 6 mois.

#### I-3-2 Préculture

La préculture est effectuée sur milieu de base de Radler et Bröhl [1984] etensemencée à 10% avec une culture sur milieu MRS conservée à 4°C. L'incubation se fait à 28°C sans agitation, jusqu'en milieu de phase exponentielle de croissance, c'est-à-dire pendant 24 à 48 heures.

Lorsque la culture sur milieu MRS qui a servi à l'ensemencement a été repiquée récemment, le redémarrage de la préculture est immédiat. Lorsque la culture sur milieu MRS est à 4°C depuis plusieurs semaines, le redémarrage peut être plus long : de 1 à 3 jours.

#### I-3-3 Culture

La culture est faite sur milieu acide de Radler et Bröhl [1984] etensemencée à 10% avec la préculture. L'incubation se fait à 28°C, jusqu'aux 2/3 de la phase exponentielle de croissance, c'est-à-dire pendant 60 à 65 heures.

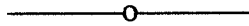
---

Les cultures en fioles erlenmeyer de un litre ne sont pas agitées. En fermenteur de dix litres, l'agitation est mise au minimum pour que les bactéries ne sédimentent pas.

La croissance des bactéries est suivie au spectrophotomètre par turbidimétrie à 650 nm contre le milieu de culture filtré à 0,22  $\mu\text{m}$ .

#### **I-4 DÉNOMBREMENT DES BACTÉRIES**

L'estimation des populations de *L. ænos* en culture pure est effectuée par comptage des bactéries en cellules de Mallassez.



## II-EXTRACTION ET PURIFICATION DE L'ENZYME MALOLACTIQUE

### II-1 PROTOCOLE GÉNÉRAL

Le protocole utilisé s'inspire de celui décrit par Lonvaud-Funel [1986] pour la purification de l'enzyme malolactique de *L. ænos*, avec quelques modifications.

Après culture sur milieu acide, les bactéries sont concentrées par filtration tangentielle dans un ultrafiltre à fibres creuses, puis lavées avec du NaCl 7‰. L'enzyme malolactique est extraite après une lyse des bactéries par ultrasons. L'extrait enzymatique brut est soumis à l'action de la DNase I qui hydrolyse les acides nucléiques. Une partie des protéines de l'extrait est précipitée par le sulfate d'ammonium à 35%, l'enzyme malolactique est précipitée au sulfate d'ammonium à 70%. L'enzyme est remise en suspension dans du tampon phosphate et purifiée par filtration sur une colonne d'Ultrogel AcA 34 (IBF). Les fractions contenant l'enzyme sont réunies puis concentrées par ultrafiltration à l'aide d'un immersible CX 30 (Millipore). L'enzyme partiellement purifiée est conservée à -20°C. C'est cette préparation enzymatique qui est utilisée pour l'étude de l'enzyme elle-même ainsi que pour la fabrication des différents réacteurs.

Les différentes étapes sont résumées dans le Schéma 2.

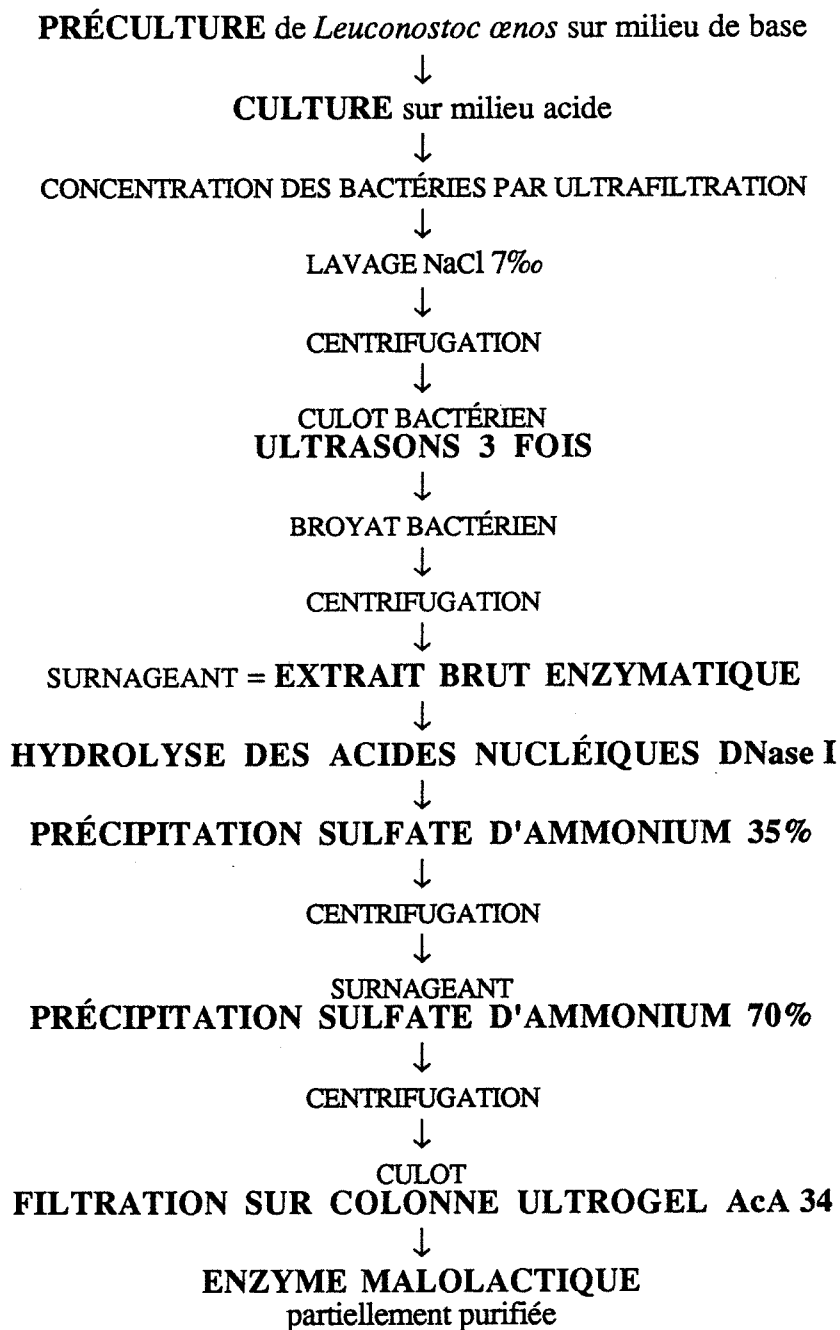
Une purification plus poussée a été nécessaire dans certains cas, et l'enzyme a été soumise soit à une chromatographie d'affinité sur AGNAD Type 3 (Pharmacia), soit à une chromatographie d'échange d'ions sur Q Sepharose Fast Flow (Pharmacia).

A chaque étape une aliquote est prélevée pour la détermination des activités enzymatiques (enzyme malolactique et lactate-déshydrogénase essentiellement) et le dosage des protéines. La pureté de l'enzyme est suivie par électrophorèse.

Toutes les différentes techniques utilisées sont détaillées dans les paragraphes suivants.

### II-2 RÉCUPÉRATION DES CELLULES

En fin de croissance, les cultures en fioles erlenmeyer sont centrifugées à 10 000 g, à 4°C pendant 10 minutes. Les bactéries recueillies dans le culot sont lavées deux fois avec du NaCl 7‰, puis remises en suspension dans du tampon phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ ) 0,1 M, pH 6.



**Schéma 2** : Production de l'enzyme malolactique de *L. oenos*.

Les cultures en fermenteur sont concentrées par filtration tangentielle à l'intérieur d'un ultrafiltre à fibres creuses (seuil de coupure : 30 000) jusqu'à un volume de 750 ml. Les bactéries sont alors lavées avec 20 litres de NaCl 7‰ par le même procédé. Elles sont ensuite centrifugées à 10 000 g, à 4°C pendant 10 minutes. Le culot bactérien est remis en suspension dans du tampon phosphate 0,1 M, pH 6.

### **II-3 EXTRACTION DE L'ENZYME MALOLACTIQUE**

La suspension bactérienne est soumise aux ultrasons pendant 15 minutes avec des impulsions d'une demi-seconde toutes les secondes, à puissance maximale (environ 270 W). Cette opération génère beaucoup de chaleur, c'est pourquoi la suspension est maintenue à 4°C dans de la glace. L'appareil utilisé est un sonificateur Vibra-Cell 300 W, (Bioblock) avec une sonde de 13 mm de diamètre.

L'extrait brut est recueilli dans le surnageant, après centrifugation à 40 000 g, à 4°C, pendant 20 minutes. Le culot de débris bactériens est remis en suspension dans du tampon phosphate 0,1 M, pH 6, et soumis de nouveau aux ultrasons. L'opération est renouvelée une troisième fois. Les trois surnageants sont réunis et forment l'extrait brut enzymatique.

### **II-4 PURIFICATION DE L'ENZYME MALOLACTIQUE**

#### **II-4-1 Élimination des principaux contaminants**

Après passage aux ultrasons, l'extrait visqueux du fait de la présence d'acides nucléiques est soumis à l'action de la DNase I (1 mg/ml d'extrait) à température ambiante pendant 20 minutes.

A partir de maintenant, toutes les étapes de purification se font à 4°C.

Une partie des contaminants est précipitée au sulfate d'ammonium à 35% pendant 15 minutes. Ce précipité est éliminé par centrifugation à 20 000 g pendant 20 minutes.

Le surnageant obtenu contient l'enzyme malolactique qui est précipitée au sulfate d'ammonium à 70% pendant 20 minutes, et récupérée après centrifugation à 20 000 g pendant 20 minutes, dans le culot.

Ce culot est remis en suspension dans un minimum de tampon phosphate 0,1 M, pH 6, et conservé à 4°C si la purification suit rapidement, ou à -20°C si la purification est différée de quelques jours.

#### **II-4-2 Techniques chromatographiques**

##### **II-4-2-1 Appareillage**

Le tampon est aspiré par une pompe péristaltique (P-1 Pharmacia), à partir d'un réservoir de tampon vers le sommet de la colonne.

En sortie de colonne les produits passent dans un détecteur UV (UV-1 Pharmacia) ayant un filtre à 280 nm, maximum d'absorption des protéines, puis sont récupérés par un collecteur de fractions (Gilson). Le détecteur UV et le collecteur de fractions sont reliés à un enregistreur (Linear).

Pour la chromatographie d'échange d'ions, après le détecteur UV, les produits passent à l'intérieur d'une cellule de conductimétrie (Spectrum), ce qui permet de suivre la concentration en sels. Ce conductimètre est relié à un enregistreur.

Les échantillons sont injectés dans la colonne par une boucle d'injection se trouvant entre la pompe et le sommet de la colonne.

#### II-4-2-2 Caractéristiques des colonnes

Des colonnes de chromatographie Pharmacia ont été utilisées pour les différents types de chromatographie, et leurs caractéristiques sont les suivantes :

Technique	Colonne	Gel	Hauteur de gel	Diamètre	Volume total	Débit appliqué
<u>Chromatographie de filtration sur gel</u>	K16/70	Ultrogel AcA 34	60,7 cm	1,6 cm	122 ml	18,6 ml/h
	C 26/100	Ultrogel AcA 34	98 cm	2,6 cm	520 ml	21 ml/h
	C 16/70	Fractogel TSK HW-55 (F)	68 cm	1,6 cm	137 ml	30 ml/h
<u>Chromatographie d'affinité</u>	K 16/20	AGNAD Type 3	8 cm	1,6 cm	16 ml	24 ml/h
<u>Chromatographie d'échange d'ions</u>	C 26/40	Q Sepharose Fast Flow	38 cm	2,6 cm	202 ml	83 ml/h

Tableau 13 : Caractéristiques des colonnes de chromatographie utilisées.

Des adaptateurs (type A 16) sont appliqués au sommet de certaines colonnes pour limiter la hauteur du gel et protéger sa surface.

#### II-4-2-3 Chromatographie de filtration sur gel

##### II-4-2-3-1 *Principe*

Le gel est constitué de billes poreuses. Les molécules de taille supérieure à la taille des pores sont éluées immédiatement alors que les plus petites molécules pénètrent à l'intérieur des pores et sont éluées dans l'ordre des masses moléculaires décroissantes.

##### II-4-2-3-2 *Caractéristiques des gels*

- Chromatographie sur Ultrogel AcA 34

Le gel Ultrogel AcA 34 est composé de 3% d'acrylamide et de 4% d'agarose. Sa zone de fractionnement linéaire pour des protéines globulaires se situe entre 20 000 et 350 000 daltons. Sa limite d'exclusion est à 750 000 daltons.

•Chromatographie sur Fractogel TSK HW-55 (F)

Fractogel TSK est un gel semi-rigide formé par copolymérisation d'oligoéthylèneglycol, de glycidylméthacrylate et de pentaérythrol-diméthacrylate. Sa zone de fractionnement linéaire pour des protéines globulaires se situe entre 1 000 et 1 000 000 daltons.

*II-4-2-3-3 Conditions opératoires*

Le tampon d'élution est du tampon phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  -  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 0,02 M, KCl 0,1 M, pH 6, filtré et dégazé.

II-4-2-4 Chromatographie d'affinité

*II-4-2-4-1 Principe*

La chromatographie d'affinité est un type de chromatographie d'adsorption dans lequel la molécule à purifier est adsorbée spécifiquement et de façon réversible à une substance complémentaire liante, le ligand, qui est attaché par liaison covalente à un support insoluble. L'échantillon contenant le produit intéressant est appliqué dans des conditions qui favorisent sa liaison spécifique avec le ligand immobilisé. Les substances non liées sont éluées, la substance recherchée est obtenue en modifiant les conditions expérimentales de façon à favoriser sa désorption.

*II-4-2-4-2 Caractéristiques du gel*

AGNAD Type 3 est un gel d'agarose sur lequel du NAD a été fixé par l'intermédiaire d'un bras d'hexane ( [Sepharose 4B]-NH-( $\text{CH}_2$ )<sub>6</sub>-NH-C<sup>8</sup>-NAD ).

Les molécules ayant une affinité pour le NAD seront retenues, en particulier les déshydrogénases. Dans notre cas, la LDH, qui a plus d'affinité pour le NAD que l'enzyme malolactique, est retenue par le NAD sur le gel. L'enzyme malolactique est éluée au volume mort du gel et la LDH est ensuite désorbée par addition de NAD au tampon d'élution.

*II-4-2-4-3 Conditions opératoires*

Le tampon d'élution est du tampon phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  -  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 0,02 M, KCl 0,1 M, pH 6, filtré et dégazé.

Le tampon de désorption est du tampon phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  -  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 0,02 M, KCl 0,1 M, NAD 2 mM, pH 6, filtré et dégazé.

## II-4-2-5 Chromatographie d'échange d'ions

### *II-4-2-5-1 Principe*

Un échangeur d'ions est composé d'une matrice insoluble sur laquelle des groupements chargés ont été fixés de façon covalente. Ces groupements chargés sont associés à des contre-ions mobiles. Un échangeur chargé positivement a des contre-ions chargés négativement (anions) ; c'est un échangeur d'anions. Un échangeur chargé négativement a des contre-ions chargés positivement (cations) ; c'est un échangeur de cations.

En chromatographie d'échange d'ions, la séparation est obtenue par adsorption réversible. Dans un premier temps, l'échantillon est adsorbé par interactions ioniques et les substances non liées sont éluées par un volume de colonne de tampon de départ. Dans un second temps, les substances sont éluées de la colonne en fonction de leur affinité pour l'échangeur d'ions, due à leur différence de charge. Ces affinités peuvent être contrôlées en faisant varier les conditions de force ionique ou de pH.

### *II-4-2-5-2 Caractéristiques du gel*

Q Sepharose Fast Flow est un échangeur d'anions fort formé d'une matrice d'agarose substituée par des amines quaternaires.

### *II-4-2-5-3 Conditions opératoires*

Le tampon de départ est du tampon phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 0,02 M, NaCl 0,1 M, pH 6, filtré et dégazé.  $\text{Cl}^-$  joue le rôle de contre-ion.

Le tampon final est du tampon phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 0,02 M, NaCl 0,35 M, pH 6, filtré et dégazé.

La colonne est éluée par 100 ml de tampon de départ, puis un gradient est formé sur 500 ml de tampon de 0,1 M à 0,35 M en NaCl. L'éluution se termine par 100 ml de tampon final.

## **II-4-3 Concentration et dialyse des extraits**

Pour des volumes inférieurs à 1 ml, les extraits sont concentrés à l'aide d'unités Ultrafree-MC 10 000 ou 30 000 (Millipore). Ces unités sont composées de deux compartiments séparés par une membrane d'ultrafiltration de seuil de coupure (poids moléculaire nominal limite PMNL) 10 000 ou 30 000. L'échantillon est déposé dans la partie supérieure, et centrifugé à 3 000 g, à 4°C, pendant 10, 20 ou 30 minutes selon les cas. L'échantillon concentré est récupéré dans la partie supérieure du tube.

Pour des volumes de 1 à 100 ml, les extraits sont concentrés à l'aide d'ultrafiltres Immersibles CX 30 (Millipore). Ces Immersibles sont constitués d'un noyau de polyéthylène recouvert d'une membrane d'ultrafiltration de seuil de coupure 30 000.



L'Immersible est plongé dans la solution à traiter et est raccordé à une source de vide. Le filtrat passe de l'extérieur vers le centre de l'unité en traversant la membrane, puis s'écoule vers un réservoir piège. Les molécules retenues restent dans le récipient de départ. Les Immersibles sont reliés à un agitateur Immersible CX (Millipore), ce qui accélère la concentration.

Les unités Ultrafree MC et Immersible CX sont aussi utilisées pour le dessalage. Après concentration, l'échantillon est dilué avec le tampon adéquat et de nouveau concentré, ceci deux ou trois fois de suite.

## II-4-4 Techniques électrophorétiques

### II-4-4-1 Appareillage

L'appareillage utilisé est constitué d'une "minute cuve" (HSI) verticale recevant deux gels, reliée à un générateur Bio-50W (Genofit).

La cuve d'électrophorèse est réfrigérée par circulation d'eau à 4°C.

### II-4-4-2 Conditions d'électrophorèse

L'électrophorèse est réalisée dans un gel de séparation à 3,5%, de 10 cm de long, 8 cm de large, 0,075 cm d'épaisseur, et de composition suivante :

- Acrylamide-Bisacrylamide (22,2 : 0,6 )..... 1,89 ml
- Eau distillée ..... 3,51 ml
- Tampon Tris-glycine 0,2 M, pH 8,9..... 6 ml
- Persulfate d'ammonium à 0,15%..... 0,58 ml
- TEMED.....0,018 ml

Le tampon d'électrophorèse est du tampon Tris-glycine 0,1 M pH 8,9.

Les échantillons (0,125 ml) sont ajoutés dans la solution suivante (5 µl):

- Tampon Tris-glycine 0,05 M, pH 8,9
- Bleu de bromophénol à 0,25%
- Sucrose 40%

Avant de déposer 20 µl de chaque échantillon, une pré-électrophorèse est effectuée pendant 30 minutes, à courant constant (25 mA par gel).

La migration est effectuée à courant constant (25 mA par gel) jusqu'à ce que l'indicateur coloré ait atteint le bas du gel, c'est-à-dire au bout d'environ 45 minutes.

### II-4-4-3 Colorations

Après migration, les gels sont fixés et les bandes protéiques sont révélées selon les techniques suivantes en fonction de la sensibilité recherchée.

Les gels sont déposés dans des boîtes de coloration en pyrex, nettoyées au préalable par de l'acide nitrique pur et rincées à l'eau distillée. Les étapes de coloration se font sous agitation, sauf lors du passage sur le négatoscope.

Coloration au bleu de Coomassie :

Traitement	Durée du traitement
Fixation : Méthanol 50% - Acide acétique 15%	12 h
Rinçages eau distillée	3 x 30 min
Coloration : Méthanol 45% - Acide acétique 10% - Bleu de Coomassie 0,25%	15 min
Décoloration : Éthanol 25% - Acide acétique 10%	3 x 15 min

Lorsqu'une sensibilité plus grande est recherchée, les gels sont colorés en utilisant le kit Gelcode (Pierce) :

Traitement	Durée du traitement
Fixation : Éthanol 50% - Acide acétique 5%	12 h
Rinçages eau distillée	4 x 30 min
Solution de nitrate d'argent	30 min
Rinçage eau distillée	5 - 10 s
Solution réductrice	3 - 5 min
Fixateur	3 x 30 min

La technique de Ansorge [1985] est utilisée pour une sensibilité de l'ordre du nanogramme :

Traitement	Durée du traitement
Fixation : Méthanol 50% - Acide trichloracétique 12% - Chlorure de cuivre (II) 2%	15min
Éthanol 10% - Acide acétique 5%	7,5 min
Oxydation : Permanganate de potassium 0,01%	7,5 min
Éthanol 10% - Acide acétique 5%	7,5 min
Éthanol 10%	7,5 min
Rinçage eau distillée	7,5 min
Coloration : Nitrate d'argent 0,2%	7,5 min, puis 7,5 min sur le négatoscope
Rinçage eau bi-distillée	15 s, puis 45 s
Révélation : Formaldéhyde 0,05% - Carbonate de sodium 3%	3 min
Éthanol 10% - Acide acétique 5%	15 s

## II-4-5 Électrofocalisation

### II-4-5-1 Appareillage

L'appareil utilisé est le Rotofor™ Preparative IEF Cell (BIO-RAD). Le générateur est le Model 3000xi Computer Controlled Electrophoresis Power Supply (BIO-RAD).

Ces appareils ont été prêtés gracieusement par la société BIO-RAD.

La cellule d'électrofocalisation est réfrigérée par circulation d'eau à 4°C.

### II-4-5-2 Principe

La séparation des protéines dans la cellule du Rotofor se fait selon un gradient de pH en solution libre qui est formé dans une chambre de focalisation horizontale et annulaire. Quand le courant est appliqué dans la chambre de focalisation, les protéines migrent vers leur point isoélectrique ( $pI$ ), formant des anneaux parallèles de protéine.

La chambre de focalisation est séparée en 20 compartiments par des membranes de polyester. Ces membranes stabilisent le gradient de pH, tout en permettant aux protéines de migrer vers leur  $pI$ . Les 20 compartiments sont collectés simultanément dans 20 tubes à hémolyse, à la fin de la migration.

### II-4-5-3 Conditions d'électrofocalisation

Le gradient de pH est établi par des ampholytes ( $pI$  de 4 à 6, BIO-RAD), petites molécules chargées, qui sont mélangées à l'échantillon dans les proportions suivantes :

- enzyme diluée dans du tampon phosphate 0,002 M, pH 6 : 43 ml,
- ampholytes à 40% : 2,2 ml.

Une membrane échangeuse de cations est déposée à l'anode (Figure 1). Cette membrane est chargée négativement et repousse les ions négatifs, ce qui les empêche de contaminer l'électrolyte contenu dans la chambre d'anode : acide phosphorique 0,1 M.

Une membrane échangeuse d'anions est déposée à la cathode. Elle est chargée positivement et repousse les ions positifs. La chambre de cathode est remplie de soude 0,1 M.

Ces membranes sont utilisées dans la cellule du Rotofor pour séparer l'échantillon des électrolytes, tout en laissant passer le courant et établir le gradient de pH.

Une pré-migration est effectuée avec de l'eau distillée dans la chambre de focalisation, à faible puissance (< 5 W) pendant 5 minutes. L'eau distillée est ensuite remplacée par le mélange échantillon-ampholytes, et la migration commence à puissance constante de 12 W. Elle dure environ 5 heures. La chambre de focalisation est en rotation pendant la migration.

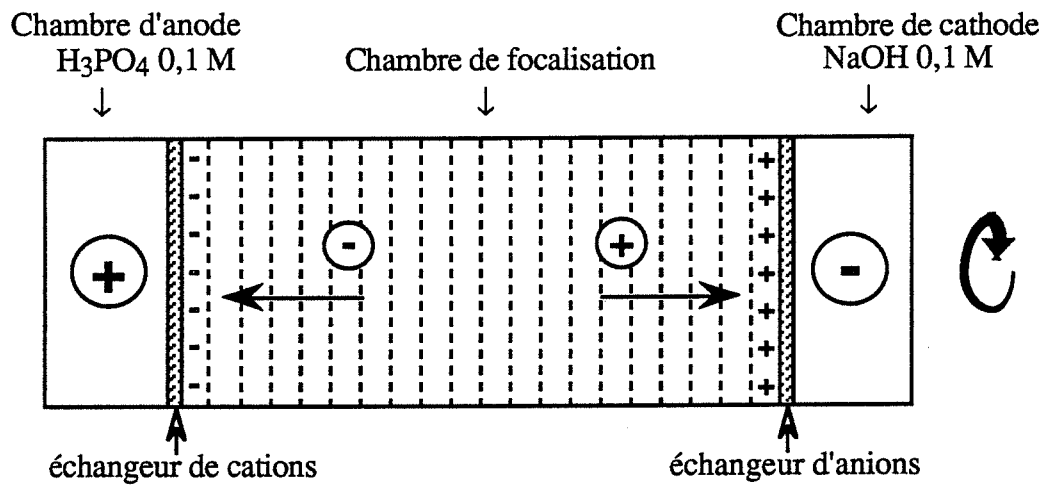
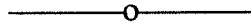


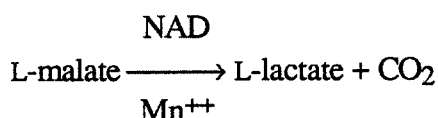
Figure 1 : Principe du Rotofor.



### III-MESURE DES ACTIVITÉS ENZYMATIQUES

#### III-1 ACTIVITÉ MALOLACTIQUE

L'enzyme malolactique catalyse la réaction suivante :



Son activité peut être déterminée de différentes façons, soit par la mesure de la vitesse de disparition du malate, soit par la mesure de la vitesse d'apparition du lactate ou soit par la mesure de la vitesse de formation du CO<sub>2</sub>.

Chagnaud *et al.* [1989] et Naouri *et al.* [1990] suivent simultanément les vitesses de disparition du malate et d'apparition du lactate en dosant les acides malique et lactique au cours du temps, à l'aide des kits Boehringer.

La mesure la plus couramment utilisée est celle du dégagement de CO<sub>2</sub>.

Cette mesure peut être obtenue par des méthodes manométriques appliquées soit dans l'appareil de Warburg [Korkes *et al.*, 1950 ; Divies et Siess, 1976 ; Caspritz et Radler, 1983 ; Cavin *et al.*, 1989] soit dans le respiromètre différentiel de Gilson [Strasser de Saad *et al.*, 1984].

La vitesse de formation du CO<sub>2</sub> peut aussi être suivie à l'aide d'une électrode spécifique au gaz carbonique. Cette technique est destinée en général à la détermination de la pression partielle de CO<sub>2</sub> sanguin. Lonvaud *et al.* [1973] l'ont adaptée à la mesure d'activité de l'enzyme malolactique avec un analyseur de gaz Eschweiler. Par la suite, ce procédé s'est répandu, utilisant d'autres types d'électrodes [Mc Cord et Ryu, 1985] telles que celle d'Orion [Spettoli *et al.*, 1984], celle d'Ingold [Salmon, 1987] ou celle de Radiometer [Renault et Heslot, 1987].

Nous avons utilisé le système Radiometer.

##### III-1-1 Principe

L'électrode à pCO<sub>2</sub> est basée sur le principe de Severinghaus [1968]. C'est une électrode de pH combinée, qui plonge dans une solution de bicarbonate, séparée de la solution à mesurer par une membrane perméable aux gaz.

Le CO<sub>2</sub> gazeux dégagé par la réaction diffuse à travers la membrane dans la solution d'électrolyte dont la valeur du pH est modifiée, jusqu'à ce que règne la même pression partielle de CO<sub>2</sub> de part et d'autre de la membrane.

Le CO<sub>2</sub> gazeux qui pénètre ainsi par diffusion réagit avec l'eau de l'électrolyte selon l'équation suivante :



$$\frac{[\text{H}^+][\text{HCO}_3^-]}{[\text{CO}_2]} = K_s$$

Selon la loi de Henry, la concentration de gaz carbonique en solution est directement proportionnelle à la pression partielle de gaz carbonique dans toute la solution :

$$[\text{CO}_2] = \alpha p\text{CO}_2$$

A partir de ces équations, la relation suivante est obtenue :

$$\log(p\text{CO}_2) = -\text{pH} + \log[\text{HCO}_3^-] + pK_s - \log\alpha$$

Elle montre que le pH d'une solution de bicarbonate dépend linéairement du  $\log(p\text{CO}_2)$  quand l'équilibre est établi, si le bicarbonate reste à saturation.

### III-1-2 Appareillage

L'électrode D616 / E 5036  $\text{PCO}_2$  (Radiometer) est reliée à un pH-mètre, le PHM73 pH/Blood Gaz Monitor (Radiometer). La  $p\text{CO}_2$  est directement lue sur l'appareil, et peut être enregistrée.

Une cellule de mesure a été fabriquée sur le modèle de celle de l'analyseur de gaz Eschweiller de l'Institut d'Enologie de Bordeaux. Cette cellule renferme un barreau aimanté et se trouve sur un agitateur magnétique, ce qui permet l'homogénéisation du milieu lors de la mesure. Elle est thermostatée à 25°C précisément par un système de circulation d'eau. La cellule a un volume de 2,5333 ml.

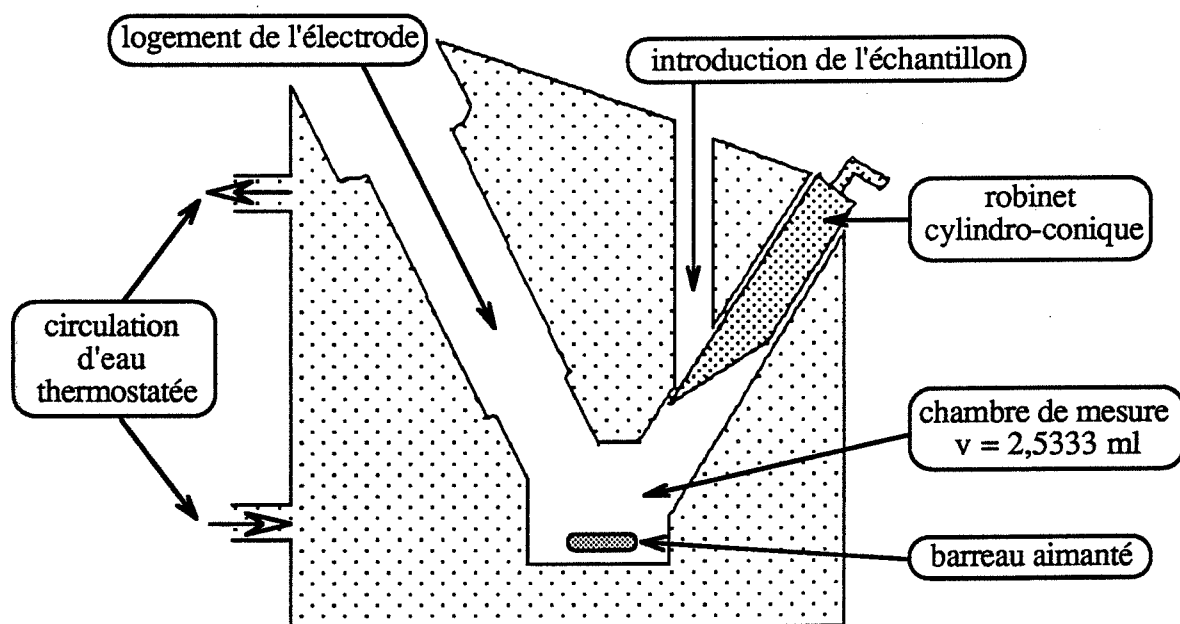


Figure 2 : Cellule de mesure de la  $p\text{CO}_2$ .

L'électrolyte fourni par Radiometer contient 0,005 M de NaHCO<sub>3</sub> et 0,02 M de NaCl. De l'anhydrase carbonique est ajoutée à 1 mg/ml pour accélérer la formation de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

L'osmolarité de cet électrolyte (50 mOsM) est adaptée à l'osmolarité du sang. Il faut donc l'adapter à l'osmolarité de notre milieu de mesure (123 mOsM) en rajoutant 2,13 g/l de NaCl.

### III-1-3 Mode opératoire

L'étalonnage de l'électrode se fait à l'aide de deux gaz étalons formés d'un mélange binaire d'azote et de gaz carbonique, pour le gaz faible 2,7% de gaz carbonique dans l'azote, pour le gaz fort 5,4% de gaz carbonique dans l'azote. Ces mélanges gazeux dont le débit est faible et régulier doivent être humidifiés au préalable afin de ne pas déshydrater l'électrode et de ce fait modifier la composition de l'électrolyte intermédiaire.

La pCO<sub>2</sub> correspondant à chacun des deux mélanges gazeux est calculée à chaque étalonnage en fonction de la pression barométrique de la pièce avec la formule suivante :

$$pCO_2 = \frac{(pB - pH_2O) \times \% \text{gaz}}{100}$$

- pCO<sub>2</sub> : pression partielle de CO<sub>2</sub> en mm Hg
- pB : pression barométrique en mm Hg
- pH<sub>2</sub>O : pression de vapeur saturante de l'eau à 25°C = 23,76 mm Hg

Pression barométrique pB (mm Hg)	pCO <sub>2</sub> (mm Hg) 2,7% CO <sub>2</sub>	pCO <sub>2</sub> (mm Hg) 5,4% CO <sub>2</sub>	Pression barométrique pB (mm Hg)	pCO <sub>2</sub> (mm Hg) 2,7% CO <sub>2</sub>	pCO <sub>2</sub> (mm Hg) 5,4% CO <sub>2</sub>
698	18,20	36,41	714	18,64	37,27
696	18,23	36,46	715	18,66	37,33
700	18,25	36,52	716	18,69	37,38
701	18,28	36,57	717	18,72	37,43
702	18,31	36,62	718	18,74	37,49
703	18,34	36,68	719	18,77	37,54
704	18,37	36,73	720	18,79	37,60
705	18,39	36,79	721	18,82	37,65
706	18,42	36,84	722	18,85	37,70
707	18,45	36,89	723	18,88	37,76
708	18,47	36,95	724	18,91	37,81
709	18,50	37,00	725	18,93	37,87
710	18,53	37,06	726	18,96	37,92
711	18,56	37,11	727	18,99	37,97
712	18,58	37,17	728	19,01	38,03
713	18,61	37,22	729	19,04	38,08

**Tableau 14** : Valeurs en pCO<sub>2</sub> à 25°C des gaz utilisés pour l'étalonnage en fonction de la pression barométrique.

La mesure de l'activité malolactique des extraits enzymatiques se fait dans le milieu suivant :

- L-malate.....22 mM
- NAD..... 0,45 mM
- MnCl<sub>2</sub>..... 0,09 mM
- Tampon phosphate (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) pH 6.....0,05 M

La mesure de l'activité malolactique des bactéries entières se fait dans le même milieu, mais le pH est fixé à 3 -3,3 : zone d'activité maximale. Le NAD n'est pas indispensable car la concentration intracellulaire est optimale [Lonvaud-Funel 1986].

### III-1-4 Calcul

La réaction commence par l'addition de l'extrait enzymatique. Le potentiel pris par l'électrode lors de la variation de pH est enregistré au cours du temps. La pente donne la vitesse de la réaction en mm Hg / min.

Selon la loi de Henry :  $[CO_2] = \alpha pCO_2$ , avec :

- $[CO_2]$  : concentration en CO<sub>2</sub>
- $pCO_2$  : pression partielle en CO<sub>2</sub>
- $\alpha$  : coefficient de solubilité du CO<sub>2</sub> dans l'eau sous 760 mm Hg, à T°C  
en litre de CO<sub>2</sub> par litre d'eau.

L'activité en  $\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$  d'échantillon injecté est obtenue en multipliant la valeur de la pente en mm Hg / min par la constante f suivante :

$$f = \frac{\alpha \times 10^3 \times v}{760 \times 22,26 \times v'}$$

- pour
- $\alpha = 0,759 \text{ l CO}_2 / \text{l H}_2\text{O}$  à 25°C, sous 760 mm Hg
  - $v = \text{volume de la chambre de réaction} = 2,5333 \text{ ml}$
  - 22,26 = volume d'une mole de CO<sub>2</sub> à 25°C, sous 760 mm Hg, en litre
  - $v' = \text{volume de l'échantillon injecté en millilitre} = 0,05 \text{ ml}$

on obtient :  $f = 2,27$

$$\text{Activité } (\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1} \text{ d'échantillon}) = 2,27 \times \frac{\Delta pCO_2}{\Delta t} \text{ (mm Hg} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1} \text{ d'échantillon)}$$

pour une injection de 50  $\mu\text{l}$

L'unité officielle, le katal, correspondant à la quantité d'activité qui convertit une mole de substrat par seconde, n'est pas utilisée car elle n'est pas pratique.

L'activité est exprimée en unité U d'enzyme, ce qui correspond à la quantité d'enzyme qui catalyse la transformation d'une micromole de substrat par minute, ou l'apparition d'une micromole de produit par minute. L'unité U d'enzyme utilisée correspond à la formation d'une micromole de gaz carbonique par minute.



Un dosage des protéines présentes dans l'extrait enzymatique permet le calcul de l'activité spécifique exprimée en  $\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  de protéines.

Le rendement de la purification et le degré de purification sont calculés de la façon suivante :

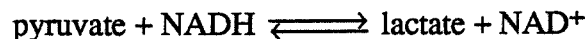
$$\text{Rendement} = \frac{\text{Activité totale au n}^{\text{ième}} \text{ stade de purification}}{\text{Activité totale initiale}} \times 100$$

$$\text{Degré de purification} = \frac{\text{Activité spécifique au n}^{\text{ième}} \text{ stade de purification}}{\text{Activité spécifique initiale}} \times 100$$

### III-2 ACTIVITÉ LACTATE-DÉSHYDROGÉNASE

#### III-2-1 Activité lactate-déshydrogénase (LDH) totale

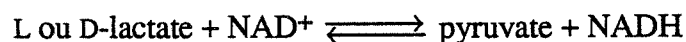
Pour mesurer l'activité LDH totale, la réaction est considérée dans le sens le plus favorable :



L'activité est déterminée en mesurant la vitesse d'oxydation du NADH au spectrophotomètre à 340 nm, à l'aide du kit Lactate dehydrogenase [LD] Sigma. L'échantillon est incubé à 25°C pendant 20 minutes dans un milieu contenant du NADH dans du tampon phosphate 0,1 M, pH 7,5. La réaction est déclenchée par l'ajout de pyruvate.

Cette activité est exprimée en  $\mu\text{mol NADH} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$ .

Lorsque la nature exacte de l'enzyme doit être déterminée, la réaction est prise dans le sens inverse :



#### III-2-2 Activité L-lactate-déshydrogénase

Cette enzyme porte le numéro : 1.1.1.27.

Son activité est déterminée en mesurant la vitesse de réduction du NAD au spectrophotomètre à 340 nm et à 25°C, dans le milieu suivant :

- L-lactate.....0,3 M
- NAD ..... 3,7  $\mu\text{M}$
- Tampon Tris-HCl pH 9.....0,1 M

Cette activité est exprimée en  $\mu\text{mol NADH} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$ .

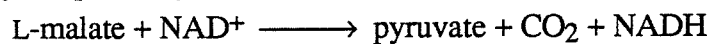
#### III-2-3 Activité D-lactate-déshydrogénase

Cette enzyme porte le numéro : 1.1.1.28.

Son activité est déterminée de la même façon que celle de la L-LDH, en remplaçant le L-lactate par du D-lactate.

### III-3 ACTIVITÉ ENZYME "MALIQUE"

Il s'agit de l'enzyme qui catalyse la réaction suivante :

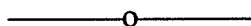


Cette enzyme porte le numéro : 1.1.1.39 et est officiellement appelée : malate déshydrogénase décarboxylante.

Son activité est déterminée en mesurant la vitesse de réduction du NAD au spectrophotomètre à 340 nm à 25°C, dans le milieu suivant :

- L-malate.....22 mM
- NAD.....0,4 mM
- MnCl<sub>2</sub>..... 4 mM
- Tampon phosphate pH 6.....0,2 M

Cette activité est exprimée en  $\mu\text{mol NADH} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$ .



## IV-DOSAGE DES DIFFÉRENTS CONSTITUANTS

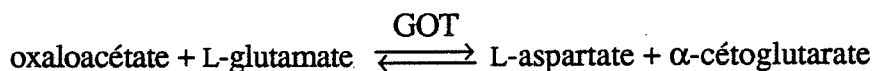
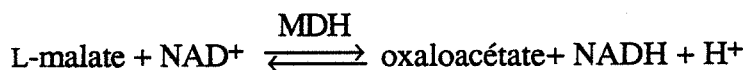
### IV-1 DOSAGE DES PROTÉINES

Trois méthodes ont été comparées pour le dosage des protéines des extraits enzymatiques : la méthode de Lowry *et al.* [1951], le kit BCA (Pierce) et le kit Bio-Rad Protein Assay. La méthode de Lowry est peu précise, de plus, le sulfate d'ammonium de certains échantillons interfère avec la mesure. Dans les deux autres techniques, cette interférence existe toujours, mais est moins marquée. Néanmoins, les dosages en présence de sulfate d'ammonium sont considérés comme inexacts.

La technique Bio-Rad Protein Assay a été adoptée car c'est la plus rapide. Elle est basée sur la méthode de Bradford [1976] qui emploie comme réactif coloré le bleu de Coomassie. L'albumine bovine est utilisée comme standard. 2 ml de réactif sont ajoutés à 40 µl d'échantillon (ou de tampon de dilution de l'échantillon pour le "blanc") et mélangés. Après 5 minutes d'incubation à température ambiante, l'absorbance est lue à 595 nm. La réaction est stable pendant une heure.

### IV-2 DOSAGE DE L'ACIDE L-MALIQUE

Il est effectué à l'aide du kit Boehringer. En présence de NAD, l'acide L-malique est oxydé en oxaloacétate par la L-malate-déshydrogénase (L-MDH). L'équilibre de la réaction est situé du côté du malate. En éliminant l'oxaloacétate du milieu réactionnel, la réaction est orientée dans le sens de formation de l'oxaloacétate. En présence de L-glutamate, l'oxaloacétate est transformé en L-aspartate par la glutamate-oxaloacétate-transaminase (GOT).

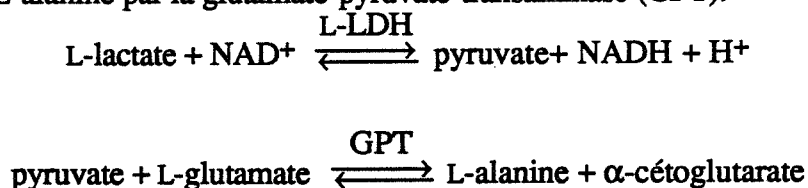


La formation de NADH, mesurée par l'augmentation de l'absorbance à 365 nm, est proportionnelle à la quantité de L-malate présent.

### IV-3 DOSAGE DE L'ACIDE LACTIQUE

Il est effectué à l'aide du kit Boehringer. En présence de NAD, l'acide L-lactique est oxydé en pyruvate par la L-lactate-déshydrogénase (L-LDH). L'équilibre de la réaction est situé du côté du lactate. En éliminant le pyruvate du milieu réactionnel, la réaction est

orientée dans le sens de formation du pyruvate. En présence de L-glutamate, le pyruvate est transformé en L-alanine par la glutamate-pyruvate-transaminase (GPT).



La formation de NADH, mesurée par l'augmentation de l'absorbance à 365 nm, est proportionnelle à la quantité de L-lactate présent.

Le dosage de l'acide L-lactique est aussi réalisé à l'aide d'une électrode enzymatique spécifique de l'acide L-lactique couplée à l'analyseur Microzym-L (Sétric Génie Industriel). L'électrode enzymatique se compose de deux électrodes de platine dont l'une, en forme de disque est recouverte d'une membrane semi-perméable de faible épaisseur. La membrane retient l'enzyme : la L-lactate-déshydrogénase, sur l'électrode en raison de son poids moléculaire. Lors du dosage, le lactate diffuse à travers la membrane et est transformé en pyruvate par la L-LDH en présence d'un cofacteur : le ferricyanure de potassium. Ce composé est réduit en ferrocyanure dans un premier temps par les électrons arrachés au lactate. Le ferrocyanure vient s'oxyder sur l'électrode de platine sous l'effet d'une faible différence de potentiel de 80 mV imposée entre les deux électrodes. Le courant mesuré est proportionnel à la quantité de lactate ayant diffusé.

60 à 100  $\mu\text{l}$  de solution diluée de lactate (0,05 mM à 1,5 mM) sont déposés sur l'électrode. La concentration en lactate est directement lue sur l'appareil, 10 secondes après.

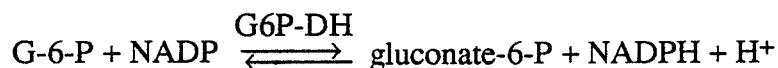
#### IV-4 DOSAGE DES SUCRES RÉDUCTEURS

Les sucres réducteurs présents dans le jus de raisin qui a été utilisé sont représentés principalement par le glucose et le fructose (ceci n'est pas vrai pour tous les jus de raisin). C'est pourquoi le dosage des sucres réducteurs est restreint au dosage du glucose et du fructose.

Il est effectué à l'aide du kit Glucose/Fructose de Boehringer. Le glucose et le fructose sont phosphorylés par l'adénosine-5'-triphosphate (ATP) en glucose-6-phosphate (G-6-P) et en fructose-6-phosphate (F-6-P), dans une réaction catalysée par l'hexokinase (HK).



En présence de glucose-6-phosphate-déshydrogénase (G6P-DH), le glucose-6-phosphate est oxydé par le NADP en gluconate-6-phosphate. Il se forme du NADPH.



La quantité de NADPH formée est proportionnelle à la quantité de glucose, et est mesurée par l'augmentation de l'absorbance à 365 nm.

A la fin de la réaction le fructose-6-phosphate est transformé en glucose-6-phosphate par la phosphoglucose-isomérase (PGI).



Le glucose-6-phosphate formé réagit avec le NADP en formant du gluconate-6-phosphate et du NADPH. Cette quantité de NADPH est proportionnelle à la quantité de fructose.

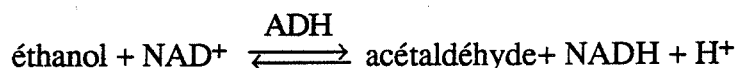
#### IV-5 DOSAGE DU GLUCOSE

Le dosage de glucose des milieux est effectué à l'aide du kit Glucose/Fructose de Boehringer, précédemment décrit. Il a aussi été réalisé à l'aide d'une électrode enzymatique spécifique au glucose, couplée à l'appareil Microzym-L (SGI). Le principe est le même que celui du dosage de l'acide L-lactique, l'enzyme confinée étant la glucose oxydase.

60 à 100 µl de solution diluée de glucose (0,05 g/l à 5 g/l) sont déposés sur l'électrode. La concentration en glucose est directement lue sur l'appareil, 10 secondes après.

#### IV-6 DOSAGE DE L'ÉTHANOL

Il est effectué à l'aide du kit Boehringer. En présence de l'alcool-déshydrogénase (ADH), l'éthanol est oxydé en acétaldéhyde par le NAD. L'équilibre de la réaction est situé du côté de l'éthanol. Il est déplacé vers la droite en captant l'acétaldéhyde formé en milieu alcalin. L'acétaldéhyde est oxydé quantitativement en acide acétique en présence de l'aldéhyde-déshydrogénase (AL-DH)



Au cours de ces réactions, deux moles de NAD sont réduites pour une mole d'éthanol. La quantité de NADH formée est déterminée par l'augmentation de l'absorbance à 365 nm.

## V-EXPÉRIMENTATIONS SUR LES VINS

### V-1 LEVURE

La levure utilisée pour la fabrication du vin est une souche de *Saccharomyces cerevisiae* du laboratoire.

Elle est conservée à 4°C sur milieu solide.

### V-2 VINS

Les tests de FML en réacteur ont été réalisés soit sur du Gaillac blanc (Larroque) après fermentation alcoolique, soit sur du vin préparé au laboratoire.

Le vin du laboratoire est préparé à partir de jus de raisin rouge du commerce en pack Tetra Brik® (Casino).

Le degré alcoolique du vin issu de ce moût dépend de la concentration en sucres réducteurs. En effet, pour obtenir 1 degré, il faut fermenter 17 g/l de sucres réducteurs. Avant de démarrer une fermentation, la concentration en sucres réducteurs est vérifiée et éventuellement ajustée, avec du glucose, à 170 g/l pour obtenir 10°, ou à 187 g/l pour 11°.

Le jus de raisin en pack est stérile. 5 litres de jus de raisin sont inoculés avec une préculture de *S. cerevisiae* réalisée sur 500 ml de jus de raisin. L'incubation se fait à température ambiante jusqu'à ce que la concentration en sucres réducteurs soit inférieure à 2 g/l.

Que ce soit le Gaillac ou le vin préparé au laboratoire, après la fermentation alcoolique, il est centrifugé puis filtré stérilement (membranes Millipore 8 µm, 0,8 µm, 0,45 µm).

	pH	Degré alcoolique	[Acide malique] (mM)	[Acide lactique] (mM)
<b>Gaillac</b>	3,24	10,5°	10,33	2,29
<b>Vin du laboratoire</b>	3,13	10°	13,47	1,51

**Tableau 11** : Caractéristiques des vins utilisés pour les expérimentations sur les réacteurs.

## VI-RÉACTEUR À ENZYME MALOLACTIQUE

### VI-1 TECHNIQUES DE FIXATION DE L'ENZYME ET DU COENZYME

#### VI-1-1 Technique de fixation covalente de l'enzyme malolactique sur membrane plane et fibres creuses de polyamide

Une technique classique de fixation covalente des protéines sur support de polyamide par l'intermédiaire du glutaraldéhyde a été testée.

Les fibres de polyamide subissent une hydrolyse partielle en milieu acide qui libère des groupements aminés ; le glutaraldéhyde réagit ensuite avec les groupements aminés du support et constitue ainsi un bras ayant une extrémité réactive : -CHO. Ce groupement aldéhyde libre va alors réagir avec les groupements aminés de l'enzyme.

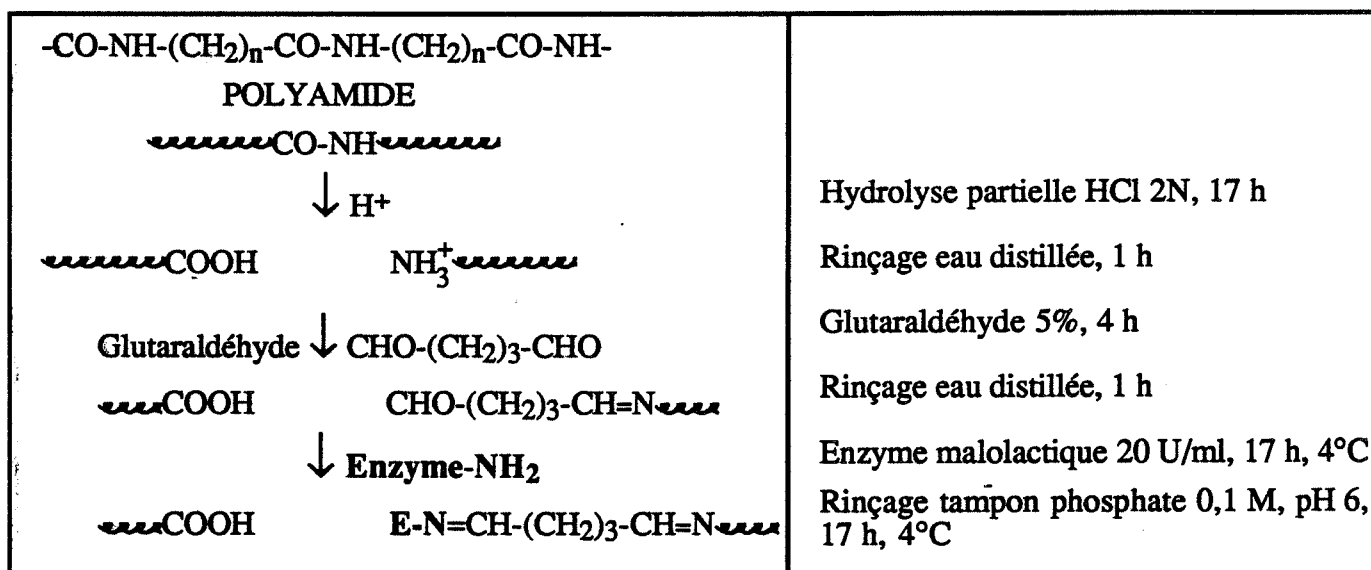


Schéma 3 : Technique de fixation covalente de l'enzyme malolactique.

#### VI-1-2 Technique de fixation covalente de l'enzyme malolactique et du NAD sur membrane plane et fibres creuses de polyamide

Cette technique ressemble à celle utilisée pour la fixation de l'enzyme seule. Elle a été décrite par Mazid et Laidler [1982].

Après une hydrolyse acide partielle des brins de polyamide qui libère des fonctions  $\alpha$ -carboxyliques et amines, un dérivé du NAD : le N<sup>6</sup>[(6-aminohexyl)-carbamoylméthyl]-NAD, est fixé sur la fonction carboxylique en présence de 1-cyclohexyl-3-(2-morpholinoéthyl) carbodiimide métho-p-toluène sulfonate (CMC). Puis par l'intermédiaire du glutaraldéhyde, l'enzyme est fixée sur les fonctions amines libres.

$\begin{array}{c} \text{-CO-NH-(CH}_2\text{)}_n\text{-CO-NH-(CH}_2\text{)}_n\text{-CO-NH-} \\ \text{POLYAMIDE} \\ \text{~~~~~CO-NH~~~~~} \\ \downarrow \text{H}^+ \\ \text{~~~~~COOH} \quad \text{NH}_3^+ \text{~~~~~} \\ \downarrow \text{CMC} \\ \text{dérivé NAD : NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_6\text{-NH-CO-CH}_2\text{-NAD} \\ \text{~~~~~CO-NH-(CH}_2\text{)}_6\text{-NH-CO-CH}_2\text{-NAD} \quad \text{NH}_3^+ \text{~~~~~} \\ \downarrow \text{Glutaraldéhyde} \\ \text{~~~~~CO-NH-(CH}_2\text{)}_6\text{-NH-CO-CH}_2\text{-NAD} \quad \text{CHO-(CH}_2\text{)}_3\text{-CHO} \\ \text{~~~~~CO-NH-(CH}_2\text{)}_6\text{-NH-CO-CH}_2\text{-NAD} \quad \text{CHO-(CH}_2\text{)}_3\text{-CH=N~~~~~} \\ \downarrow \text{Enzyme-NH}_2 \\ \text{~~~~~CO-NH-(CH}_2\text{)}_6\text{-NH-CO-CH}_2\text{-NAD} \quad \text{E-N=CH-(CH}_2\text{)}_3\text{-CH=N~~~~~} \end{array}$	<p>Hydrolyse partielle HCl 2N, 17 h</p> <p>Rinçage eau distillée, 1 h</p> <p>Dérivé NAD 2 mg/ml + CMC 10 mg/ml dans de l'eau distillée, pH 5, 24 h</p> <p>Rinçage eau distillée, 1 h</p> <p>Glutaraldéhyde 12,5% dans du tampon borate 0,2 M, pH 8,5, 8 h</p> <p>Rinçage tampon phosphate 0,1 M, pH 6, 1 h</p> <p>Enzyme malolactique 20 U/ml, 17 h, 4°C</p> <p>Rinçage tampon phosphate 0,1 M, pH 6, 72 h, 4°C</p>
---	---

**Schéma 4** : Technique de fixation covalente de l'enzyme malolactique et du NAD.

Les conditions particulières seront précisées à chaque expérience.

Pour l'une ou l'autre des techniques, des tests préliminaires sont faits sur des membranes planes de polyamide de 0,8 cm de diamètre, ou sur des fibres creuses de polyamide libres. La fixation se fait en becher dans un volume de 5 ml.

Pour les immobilisations à l'intérieur des réacteurs, à chaque étape les différents produits circulent dans la lumière des fibres creuses à un débit de 10 ml/h en circuit fermé (volume de 15 ml), sauf les rinçages qui se font en circuit ouvert.

## VI-2 RÉACTEUR

Le système utilisé pour réaliser le réacteur est un module d'ultrafiltration U 2000 (Gambro).

Ce module est composé de 2 100 fibres creuses de polyamide représentant une surface de 0,16 m<sup>2</sup>. Le diamètre interne des fibres est de 215 µm, leur longueur est de 115 mm. Le volume interne des fibres est de 8,8 ml et le volume externe du réacteur est de 20 ml.

Il est possible d'utiliser deux circuits (Figure 3) :

- un circuit interne qui passe à l'intérieur des fibres creuses,
- un circuit externe qui passe dans le réacteur, à l'extérieur des fibres.



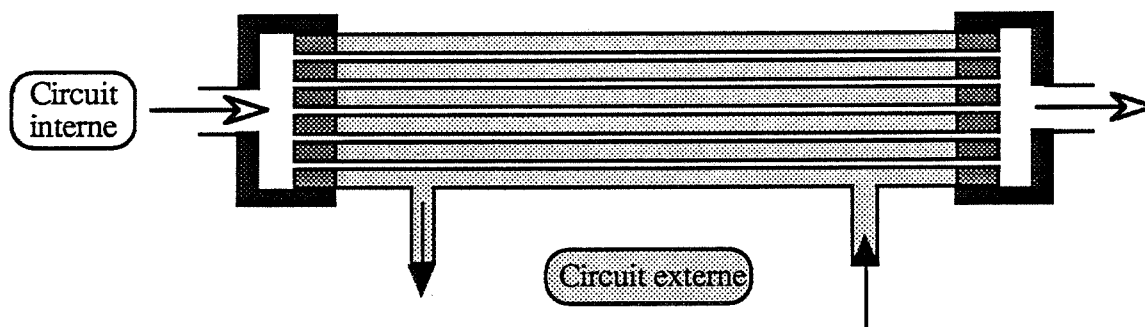


Figure 3 : Circuits interne et circuit externe d'un ultrafiltre à fibres creuses.

### VI-3 APPAREILLAGE

#### VI-3-1 Utilisation du circuit interne du réacteur

Le substrat ainsi que le réacteur se trouvent dans un bain thermostaté à 20°C. Le substrat est entraîné dans la lumière des fibres creuses du réacteur par une pompe péristaltique, à un débit donné. Il subit la transformation à l'intérieur du module et est récupéré en sortie par un collecteur de fractions (Figure 4). Un dosage des acides malique et lactique est effectué sur chaque fraction.

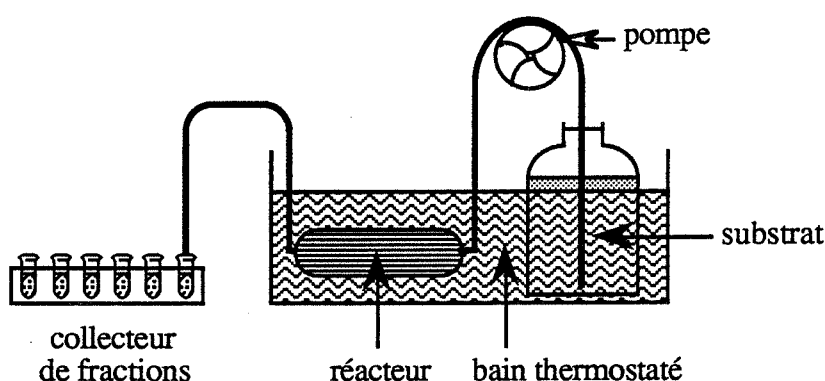


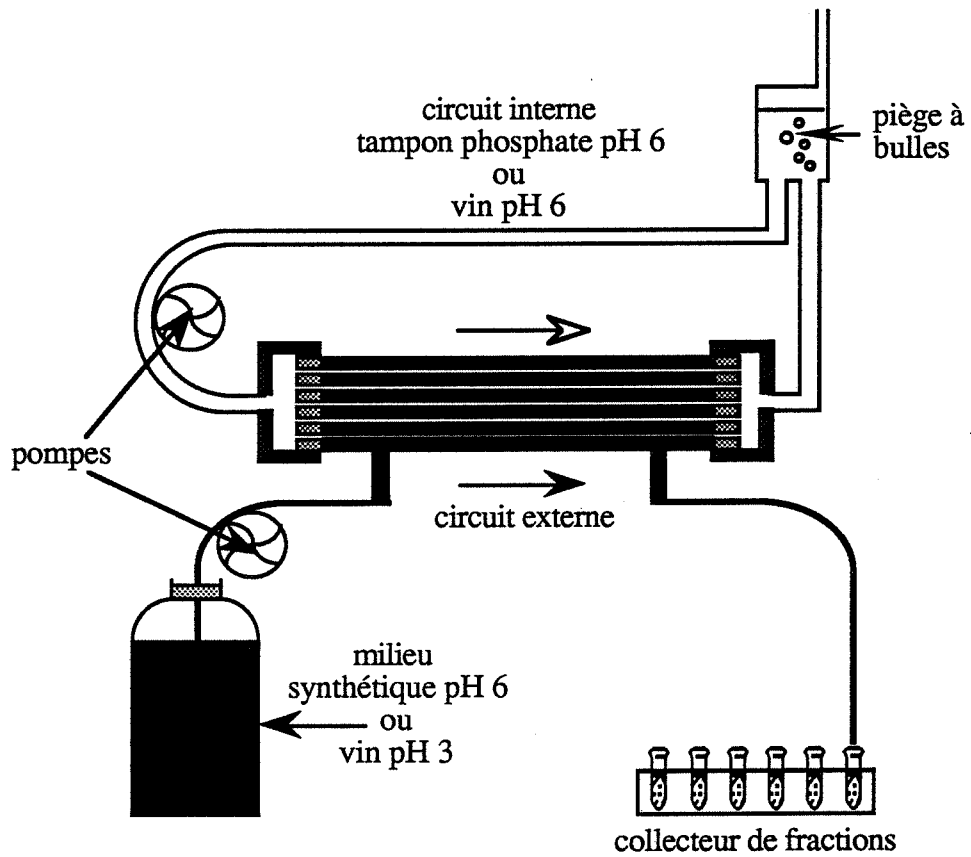
Figure 4 : Appareillage utilisé pour tester les réacteurs.

#### VI-3-2 Utilisation du circuit interne et du circuit externe du réacteur

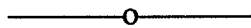
Comme précédemment, le réacteur et le substrat se trouvent dans un bain thermostaté à 20°C. Le substrat se trouve dans le circuit externe du réacteur, le circuit interne est le circuit enzymatique. Les deux circuits sont à cocourant (Figure 5).

#### VI-3-3 Contrôle du pH dans les deux circuits du réacteur

Lors de cette expérience l'appareillage précédent a été utilisé. Un pH-mètre relié à un enregistreur est posé en sortie de réacteur sur le circuit interne permettant le contrôle du pH du circuit interne. Le pH de chaque fraction est pris pour contrôler le pH du circuit externe.



**Figure 5 :** Utilisation des deux circuits du réacteur.

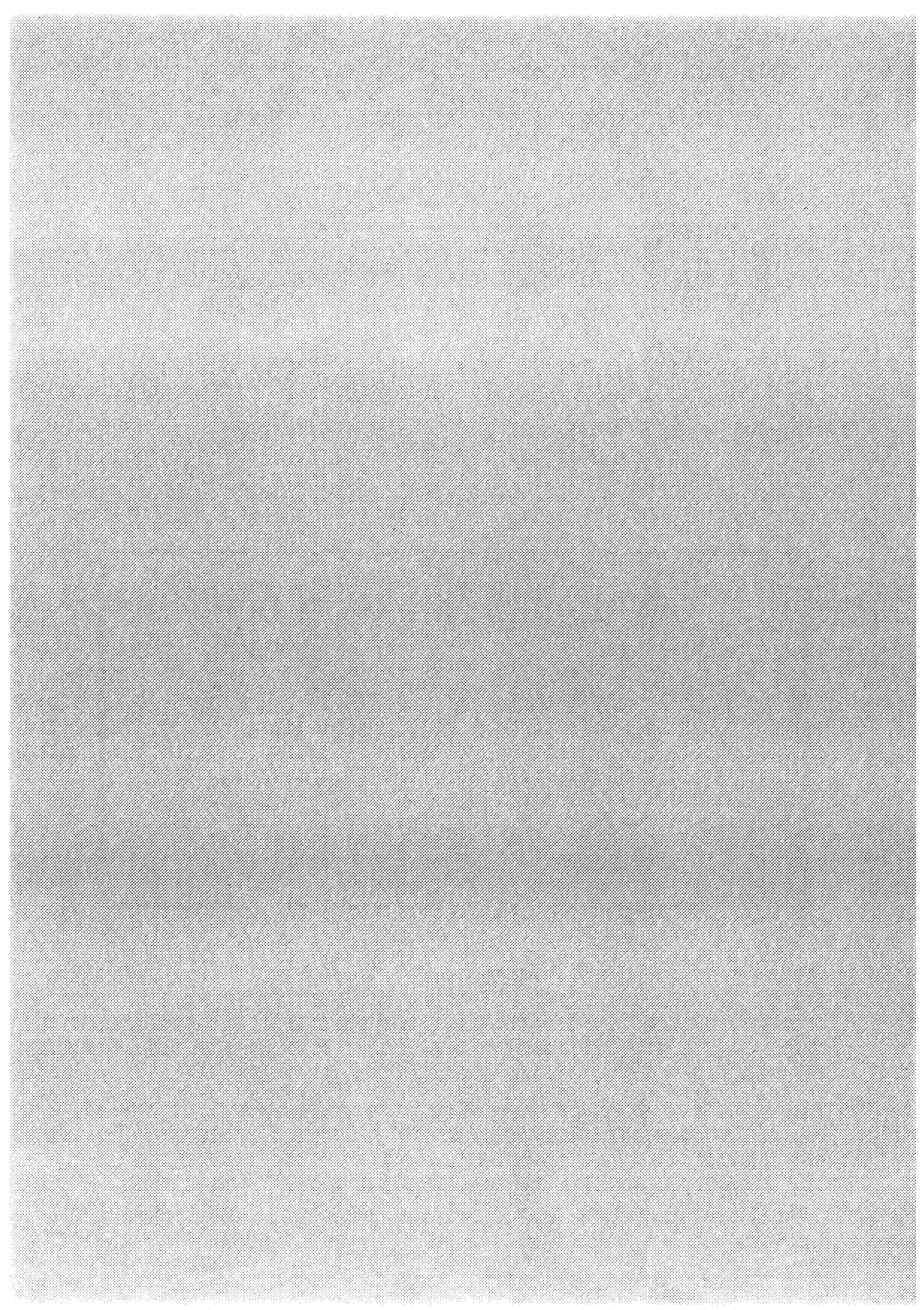




# RÉSULTATS

Première Partie

Production d'Enzyme  
Malolactique



## CHAPITRE I

### PRODUCTION BACTÉRIENNE

#### I-1 IDENTIFICATION DE *LEUCONOSTOC ÆNOS*

A chaque culture, la nature de la souche est vérifiée par ses caractères morphologiques et par sa coloration de Gram. En début de culture, la coloration Gram positive est très nette, mais les bactéries perdent rapidement cette propriété et après 24 heures un mélange de coques mauves et roses est visible.

A chaque repiquage (tous les 4 à 6 mois) la souche est testée sur des galeries API 50 CH. De nombreux auteurs n'ont pas été satisfaits du milieu API 50 CHL à pH 7 et ont identifié *L. ænos* dans des milieux de pH inférieur à 7 (Tableau 15).

Références	pH du milieu d'identification
Garvie [1967]	5,2
Pilone et Kunkee [1972]	5,5
Lafon-Lafourcade et Joyeux [1979]	7
King [1985]	5,5
Tracey et Britz [1987]	4,8
Davis <i>et al.</i> [1988]	6
Priest et Pleasants [1988]	6,5
Milliere <i>et al.</i> [1989]	4,5

**Tableau 15** : pH des milieux utilisés pour l'identification de *L. ænos*.

Trois milieux ont été testés : le milieu API 50 CHL, le milieu MRS basal à pH 6 coloré au pourpre de bromocrésol et le milieu MRS basal à pH 4 coloré au bleu de bromophénol.

La Figure 6 montre les profils biochimiques de *L. ænos* 84-06 aux différents pH. Les meilleurs résultats et la lecture la plus rapide, sont obtenus avec le milieu MRS basal à pH 6. C'est ce milieu-là qui a été utilisé par la suite pour les identifications de routine.

Cette expérience montre que le métabolisme de *L. ænos* varie beaucoup en fonction du pH du milieu dans lequel se trouve la bactérie et qu'au pH du vin (environ pH 3), en présence d'alcool il peut être complètement différent.

Milieu API 50 CHL pH 7, 28°C				Milieu MRS basal pH 6, 28°C				Milieu MRS basal pH 4, 28°C			
	1 j	3 j	n°		1 j	3 j	n°		1 j	3 j	n°
Control			0	Control			0	Control			0
Glycerol			1	Glycerol			1	Glycerol			1
Erythritol			2	Erythritol			2	Erythritol			2
D-Arabinose			3	D-Arabinose			3	D-Arabinose			3
L-Arabinose			4	L-Arabinose			4	L-Arabinose			4
Ribose	4	5	5	Ribose	5	5	5	Ribose	2	2	5
D-Xylose			6	D-Xylose			6	D-Xylose			6
L-Xylose			7	L-Xylose			7	L-Xylose			7
Adonitol			8	Adonitol			8	Adonitol			8
β methyl-xyloside			9	β methyl-xyloside			9	β methyl-xyloside			9
Galactose			10	Galactose	1	1	10	Galactose			10
D-Glucose	3	3	11	D-Glucose	4	4	11	D-Glucose	1	1	11
D-Fructose	4	5	12	D-Fructose	5	5	12	D-Fructose	2	2	12
D-Mannose	3	3	13	D-Mannose	3	4	13	D-Mannose	1	1	13
L-Sorbose			14	L-Sorbose			14	L-Sorbose			14
Rhamnose			15	Rhamnose			15	Rhamnose			15
Dulcitol			16	Dulcitol			16	Dulcitol			16
Inositol			17	Inositol			17	Inositol			17
Mannitol			18	Mannitol	1	1	18	Mannitol			18
Sorbitol			19	Sorbitol			19	Sorbitol			19
α Methyl-D-mannoside			20	α Methyl-D-mannoside			20	α Methyl-D-mannoside			20
α Methyl-D-glucoside			21	α Methyl-D-glucoside			21	α Methyl-D-glucoside			21
N Acetyl glucosamine	2	2	22	N Acetyl glucosamine	2	3	22	N Acetyl glucosamine			22
Amygdaline			23	Amygdaline			23	Amygdaline			23
Arbutine		1	24	Arbutine	3	4	24	Arbutine		1	24
Esculine	5	5	25	Esculine	5	5	25	Esculine	5	5	25
Salicine	1	1	26	Salicine	2	3	26	Salicine		1	26
Cellobiose			27	Cellobiose	1	2	27	Cellobiose			27
Maltose			28	Maltose			28	Maltose			28
Lactose			29	Lactose			29	Lactose			29
Melibiose	2	2	30	Melibiose	2	3	30	Melibiose	1	1	30
Saccharose			31	Saccharose			31	Saccharose			31
Trehalose		1	32	Trehalose	1	1	32	Trehalose			32
Inuline			33	Inuline			33	Inuline			33
Melezitose			34	Melezitose			34	Melezitose			34
D-Raffinose			35	D-Raffinose			35	D-Raffinose			35
Amidon			36	Amidon			36	Amidon			36
Glycogene			37	Glycogene			37	Glycogene			37
Xylitol			38	Xylitol			38	Xylitol			38
β Gentiobiose			39	β Gentiobiose	2	2	39	β Gentiobiose		1	39
D-Turanose			40	D-Turanose			40	D-Turanose			40
D-Lyxose			41	D-Lyxose			41	D-Lyxose			41
D-Tagatose			42	D-Tagatose			42	D-Tagatose			42
D-Fucose			43	D-Fucose			43	D-Fucose			43
L-Fucose			44	L-Fucose			44	L-Fucose			44
D-Arabitol			45	D-Arabitol			45	D-Arabitol			45
L-Arabitol			46	L-Arabitol			46	L-Arabitol			46
Gluconate	2	2	47	Gluconate	2	3	47	Gluconate	1	1	47
2 ceto-gluconate			48	2 ceto-gluconate	3	4	48	2 ceto-gluconate	2	2	48
5 ceto-gluconate			49	5 ceto-gluconate	2	4	49	5 ceto-gluconate		1	49

Figure 6 : Profils biochimiques de *Leuconostoc ænos* 84-06 à différents pH.  
Lecture à 1 jour (1 j) et à 3 jours (3 j)  
1 : douteux faible, 2 : douteux positif, 3 : positif faible, 4 : positif, 5 : très positif.

## I-2 CHOIX D'UN MILIEU ET D'UN PROTOCOLE DE CULTURE

## I-2-1 Milieu de culture

La croissance de *L. ænos* a été testée sur 50 ml des différents milieux de culture en erlenmeyer non agités et à 28°C.

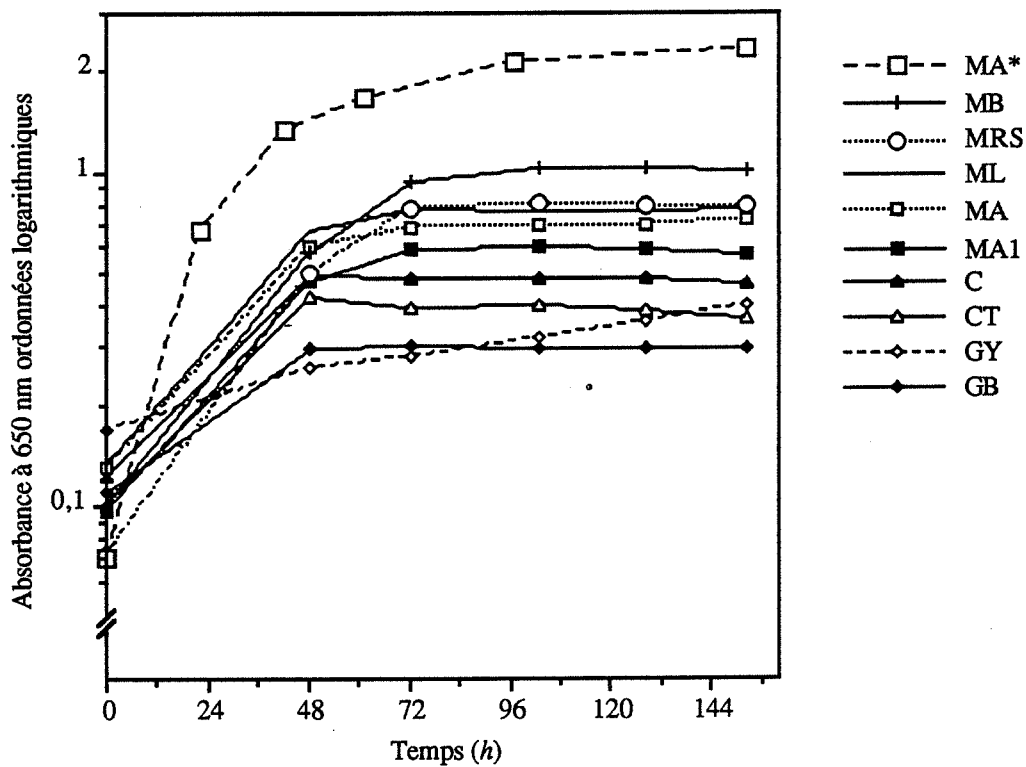


Figure 7 : Croissance de *L. ænos* sur différents milieux de culture.

Ces courbes permettent de calculer les temps de génération et les taux de croissance sur les différents milieux.

Milieu	Temps de génération (h)	Taux de croissance ( $h^{-1}$ )
MA*	6,5	0,154
MB	11	0,091
MRS	10	0,1
ML	12	0,083
MA	12,5	0,08
MA1	12	0,083
C	18	0,056
CT	15	0,067
GY	48	0,021
GB	20	0,05

Tableau 16 : Temps de génération et taux de croissance de *L. ænos* sur les différents milieux de culture.



Toutes les cultures ont été ensemencées avec une préculture sur milieu de Carr, sauf la culture sur MA\* qui a été ensemencée avec une préculture sur milieu de base selon le protocole de Radler et Bröhl [1984]. Ces résultats montrent que le protocole de Radler et Bröhl est le meilleur pour la culture de *L. ænos*. Le temps de génération passe de 10 heures dans le meilleur des cas (milieu MRS) à 6 h 30 min et la production de biomasse est multipliée par deux. C'est ce protocole qui a été choisi et qui est utilisé par la suite.

Le Tween 80 semble avoir une bonne influence sur la croissance de *L. ænos* : en effet, les six premiers milieux en contiennent et les suivants n'en contiennent pas.

### I-2-2 Caractéristiques de la préculture

De nombreuses cultures ont été réalisées par la suite en suivant ce protocole. Les cultures sur MA sont ensemencées avec des précultures sur MB, ces dernières correspondant à 10% en volume des cultures sur MA.

Les caractéristiques des précultures sur MB ont été étudiées.

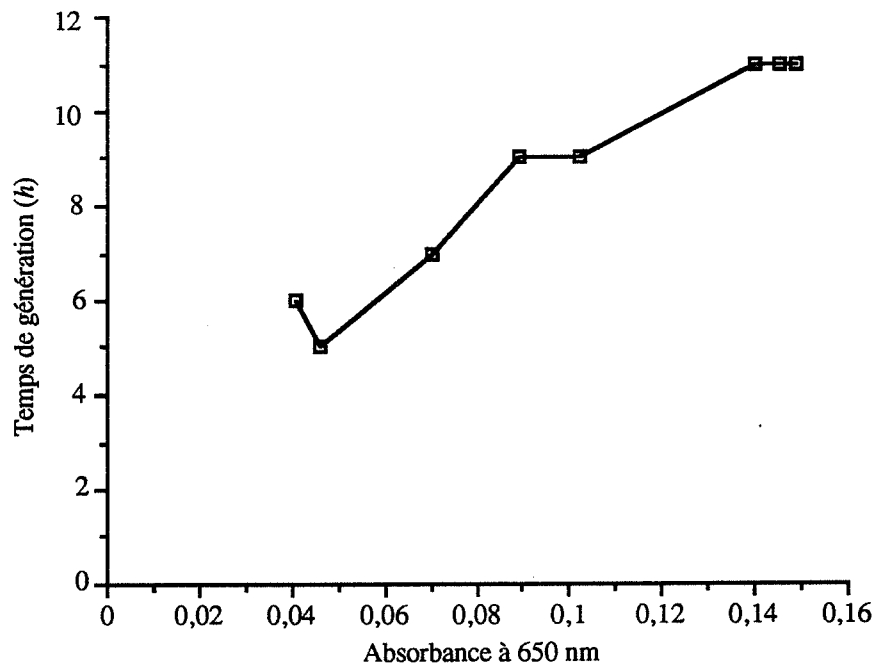
Nous avons ensemencé des cultures sur MA avec des précultures sur MB dont l'absorbance à 650 nm varie de 0,45 à 1,7. L'absorbance de la culture sur MA au temps 0 varie par conséquent de 0,04 à 0,15.

L'influence de cette valeur sur le temps de génération et le taux de croissance de *L. ænos* en milieu acide est montré sur la Figure 8.

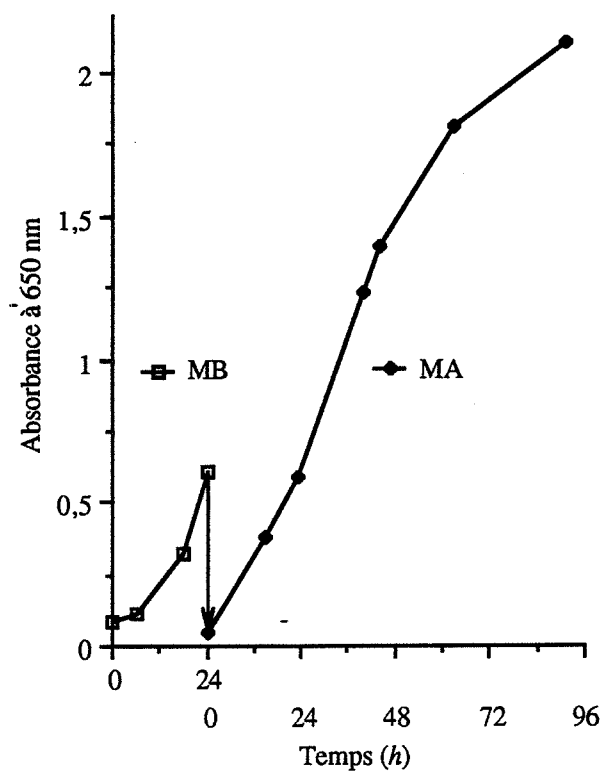
Ce graphe montre que le temps de génération baisse en même temps que l'absorbance à 650 nm au temps 0. Il est le plus bas pour une culture qui démarre avec une absorbance à 650 nm de 0,05, donc à partir d'une préculture sur MB ayant une absorbance à 650 nm de 0,55. Cette valeur est généralement atteinte 20 à 24 heures après le début de la phase exponentielle de croissance sur MB. Il n'est pas nécessaire d'attendre d'avoir une préculture plus importante pour ensemer le milieu acide.

Donc pour la culture de *L. ænos*, le protocole suivant a été utilisé (Figure 9) :

- Préculture sur milieu de base à 28°C, non agitée, pendant 24 h après le début de la phase exponentielle de croissance,
- Culture sur milieu acide à 28°C.



**Figure 8 :** Influence de l'absorbance à 650 nm au temps 0 de la culture sur MA, sur le temps de génération de *L. œnos*.



**Figure 9 :** Courbes de croissance de *L. œnos* sur MB puis sur MA.

### I-2-3 Évolution de l'activité malolactique des cellules et de la composition du milieu de culture au cours du cycle de croissance

La mesure de l'activité malolactique des milieux a été réalisée pour les cultures sur MB et sur MA.

Sur MB (sans acide malique), la souche de *L. œnos* présente une faible activité malolactique résiduelle de 0,11 U/ml de milieu de culture. Cette remarque ne prouve pas que l'enzyme malolactique de notre souche de *L. œnos* soit constitutive. Pour le montrer il faudrait repiquer les bactéries plusieurs fois sur milieu dépourvu d'acide malique.

L'absorbance à 650 nm, le pH, l'évolution des concentrations en glucose, acide L-malique et acide L-lactique, l'évolution des activités malolactiques, spécifique et totale, ont été suivis au cours de la croissance sur milieu acide.

A intervalles réguliers, après mesure de l'absorbance à 650 nm, du pH de la culture et comptage en cellule de Malassez, 8 ml sont prélevés et centrifugés à 20 000 g, à 10°C pendant 10 minutes. Les dosages du glucose, des acides malique et lactique sont effectués sur le surnageant. Le culot est repris par 2 ml de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 M et l'activité malolactique est mesurée sur cette suspension bactérienne.

Pour cette expérience, cinq fioles erlenmeyer de 1 litre de MA ont étéensemencées avec la même concentration bactérienne, à intervalles de 8 à 24 heures. Les profils de chaque culture se superposent exactement et sont représentés sur les Figures 10 et 11.

La quantité d'acide malique décroît rapidement 20 heures après le début de la phase de croissance. Une quantité équimoléculaire d'acide lactique apparaît dans le milieu de culture.

Le glucose est consommé moins vite que l'acide malique pendant la phase exponentielle de croissance. En fin de culture, il en reste encore 10 g/l. La concentration en glucose peut donc être ramenée à 10 g/l dans le milieu acide.

Le pH ne varie pratiquement pas au cours de la culture. Il est fixé à 4,6 au départ. Il atteint 4,9 à 48 heures, c'est-à-dire au moment où tout l'acide malique est consommé, puis revient à 4,5 en fin de culture. Le tampon utilisé dans le milieu acide joue donc bien son rôle et aucune régulation de pH n'est nécessaire.

L'activité spécifique de l'enzyme malolactique est maximale 20 heures après le début de la culture :  $2,8 \cdot 10^{-3}$  U/ $10^7$  bactéries, puis elle décroît en même temps que la concentration en acide malique. Elle se stabilise à  $1,5 \cdot 10^{-3}$  U/ $10^7$  bactéries en fin de phase exponentielle de croissance, puis chute brutalement en début de phase stationnaire.

L'activité totale de la culture suit la courbe de croissance, elle est maximale en fin de phase exponentielle et diminue rapidement au début de la phase stationnaire.

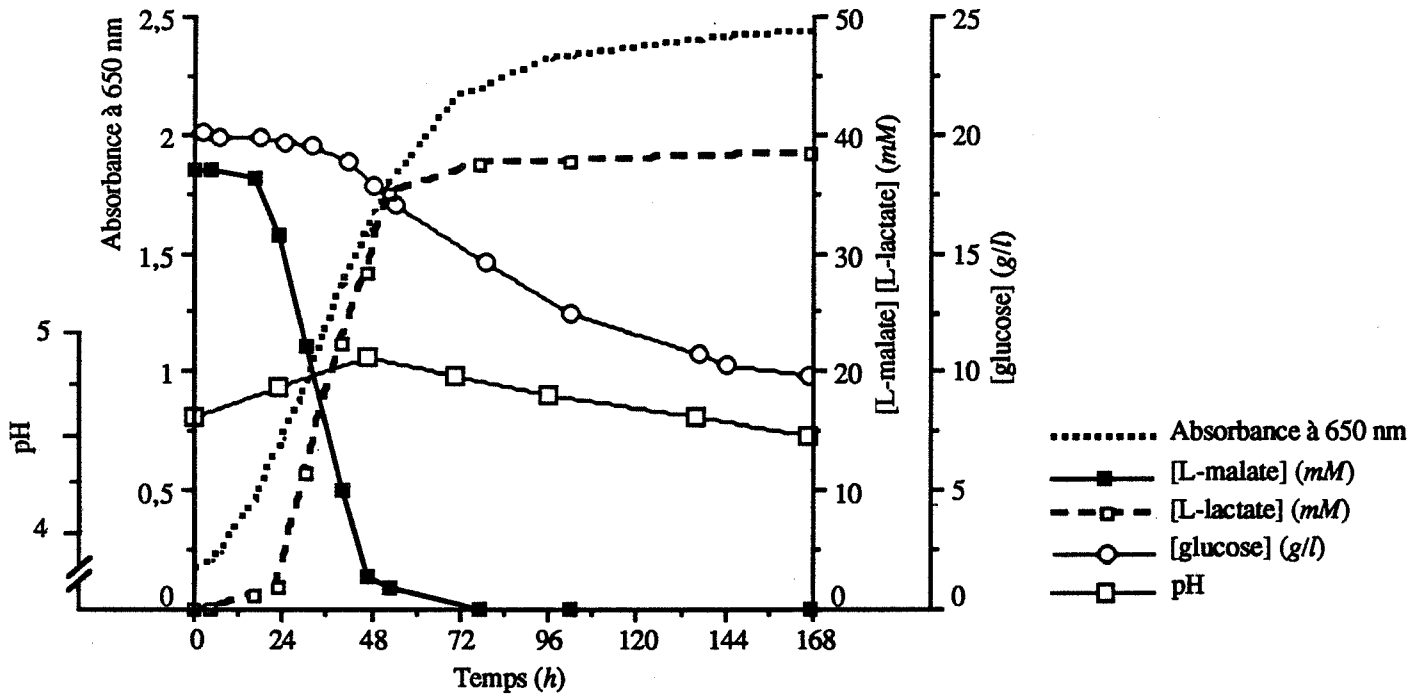


Figure 10 : Évolution du pH et des concentrations en glucose, acide L-malique et acide L-lactique au cours de la croissance de *L. œnos* sur MA, en fermenteur, à 28°C.

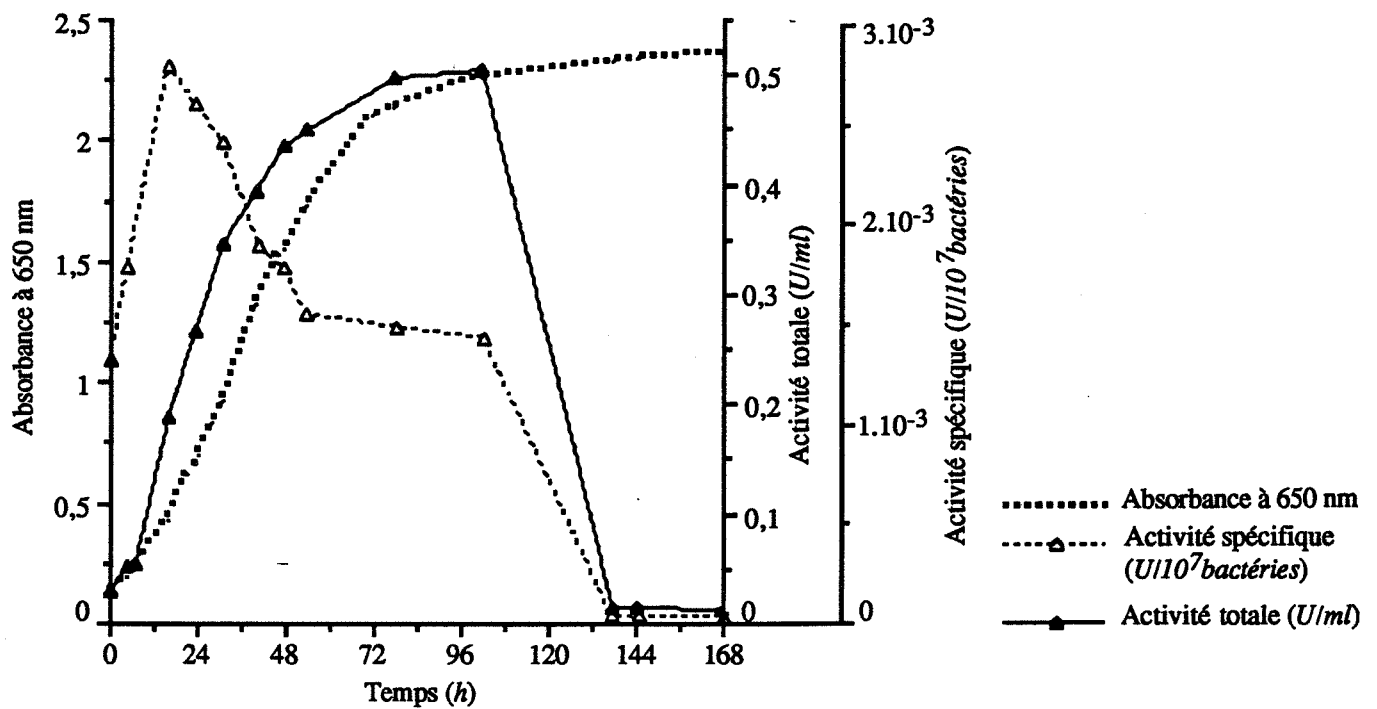


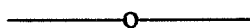
Figure 11 : Évolution des activités malolactiques, totale et spécifique, au cours de la croissance de *L. œnos* sur MA, en fermenteur, à 28°C.

L'influence exercée par l'acide malique sur la production enzymatique tend à confirmer, comme l'a montré Lonvaud-Funel [1986], que l'enzyme malolactique de *L. œnos* serait plutôt inductible.

Ces observations permettent de définir le moment idéal pour récolter les cellules. Les bactéries récoltées en début de phase exponentielle auront une forte activité spécifique, mais seront peu nombreuses. Pour une production importante d'enzyme, la récolte se fait en fin de phase exponentielle où l'activité totale est maximale, bien que les cellules aient une activité spécifique plus faible. En général, les cultures sont récoltées à environ 63 heures.

Ces résultats ont été vérifiés au cours de sept campagnes de production d'enzyme qui ont suivi cette expérience. Deux cultures se sont déroulées différemment. La récolte d'une première culture a dû être différée de 24 heures pour des raisons techniques, et c'est donc produite à 87 heures. L'activité malolactique totale a brutalement chuté après 65 heures pour être pratiquement nulle au moment de la récolte. La seconde culture est celle dont le temps de génération a été le plus court, c'est-à-dire, 5 heures. A 44 heures, l'activité malolactique totale atteignait 0,72 U/ml qui est la valeur la plus importante que nous ayons obtenue pour une production d'enzyme.

Ces remarques montrent que, dans certains cas particuliers, on peut être amené à récolter la culture avant 63 heures. Il convient de bien suivre la courbe de croissance des bactéries au cours de la culture, et de récolter dès que le taux de croissance fléchit. Une récolte trop tardive peut pénaliser la production.



## CHAPITRE II

### EXTRACTION DE L'ENZYME MALOLACTIQUE

En fin de culture, les cellules sont récoltées soit en centrifugeant la culture si son volume est inférieur à 2 litres, soit par concentration dans un ultrafiltre à fibres creuses pour des volumes plus grands, puis par centrifugation. Cette dernière technique permet d'obtenir des culots bactériens très bien lavés.

#### II-1 PASSAGES SUCCESSIFS AUX ULTRASONS

Les culots sont remis en suspension dans du tampon phosphate et soumis aux ultrasons. En général, un traitement aux ultrasons de 5 à 15 minutes est préconisé, le broyat est ensuite centrifugé et l'enzyme malolactique est récupérée dans le surnageant. Nous avons alors voulu savoir si le maximum de l'activité malolactique avait été extrait. Le culot de débris bactériens a été remis en suspension dans du tampon phosphate et soumis une nouvelle fois aux ultrasons, et ainsi de suite jusqu'à ce que le surnageant n'ait plus d'activité malolactique. Sept surnageants ont été récupérés. Les résultats sont présentés dans le Tableau 17. Cette expérience a été faite sur une culture de 5 litres. Les suspensions bactériennes sont traitées pendant 15 minutes, par impulsions, avec une puissance de 270 W, à 4°C.

Surnageants	Activité malolactique totale (U)
1	406
2	388
3	338
4	205
5	203
6	78
7	63

**Tableau 17 :** Activité malolactique des surnageants après passage aux ultrasons.

Cette étude montre que le premier passage aux ultrasons ne permet pas d'extraire la majorité de l'enzyme malolactique. Les passages suivants sont encore très productifs. Bien que les manipulations soient longues, au total 1 heure pour chaque passage, il est intéressant de renouveler l'opération au moins trois fois, ce qui multiplie par trois la production.

La désintégration des cellules aux ultrasons est une des techniques les plus drastiques, néanmoins, dans le cas de *L. ænos* elle ne paraît pas suffisamment efficace. Nous avons voulu essayer de fragiliser la paroi des bactéries par action du lysozyme.

## II-2 ACTION DU LYSOZYME

Le lysozyme a une action bactériolytique : il hydrolyse les liaisons  $\beta$ -1,4 entre l'acide *N*-acétylmuramique et les résidus *N*-acétyl-D-glucosamine du peptidoglycane de la paroi bactérienne. Les bactéries à Gram positif, par la nature de leur paroi, sont beaucoup plus sensibles au lysozyme que les bactéries à Gram négatif.

Après concentration et centrifugation, les cellules sont remises en suspension dans du tampon phosphate et divisées en deux parties égales. Une première partie est directement soumise aux ultrasons. Une seconde partie est incubée à 37°C, avec du lysozyme à 0,2 mg/ml pendant 15 minutes, sous agitation lente, puis soumise aux ultrasons, comme la première. Les suspensions sont centrifugées et l'activité totale des surnageants est déterminée.

Traitement	Activité totale des extraits bruts (U)
Ultrasons	251
Lysozyme + ultrasons	259

**Tableau 18** : Action du lysozyme sur l'extraction de l'enzyme malolactique.

Ces résultats montrent que le lysozyme améliore d'environ 3% l'extraction de l'enzyme. Ce gain n'est pas suffisant pour que cette technique soit incluse dans le protocole de purification de l'enzyme. L'utilisation de lysozyme a été abandonnée.

Les ultrasons, comme l'action du lysozyme, sont des techniques très répandues en laboratoire. Leur application à la désintégration de quantités importantes de bactéries est limitée, pour la première, par la difficulté de transmettre une puissance suffisante à de gros volumes de suspension, et par son prix pour la seconde.

Les procédés industriels d'extraction d'enzymes utilisent des techniques mécaniques telles qu'une brutale dépression dans l'homogénéiseur APV-Manton-Gaulin (APV) ou le broyage à billes dans le Dynamill (Backhoffen). Ces techniques peuvent donner de meilleurs résultats dans le cas d'une production industrielle d'enzyme malolactique.

## II-3 CONGÉLATION DU CULOT BACTÉRIEN

Après concentration et centrifugation, doit-on traiter immédiatement les cellules, ou peut-on différer le traitement de quelques jours ?

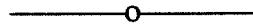
Nous avons remis en suspension le culot de centrifugation dans du tampon phosphate et nous l'avons divisé en deux parties égales. Une première partie a été traitée aux ultrasons

immédiatement , la seconde partie a été congelée puis traitée deux jours plus tard. Cette expérience a été faite à partir d'une culture de 10 litres en fermenteur.

Traitement	Activité totale des extraits bruts (U)
Ultrasons ( 3 fois) le jour même	1542
Congélation + ultrasons ( 3 fois) 2 jours après	1056

**Tableau 19** : Traitement immédiat ou différé des cellules en fin de culture.

Lorsque le traitement est différé de deux jours, une perte de 30% de l'activité malolactique totale est observée. Il convient de traiter les cellules aux ultrasons immédiatement après leur récolte, si une production maximale d'enzyme est recherchée.







## CHAPITRE III

### PURIFICATION DE L'ENZYME MALOLACTIQUE

Une purification totale de l'enzyme donne une faible quantité d'enzyme très pure mais pas toujours stable.

L'extrait brut a une activité malolactique importante et très stable au cours du temps, mais de nombreux contaminants sont présents et gênent la réaction.

Il faut donc obtenir un compromis entre ces deux situations.

Le but du protocole de purification que nous voulons mettre au point, est de produire une enzyme malolactique en quantité importante, qui soit relativement pure et qui reste stable suffisamment longtemps.

Après extraction de l'enzyme malolactique, les surnageants de sonication sont réunis et forment l'extrait brut enzymatique. Ils sont éventuellement congelés, s'ils ne sont pas traités immédiatement.

#### III-1 ÉLIMINATION DES ACIDES NUCLÉIQUES ET PRÉCIPITATIONS AU SULFATE D'AMMONIUM

##### III-1-1 Élimination des acides nucléiques

Les acides nucléiques sont considérés comme des contaminants dans la purification d'enzyme. Ils augmentent la viscosité des extraits et doivent être éliminés, tout en conservant l'activité enzymatique. Différentes techniques peuvent être utilisées, telles que leur précipitation par des macromolécules polycationiques (sulfates de protamine ou de streptomycine, polyéthylèneimine, polylysine...), ou leur hydrolyse à l'aide de nucléases.

Nous avons essayé la précipitation au sulfate de protamine et l'action de la désoxyribonucléase I (DNase I).

L'utilisation du sulfate de protamine à 10% entraîne une perte d'activité d'environ 30%, alors que celle de la DNase I entraîne une perte de 1 à 15%. De plus, le coût du traitement à la DNase I est environ 300 fois moins élevé que celui au sulfate de protamine. Le traitement à la DNase I a été adopté.

Un traitement de 15 minutes à température ambiante est suffisant, un traitement plus long n'améliore pas l'hydrolyse des acides nucléiques et diminue le rendement de purification.

Les nucléotides sont éliminés au cours des précipitations au sulfate d'ammonium et de la chromatographie de filtration sur gel qui suivent cette étape. Les dialyses sont en général évitées car elles causent une perte importante d'activité enzymatique.

### III-1-2 Précipitations au sulfate d'ammonium

Les précipitations au sulfate d'ammonium ont un double but : l'élimination d'une partie des contaminants et la concentration de l'extrait.

Trois pourcentages de sulfate d'ammonium ont été testés pour éliminer une partie des contaminants : 30%, 35% et 40%.

La précipitation à 40% de sulfate d'ammonium entraîne une perte d'environ 5% de l'activité enzymatique, celle à 30% et celle à 35% seulement 0,5% à 1,5%. La précipitation à 35% éliminant davantage de contaminants que celle à 30% a été adoptée.

Une durée de précipitation de 15 minutes à 4°C est suffisante à condition que le mélange soit agité modérément et continuellement. Une durée de 20 minutes n'améliore pas le résultat.

Après centrifugation, le culot contenant les contaminants est éliminé, et l'enzyme malolactique se trouve dans le surnageant. Elle est alors précipitée au sulfate d'ammonium à 70% pendant 20 minutes à 4°C. 0,5% à 3% de l'activité malolactique initiale se retrouvent dans le surnageant de centrifugation, le culot renfermant environ 80% de cette activité.

Au cours de ces trois premières étapes de la purification (élimination des acides nucléiques, précipitation au sulfate d'ammonium à 35% et 70%), en moyenne 20% de l'activité malolactique initiale est perdue, ce qui représente une quantité importante, mais qui est néanmoins inférieure à celle obtenue par Naouri *et al.* [1990a] : 35%, par Chagnaud [1989] : 55% ou par Strasser de Saad *et al.* [1984] : 24%.

Le culot est remis en suspension dans un petit volume de tampon phosphate. Il est déposé sur la colonne de chromatographie de filtration sur gel.

## III-2 CHROMATOGRAPHIE DE FILTRATION SUR GEL

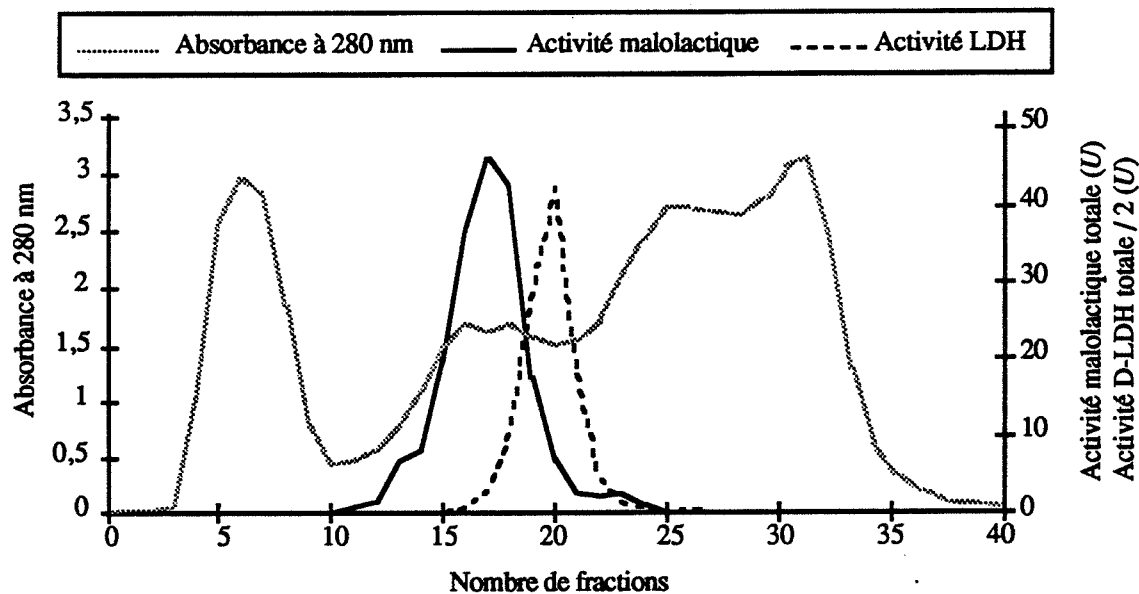
Deux types de gels de filtration ont été testés : Ultrogel AcA 34 et Fractogel TSK HW-55.

### III-2-1 Ultrogel AcA 34

#### III-2-1-1 Séparation

La colonne utilisée a un diamètre de 1,6 cm et une hauteur de 70 cm. L'élution est réalisée avec du tampon phosphate à un débit de 18,6 ml/h. Le volume des fractions est de 3 ml. Le volume de l'extrait est de 3 ml et sa concentration en protéines est de 15 mg/ml.

Le profil d'élution de la colonne de filtration sur Ultrogel AcA 34 est représenté sur la Figure 12.



- Tampon d'élution : tampon phosphate 0,02M, KCl 0,1M, pH 6
- Débit d'élution : 18,6 ml/h
- Volume des fractions : 3 ml, fraction 0 à t = 2 heures
- Colonne : 1,6 x 70 cm
- Echantillon : 3 ml à 15 mg protéines/ml

**Figure 12 :** Chromatographie de filtration sur Ultrogel AcA 34 de l'extrait d'enzyme malolactique de *L. œnos*.

L'absorbance à 280 nm, correspondant à l'absorbance des protéines, est représentée en gris. Le premier pic en noir est celui de l'activité malolactique et le second en pointillés, est celui de l'activité de la D-LDH. Ces protéines ont des propriétés biochimiques et enzymatiques très proches l'une de l'autre et le principal problème est de les séparer. A cette étape, nous avons une séparation intéressante des deux molécules.

Lors de productions plus importantes d'enzyme, l'extrait est divisé en volumes de 3 ml, ce qui nécessite plusieurs chromatographies. C'est pourquoi une colonne de 100 cm de hauteur et 2,6 cm de diamètre a été utilisée, avec un débit de 21 ml/h. Jusqu'à 10 ml d'échantillon peuvent alors être traités sans que la séparation des deux enzymes soit affectée.

Aucune activité L-LDH n'a pu être détectée, ainsi qu'aucune activité de l'enzyme malique, dans les fractions de chromatographie.

Les fractions renfermant l'enzyme malolactique sont réunies et concentrées à l'aide d'ultrafiltres immersibles CX 30 (Millipore). Il faut environ une heure pour réduire à 2 ml, 100 ml d'extrait. Le concentrat forme l'extrait d'enzyme malolactique partiellement purifié qui sera utilisé dans la suite des travaux. Cet extrait est conservé en aliquotes au congélateur.

A l'issue de cette étape de la purification, un bilan peut être établi :

Préparation	Activité D-LDH spécifique (U/mg)	Activité D-LDH totale (U)	Activité malolactique spécifique (U/mg)	Activité malolactique totale (U)	Rendement (% activité malolactique)	Degré de purification de l'enzyme malolactique
Extrait brut	4,03	4592	2,72	3100	100	1
Précipitation (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> •surnageant 35%	3,62	3125	2,98	2573	83	1,1
•culot 70%	3,11	1976	3,96	2511	81	1,46
Chromatographie Ultrogel AcA 34	1,94	505	8,94	2325	75	3,29

Tableau 20 : Purification de l'enzyme malolactique de *L. ænos*.

CULTURE SUR MA	10 litres	5000 U	
↓			
EXTRAIT BRUT	430 ml	3100 U	1140 mg protéines
↓			
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> SURNAGEANT 35 %	432 ml	2573 U	863 mg protéines
↓			
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> CULOT 70 %	21,5 ml	2511 U	634 mg protéines
↓			
CHROMATOGRAPHIE ULTROGEL ACA 34	104 ml	2325 U	260 mg protéines

Schéma 5 : Bilan d'une production type d'enzyme malolactique de *L. ænos*.

L'enzyme malolactique a été purifiée 3,3 fois, avec un rendement de 75%. L'activité D-LDH a été éliminée à 90%. A cette dernière étape de la purification, l'enzyme malolactique n'est pas totalement pure, mais suffisamment pour nous permettre de réaliser les expériences sur le réacteur. Une purification plus poussée, par chromatographie d'affinité ou par chromatographie d'échange d'ions (cf. III-3 et III-4), a pu être mise en œuvre lorsque cela était nécessaire.

### III-2-1-2 Détermination de la masse moléculaire relative

La masse moléculaire relative de l'enzyme malolactique a été déterminée, après étalonnage de la colonne d'Ultrogel AcA 34.

Le gel Ultrogel AcA 34 a une zone de fractionnement linéaire pour des protéines globulaires de 20 000 à 350 000.

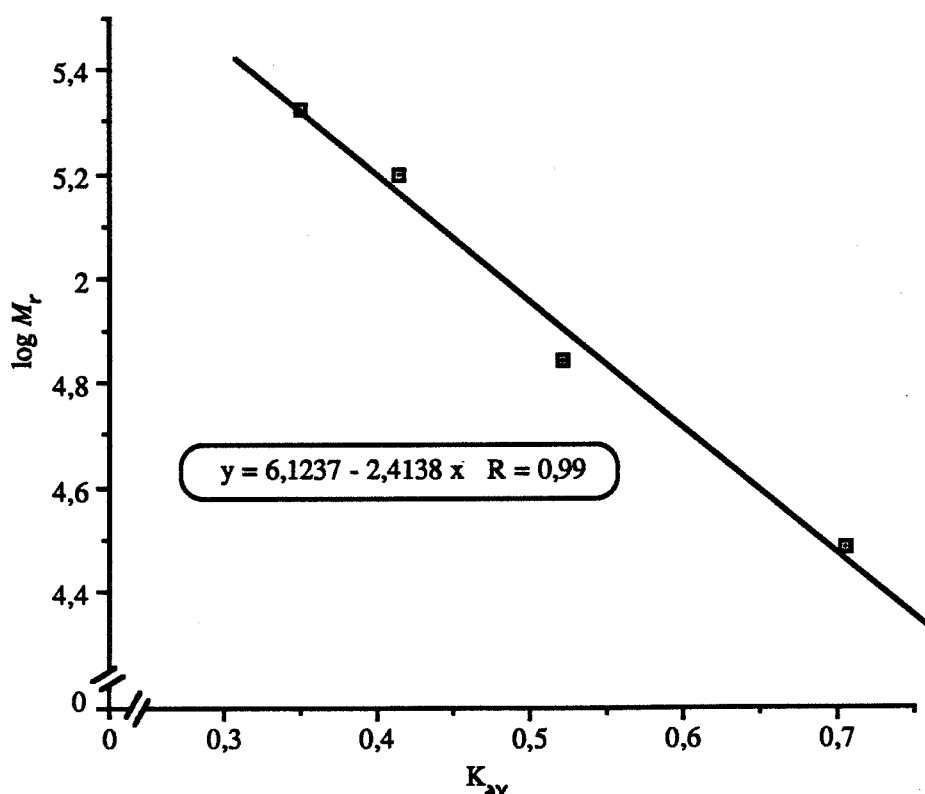
La colonne de 60,7 cm de hauteur et 1,6 cm de diamètre a été étalonnée à l'aide de 100  $\mu$ l de chacun des étalons protéiques Sigma suivants, dans les mêmes conditions que précédemment :

Étalon	Masse moléculaire relative	Concentration (mg/ml)
Anhydrase carbonique	29 000	3
Albumine bovine	66 000	10
Alcool-déshydrogénase	150 000	5
$\beta$ -Amylase	200 000	6

**Tableau 21** : Masse moléculaire relative et concentrations des étalons Sigma utilisés pour l'étalonnage de la colonne d'Ultrogel AcA 34.

A partir du volume mort ( $V_0$ ), du volume total de la colonne ( $V_t$ ) et du volume d'éluion ( $V_e$ ), on obtient le  $K_{av}$  de chaque échantillon :

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$



**Figure 13** : Étalonage de la colonne d'Ultrogel AcA 34. Détermination de la masse moléculaire relative de l'enzyme malolactique.

Pour des composés de densité et de forme moléculaire identiques, il y a une relation linéaire entre le  $K_{av}$  et le logarithme de la masse moléculaire relative. La courbe d'étalonnage  $K_{av} = f(\log M_r)$ , est réalisée à l'aide des protéines étalons (Figure 13). Puis, à partir du  $K_{av}$  de l'enzyme malolactique, on détermine alors sa masse moléculaire relative.

Après chromatographie sur Ultrogel AcA 34 et concentration des fractions actives, 100  $\mu$ l d'extrait enzymatique sont déposés sur la colonne d'Ultrogel AcA 34. Le pic enzymatique très fin permet de déterminer précisément le volume d'élution de l'enzyme.

Son  $K_{av}$  est calculé : 0,416. L'équation de la droite d'étalonnage nous donne le  $\log M_r$  : 5,1196, donc  $M_r = 131\ 700$ .

La masse moléculaire relative de l'enzyme malolactique qui a été partiellement purifiée est d'environ 132 000.

### III-2-2 Fractogel TSK HW-55 (F)

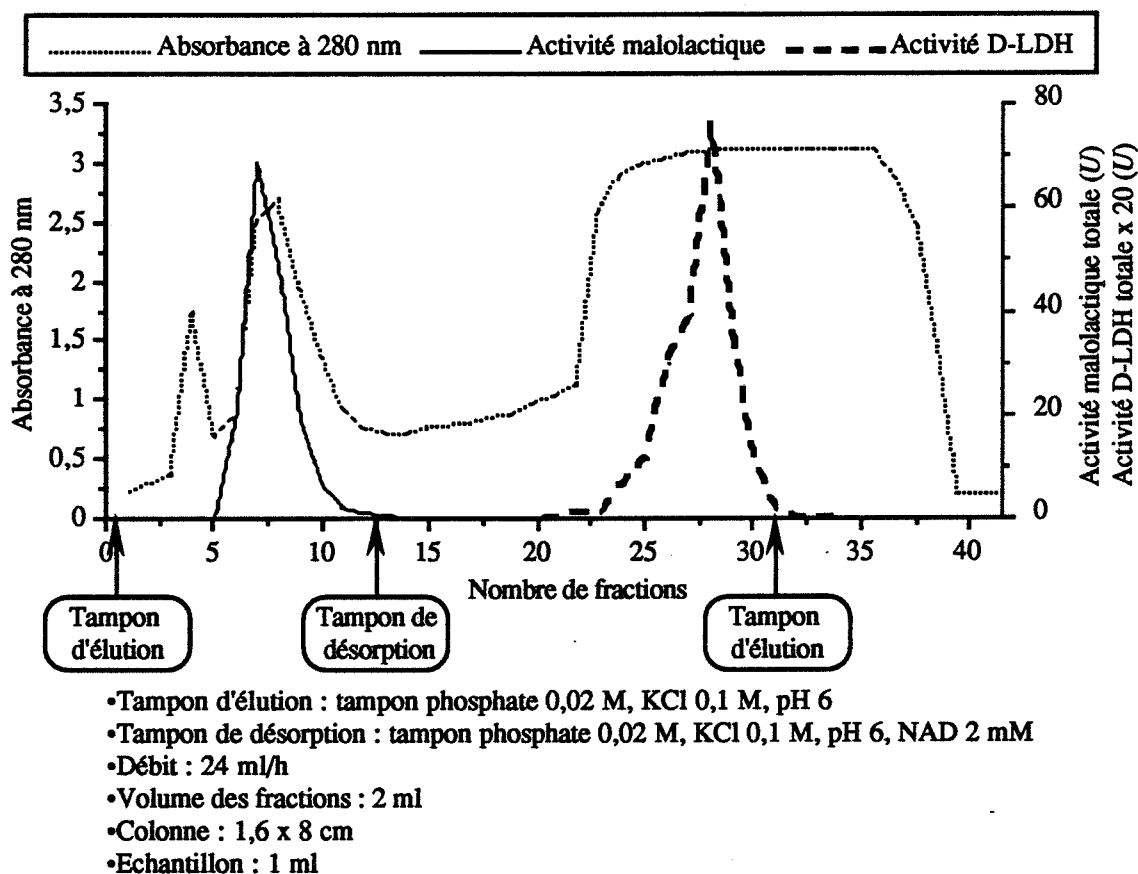
La purification par chromatographie de filtration sur Ultrogel AcA 34 est satisfaisante en ce qui concerne la séparation de l'enzyme malolactique et de la D-LDH. Néanmoins, la durée de la chromatographie est importante : environ 25 heures pour la colonne de 98 cm de hauteur et 2,6 cm de diamètre, et 8 heures pour celle de 60 x 1,6 cm. Nous avons voulu essayer un gel supportant des débits plus importants et ayant des caractéristiques de fractionnement semblables de façon à réduire le temps de chromatographie. Nous avons utilisé le gel : Fractogel TSK HW-55 (F). Ce gel donne un profil chromatographique semblable à celui obtenu avec Ultrogel AcA 34, mais l'activité malolactique et l'activité D-LDH se superposent. Il ne permet donc pas la séparation des deux enzymes et son utilisation a été abandonnée.

Les fractions de chromatographie sur Ultrogel AcA 34 renferment encore une faible quantité de D-LDH. Pour l'éliminer, nous avons essayé deux types de chromatographie : chromatographie d'affinité et chromatographie d'échange d'ions.

### III-3 CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITÉ

Le gel qui a été choisi est celui utilisé par Spettoli *et al.* [1982b], c'est-à-dire le gel AGNAD Type 3.

1 ml d'extrait enzymatique issu des fractions actives concentrées de la chromatographie sur Ultrogel AcA 34, est déposé sur la colonne, et entraîné par le tampon d'élution. Lorsque l'enzyme malolactique est éluee, le tampon de désorption est appliqué. Ce tampon va permettre de désorber la D-LDH. L'absorbance à 280 nm sature à cause de la présence du NAD. La colonne est ensuite rincée avec le tampon d'élution. Le profil d'élution de la colonne de chromatographie d'affinité est représenté sur la Figure 14.



**Figure 14 :** Chromatographie d'affinité sur AGNAD Type 3 de l'extrait d'enzyme malolactique de *L. œnos*.

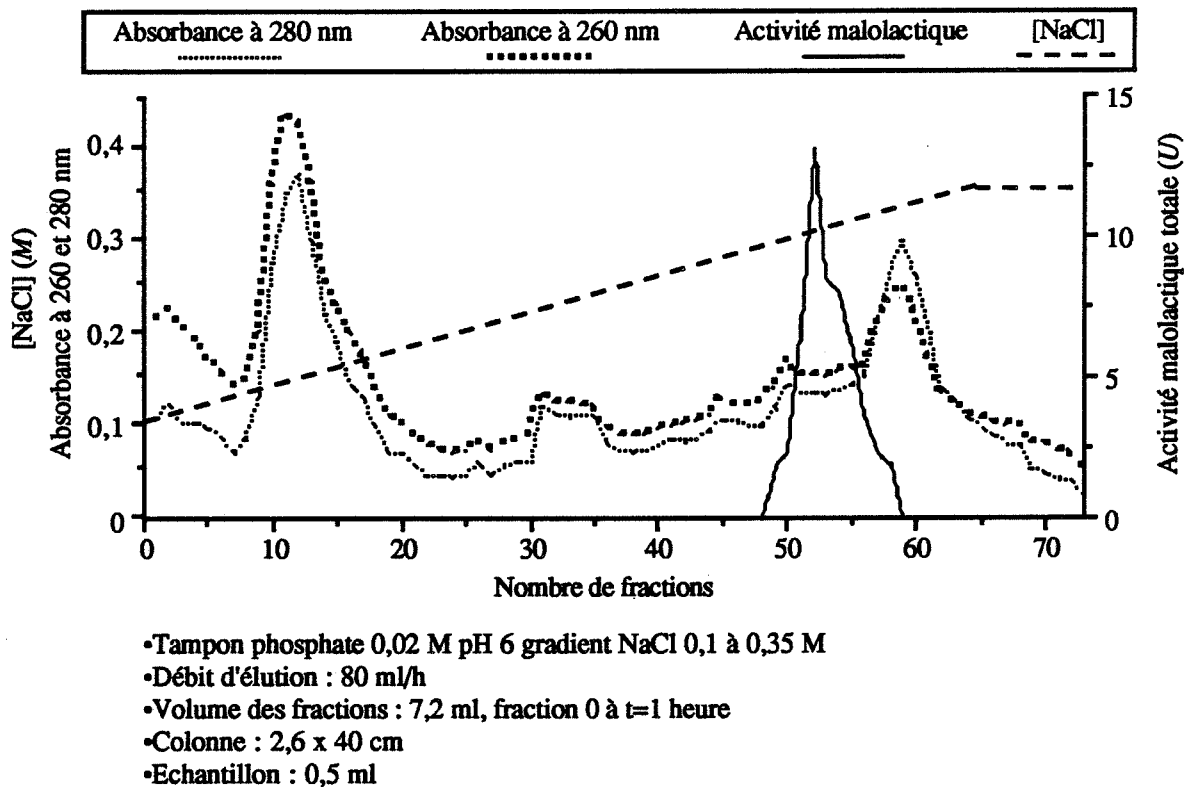
A l'issue de cette chromatographie, les fractions actives vis-à-vis de l'enzyme malolactique sont réunies et concentrées à l'aide d'ultrafiltres immerseables CX 30. Toute l'activité D-LDH a été éliminée. L'activité malolactique est conservée à 80%. Malgré tout, l'extrait n'est pas encore pur. L'électrophorèse de l'extrait malolactique montre encore cinq bandes. Par contre, l'électrophorèse des fractions contenant la D-LDH montre une seule bande. Cette technique est excellente pour purifier la D-LDH.

### III-4 CHROMATOGRAPHIE D'ÉCHANGE D'IONS

La chromatographie d'échange d'ions sur Q Sepharose Fast Flow a été utilisée pour essayer d'améliorer la purification de l'enzyme.

Un demi-millilitre d'extrait provenant des fractions concentrées de chromatographie sur Ultrogel AcA 34, est appliqué au sommet de la colonne. L'éluant est du tampon phosphate 0,02 M pH 6, avec, la première heure, du NaCl 0,1 M, puis un gradient linéaire de 0,1 à 0,35 M en NaCl pendant six heures et enfin du NaCl 0,35 M la dernière heure. La Figure 15 montre le profil d'éluion de la colonne échangeuse d'anions.





**Figure 15 :** Chromatographie d'échange d'ions sur Q Sepharose Fast Flow de l'extrait d'enzyme malolactique de *L. œnos*.

Les fractions de chromatographie, actives vis-à-vis de l'enzyme malolactique, sont réunies et concentrées à l'aide d'ultrafiltres immersibles CX 30. Aucune activité D-LDH n'a pu être mesurée et l'activité malolactique initiale est restituée à 54%.

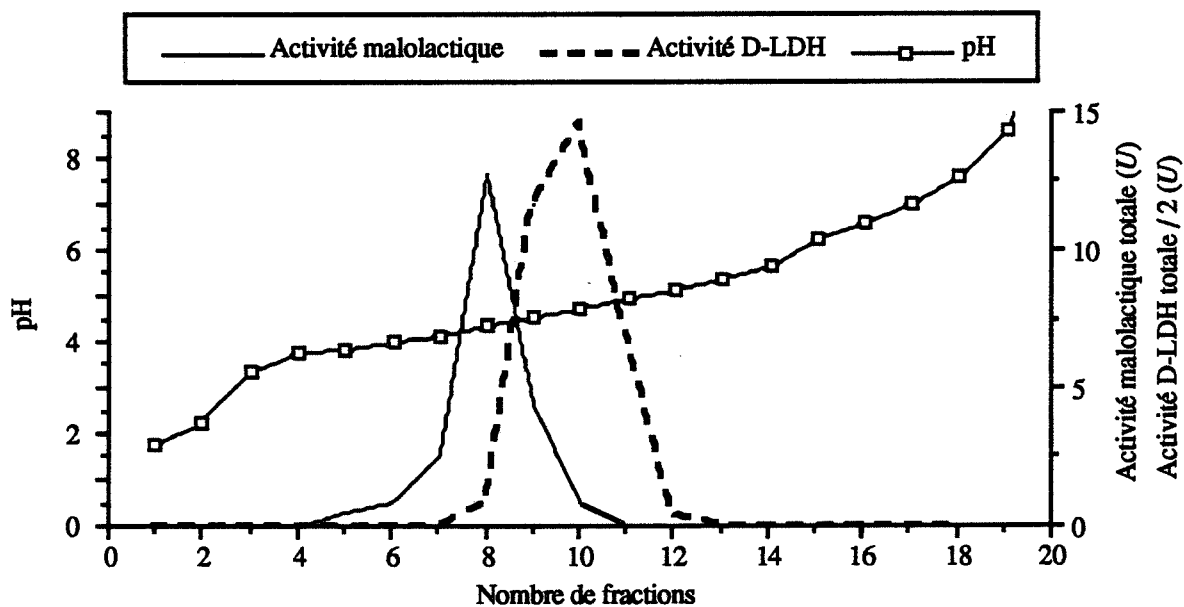
L'enzyme malolactique n'est pas encore totalement pure, mais la purification semble meilleure avec cette technique, qu'avec la précédente. Le profil d'élution montre, en début de chromatographie, la séparation d'un produit ayant une forte absorbance à 260 nm. Il s'agit du NAD lié très étroitement à l'enzyme (cf. IV-4-1).

### III-5 ÉLECTROFOCALISATION PRÉPARATIVE

L'appareil, le Rotofor (BIO-RAD), permet de réaliser l'électrofocalisation préparative de l'enzyme malolactique et en même temps de déterminer son point isoélectrique. L'échantillon testé provient des fractions concentrées de chromatographie sur Ultrogel AcA 34, actives vis-à-vis de l'enzyme malolactique. Le profil d'électrofocalisation est représenté sur la Figure 16.

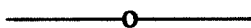
Cette technique ne sépare pas très bien l'enzyme malolactique de la D-LDH. Le pH de la fraction ayant l'activité malolactique la plus importante, la fraction 8, est de 4,36. Le pH de la fraction ayant l'activité D-LDH la plus importante, la fraction 10, est de 4,72. Donc le

$pI$  de l'enzyme malolactique est d'environ 4,35, et celui de la D-LDH est d'environ 4,7. Ces deux enzymes ont des  $pI$  très proches ce qui explique la difficulté que l'on a à les séparer. Par ailleurs, le  $pI$  de l'enzyme malolactique correspond à celui trouvé par d'autres auteurs (cf. Tableau 4).



- 2,2 ml d'ampholytes à 40%,  $pI$  de 4 à 6, dans 43 ml tampon phosphate 0,002 M pH 6
- 50 U d'enzyme malolactique
- Electrolyte anode : acide phosphorique 0,1 M
- Electrolyte cathode : soude 0,1 M
- Temps de focalisation : 5 h, puissance constante : 12 W, tension variable de 250 à 760 V

**Figure 16 :** Électrofocalisation de l'extrait d'enzyme malolactique de *L. œnos*.





## CHAPITRE IV

### ACTIVITÉ DE L'ENZYME MALOLACTIQUE

#### IV-1 MILIEU DE MESURE DE L'ACTIVITÉ MALOLACTIQUE

Le milieu de mesure de l'activité malolactique que nous employons correspond à celui utilisé par Lonvaud-Funel [1986]. Il a les concentrations suivantes :

- 22 mM d'acide malique
- 0,45 mM de NAD
- 0,09 mM de manganèse.

Il est tamponné à pH 6, voisin du pH optimum de l'enzyme, avec du tampon phosphate 0,05 M.

La mesure de l'activité malolactique doit être faite en vitesse initiale, la concentration de chaque participant (acide malique, NAD, manganèse) doit être saturante.

Nous avons vérifié que notre milieu de mesure satisfaisait à ces conditions. Nous avons fait varier la concentration de l'acide malique de 0 à 30 mM, du NAD de 0 à 0,6 mM et du manganèse de 0 à 0,2 mM. La vitesse ne varie plus à partir de 15 mM en acide malique, 0,3 mM en NAD et 0,04 mM en manganèse.

#### IV-2 CONSERVATION DE L'ACTIVITÉ MALOLACTIQUE AU COURS DU TEMPS

L'étude a été faite à différents niveaux :

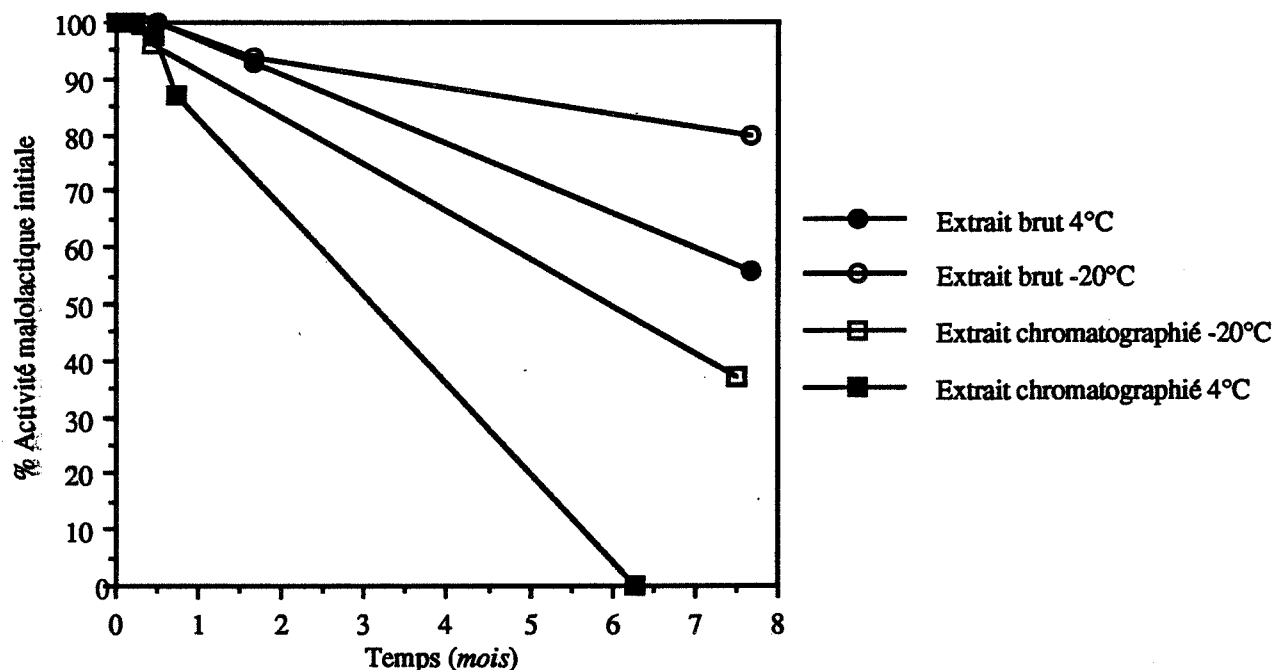
- conservation à 4°C ou à -20°C,
- conservation des extraits bruts ou des extraits chromatographiés,
- conservation des extraits chromatographiés non concentrés, concentrés ou lyophilisés.

##### IV-2-1 Conservation en fonction de la température et de l'étape de purification

Cette expérience a été réalisée sur les extraits bruts d'enzyme malolactique, c'est-à-dire, les surnageants des broyats obtenus après désintégration aux ultrasons et sur les extraits chromatographiés. Les extraits chromatographiés sont constitués de la réunion des fractions de chromatographie sur Ultrogel AcA 34 ayant une activité malolactique.

La conservation a été testée à 4°C, au réfrigérateur, ou à -20°C, au congélateur.

La Figure 17 montre que l'extrait brut enzymatique se conserve aussi bien au réfrigérateur qu'au congélateur, pendant environ un mois et demi. A cette date, on retrouve 93% de l'activité malolactique initiale.



**Figure 17 :** Conservation des extraits bruts et des extraits chromatographiés d'enzyme malolactique, à 4°C ou à -20°C.

Lorsque l'on veut conserver l'extrait brut pendant un temps beaucoup plus long, il est préférable de le faire au congélateur. De cette façon, après huit mois, il reste encore 80% de l'activité initiale, alors qu'à 4°C, il ne reste que 56%.

Les extraits chromatographiés se conservent, eux aussi, plus longtemps au congélateur qu'au réfrigérateur : au bout de six mois à 4°C il n'y a plus d'activité, alors qu'à -20°C il en reste 50%.

Les extraits bruts se conservent mieux que les extraits chromatographiés. Au bout de huit mois, ces derniers n'ont gardé que 37% de leur activité malolactique initiale, alors que les extraits bruts en ont conservé 80% , à -20°C.

#### IV-2-2 Conservation des extraits chromatographiés

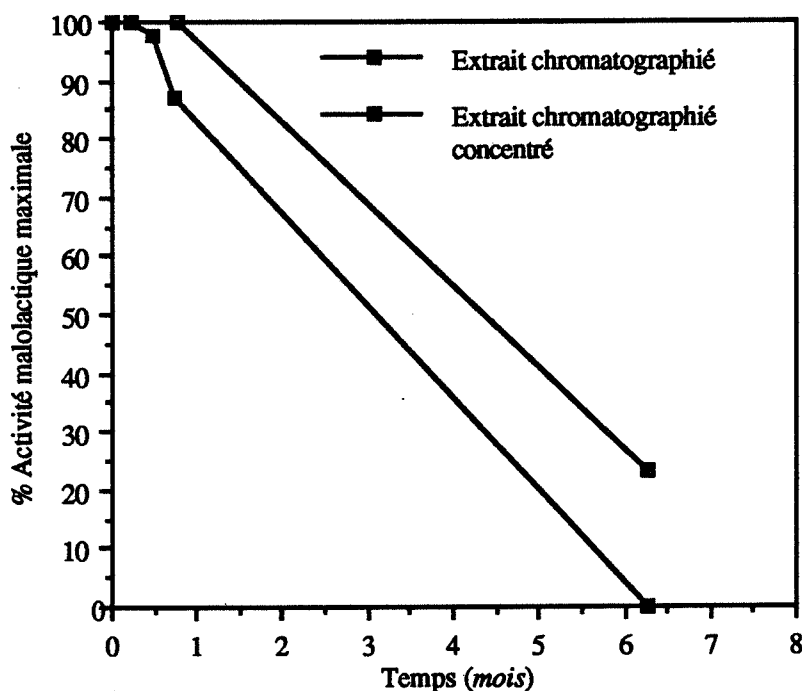
Comme nous l'avons vu précédemment, les extraits chromatographiés perdent assez rapidement leur activité. Nous avons essayé d'améliorer leur conservation en testant deux techniques : la lyophilisation et la concentration des échantillons.

La lyophilisation des extraits chromatographiés entraîne une perte de 70% de l'activité initiale.

La lyophilisation des extraits chromatographiés en présence de 22 mM d'acide malique permet de garder 53% de l'activité initiale.

L'acide malique améliore la conservation des extraits chromatographiés lyophilisés. Néanmoins, le gain n'est pas suffisant, et la lyophilisation a été abandonnée.

Après réunion des fractions actives de chromatographie, ces dernières ont été concentrées à l'aide d'ultrafiltres immersibles CX 30. La conservation à 4°C des extraits chromatographiés concentrés a été comparée avec celle des extraits non concentrés.



**Figure 18 :** Conservation des extraits chromatographiés concentrés ou non, à 4°C.

La Figure 18 montre que la concentration des échantillons améliore leur conservation. Non concentrés ils n'ont plus d'activité au bout de six mois, alors que sous forme concentrée, 25% de l'activité initiale est retrouvée.

Nous avons vu en II-3 que le culot bactérien devait être traité aux ultrasons, immédiatement après la récolte. Un traitement différé de deux jours entraînait une perte de 30% de l'activité malolactique.

En général, lors de productions massives d'enzyme, les extraits bruts sont divisés en volumes de 40 à 50 ml, congelés séparément, et purifiés en fonction des besoins.

Si des extraits chromatographiés doivent être conservés, ils sont concentrés et congelés.

### IV-3 ÉTUDE CINÉTIQUE DE L'ENZYME MALOLACTIQUE

#### IV-3-1 Détermination des constantes cinétiques

Trois composés interviennent dans la réaction malolactique :

- le substrat : l'acide malique,
- les coenzymes : le NAD et le manganèse.

L'enzyme malolactique a une affinité différente pour chacun de ces partenaires. Les constantes de Michælis et Menten,  $K_m$ , et les vitesses maximales de réaction,  $V_{max}$ , ont été déterminées. A concentration saturante en deux des composés, on fait varier la concentration du troisième, ceci pour chacun des trois. Les Figures 19, 20 et 21 sont les représentations selon Lineweaver et Burk, en coordonnées inverses de la vitesse de réaction en fonction de la concentration en chacun des "substrats". L'équation des droites obtenues donne, pour  $y = 0$  :  $x = -1/K_m$ , et pour  $x = 0$  :  $y = 1/V_{max}$ .

$K_m$ acide malique = 1,97 mM $K_m$ NAD = $6,48 \cdot 10^{-3}$ mM $K_m$ manganèse = $1,08 \cdot 10^{-3}$ mM $V_{max}$ = 4,2 U/mg
---

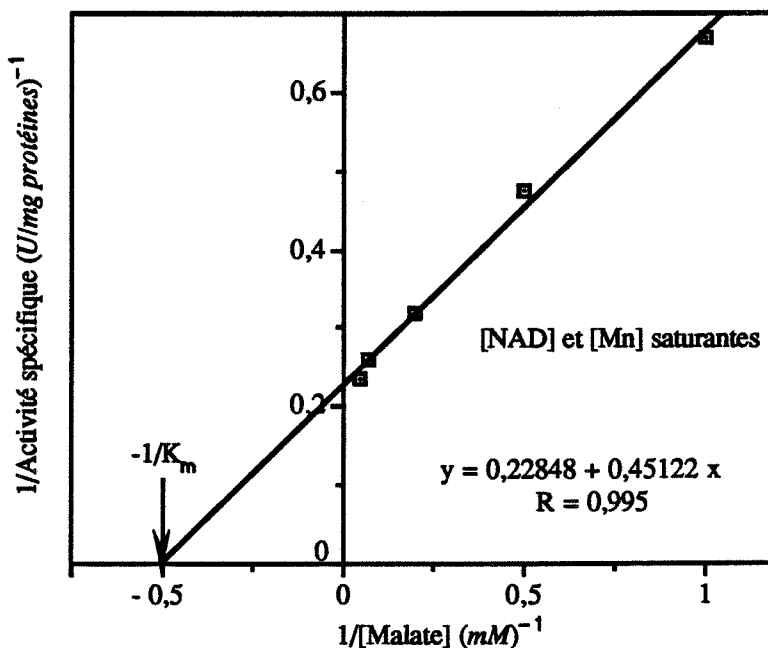


Figure 19 : Détermination selon Lineweaver et Burk de  $K_m$  et  $V_{max}$  de l'enzyme malolactique pour l'acide malique.

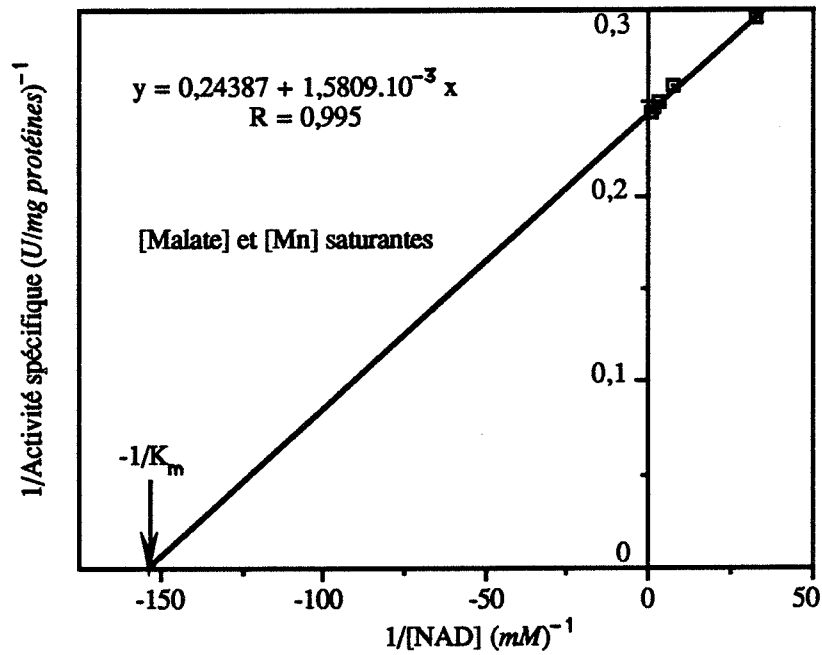


Figure 20 : Détermination selon Lineweaver et Burk de  $K_m$  et  $V_{max}$  de l'enzyme malolactique pour le NAD.

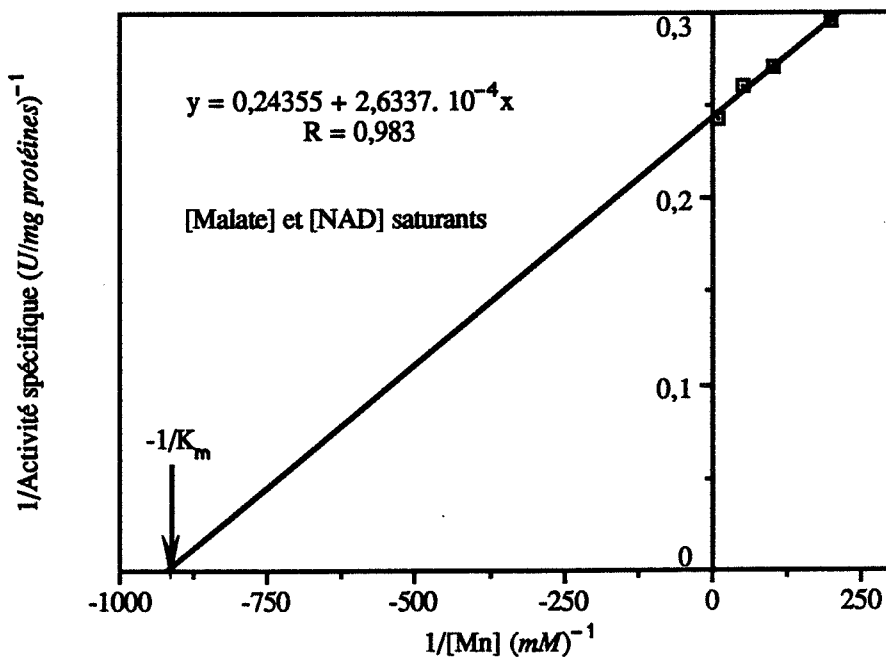


Figure 21 : Détermination selon Lineweaver et Burk de  $K_m$  et  $V_{max}$  de l'enzyme malolactique pour le manganèse.



#### IV-3-2 Étude de l'activité malolactique en fonction du pH

L'étude a été faite en faisant varier la concentration en acide malique de 2,5 à 30 mM, avec des concentrations en NAD (0,45 mM) et en manganèse (0,09 mM) constantes, à différents pH : 3, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 7.

Quel que soit la concentration en acide malique, le **pH optimum** ne varie pas et se situe aux environs de **5,5** (Figure 22).

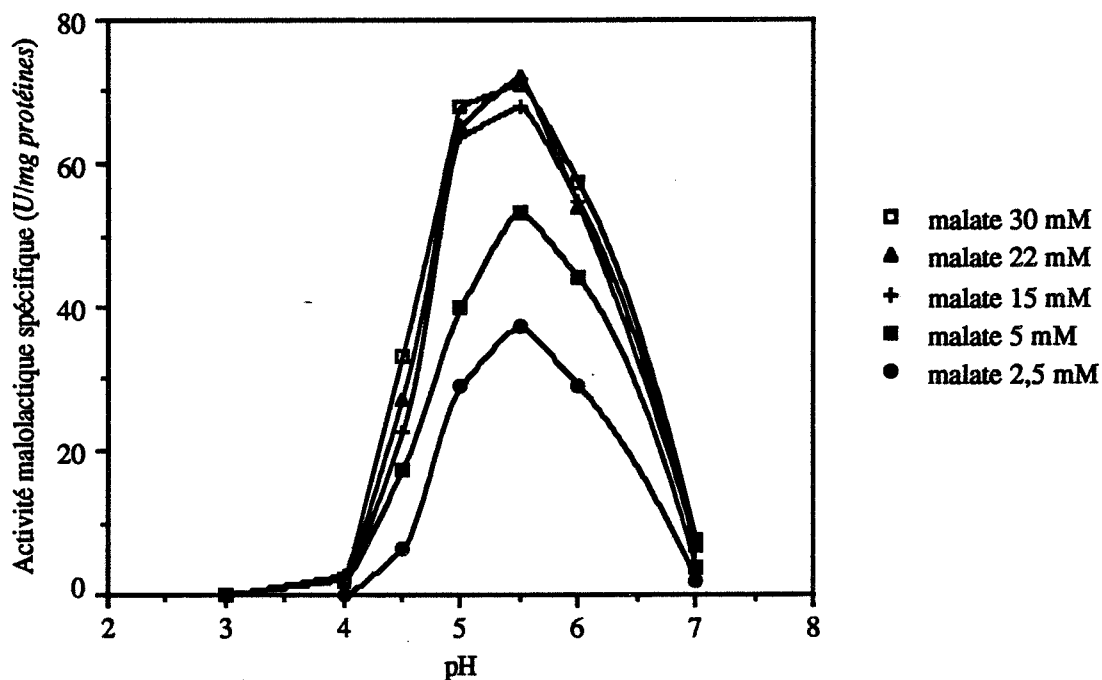


Figure 22 : Évolution de l'activité malolactique en fonction du pH pour différentes concentrations en acide malique.

#### IV-4 IMPORTANCE DU NAD

Quelques expériences sommaires ont été réalisées pour essayer d'élucider le rôle du NAD dans la réaction malolactique.

##### IV-4-1 Activité malolactique en absence de NAD

Chagnaud [1989] montre que les extraits bruts d'enzymes ont une activité malolactique en absence de NAD, 30% inférieure à celle obtenue avec du NAD. Il attribue ce fait à la présence de NAD dans l'extrait enzymatique non purifié.

Le NAD est-il réellement présent dans les extraits non purifiés ?

Peut-on avoir une réaction malolactique, même faible, sans NAD ?

Nous avons voulu vérifier la nécessité du NAD dans la réaction malolactique en testant l'activité de l'enzyme à différents stades de purification, avec ou sans NAD (Tableau 22).



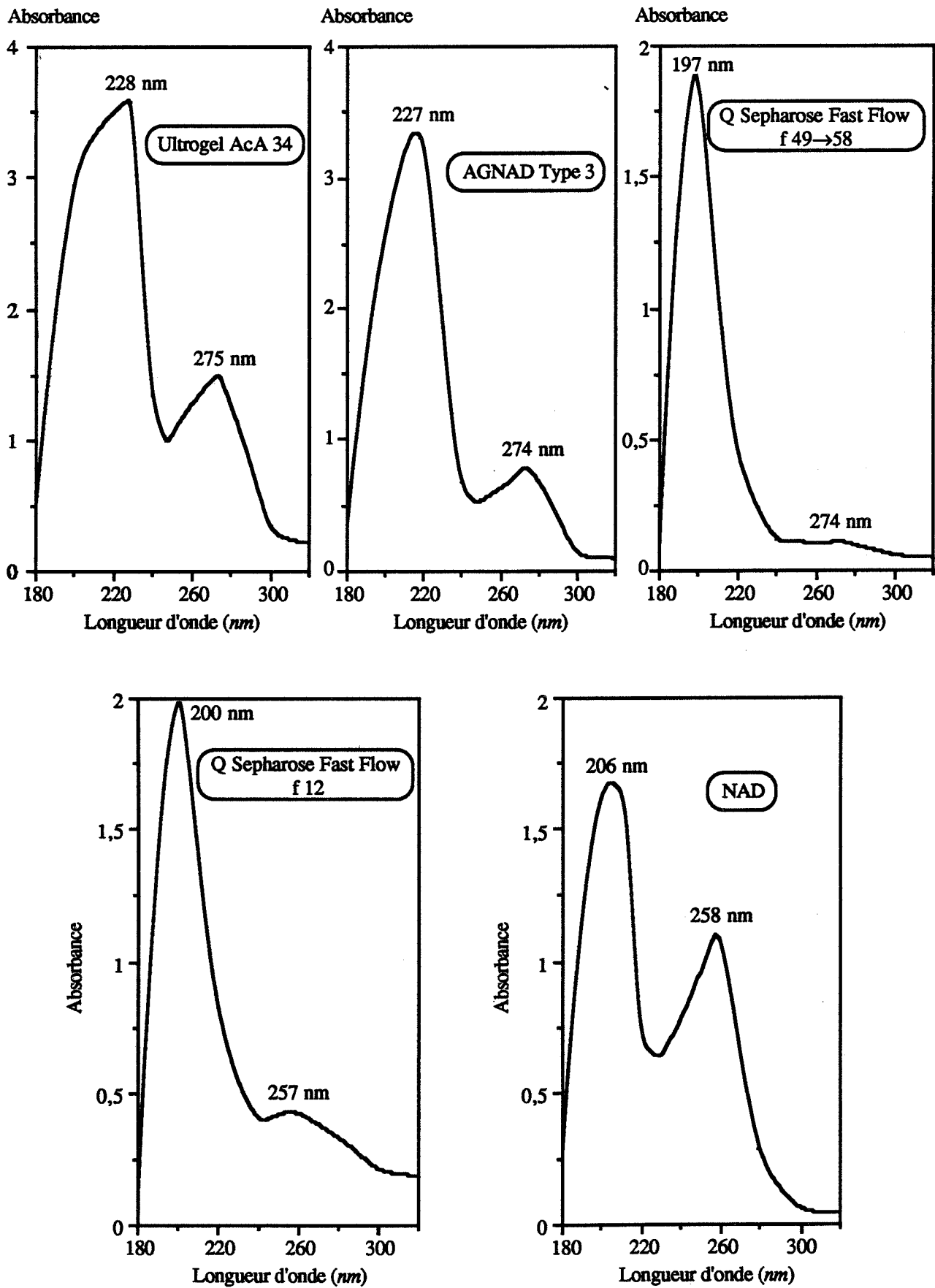


Figure 23 : Spectres UV des différents extraits d'enzyme malolactique et du NAD.

Si l'on regarde le profil d'élution de la colonne de chromatographie sur Q Sepharose Fast Flow (Figure 15), on remarque une forte absorbance aux environs de 260 nm pour les fractions 10 à 15. Le spectre de la fraction 12 montre un premier maximum à 200 nm, puis un second à 257 nm. Ce spectre ressemble beaucoup à celui du NAD seul.

Le spectre du NAD seul montre un premier maximum d'absorption à 206 nm, puis un second à 258 nm. Le pic à 258 nm correspond au NAD.

Nous avons vérifié que la fraction 12 renfermait bien du NAD en remplaçant, dans un test de dosage de l'acide L-lactique, les 50 µl de NAD par 50 µl de fraction. La réaction a lieu et correspond à une concentration de 0,024 mM en NAD dans la fraction 12.

Ces expériences et ces observations montrent que du NAD se trouve fixé à l'enzyme malolactique. Cette fixation semble suffisamment forte pour ne pas être affectée par la chromatographie de filtration sur gel, ni par la chromatographie d'affinité. Le changement de force ionique intervenant au cours de la filtration sur échangeur d'ions permet de détacher le NAD de l'enzyme.

#### IV-4-2 Remplacement du NAD

Nous avons voulu savoir si la molécule de NAD dans sa totalité, était indispensable à la réaction malolactique, ou si l'un de ses composants pouvait le remplacer.

L'adénine, la nicotinamide, l'acide nicotinique, l'adénosine monophosphate seul et en mélange avec la nicotinamide ont été testés. Aucun de ces composants ne permet d'obtenir une activité malolactique. Donc le NAD dans sa totalité semble bien indispensable à l'enzyme malolactique.

#### IV-4-3 Rôle du NAD

Tous les auteurs sont arrivés à la même conclusion : le NAD intervient dans la réaction malolactique, il est indispensable, mais aucune réduction de ce NAD n'a pu être mesurée.

Nous avons, nous aussi, essayé de mesurer une réduction du NAD lors de la réaction malolactique. Lorsque l'on travaille en vitesse initiale, durant les cinq premières minutes de réaction, aucune augmentation de l'absorbance à 340 nm, maximum d'absorption du NADH, n'a pu être observée, donc aucune réduction du NAD. En général, la réaction est arrêtée au bout de cinq minutes.

Nous avons prolongé la réaction et affiner nos observations. Le milieu de mesure de l'activité malolactique est introduit dans une cuve de spectrophotomètre, la cuve témoin contenant du tampon phosphate. La réaction malolactique démarre lorsque de l'enzyme malolactique provenant de fractions concentrées de chromatographie sur échangeur d'ions

est introduite dans la cuve. Un spectre est pris toutes les cinq minutes. Une expérience témoin est faite en absence d'enzyme malolactique.

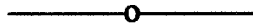
On observe une très faible élévation de l'absorbance à 340 nm. Cette augmentation correspond à l'apparition de 0,008 mM de NADH après 10 minutes et se stabilise à 0,014 mM à partir de 15 minutes. Le milieu de mesure de l'activité malolactique contenant 0,45 mM de NAD, le NADH formé correspond à 3% du NAD de départ. Dans la cuve témoin, l'augmentation d'absorbance est nulle.

Mc Cord et Ryu [1986] mentionnent une apparition de NADH correspondant à 0,1-0,2% de l'activité malolactique.

Peut-on considérer les valeurs de NADH apparues comme nulles, ou, sont-elles des indicateurs d'une réaction qui impliquerait d'autres partenaires que l'enzyme malolactique ?

Pour répondre à ces questions, une étude beaucoup plus approfondie de la réaction malolactique est nécessaire.

La compréhension de la réaction malolactique passe par la définition du rôle du NAD qui n'est toujours pas élucidé.



## CHAPITRE V

### CONCLUSIONS À LA PRODUCTION D'ENZYME

#### PRINCIPAUX RÉSULTATS

##### V-1 PRODUCTION BACTÉRIENNE

L'identification de *L. ænos* a été faite à l'aide des galeries API 50 CH. Le milieu API 50 CHL a été remplacé par un milieu MRS basal à pH 6 coloré au pourpre de bromocrésol.

Les cultures sont conservées en milieu MRS liquide à 4°C.

La préculture est faite sur 1 litre de milieu de base à 28°C sans agitation pendant 24 heures (absorbance à 650 nm : 0,5).

La culture est réalisée en fermenteur de 10 litre sur milieu acide à 28°C avec une agitation minimale pendant 60 heures.

Dans ces conditions la production moyenne d'enzyme est de 0,5 U/ml de milieu de culture, avec une production maximale de 0,72 U/ml.

##### V-2 EXTRACTION ET PURIFICATION DE L'ENZYME MALOLACTIQUE

La culture est concentrée et lavée dans un ultrafiltre à fibres creuses, puis centrifugée.

Le culot bactérien dilué dans du tampon phosphate est immédiatement soumis à une désintégration aux ultrasons pendant 15 minutes à 4°C. Après centrifugation, l'opération est renouvelée deux fois sur les culots. Les surnageants réunis contiennent l'enzyme malolactique et constituent l'extrait brut d'enzyme malolactique.

Le lysozyme n'améliore pas notablement l'extraction de l'enzyme.

L'extrait brut est traité à la DNase I à 1 mg/ml, à température ambiante pendant 15 minutes, ce qui coupe les acides nucléiques et rend le mélange moins visqueux.

Une partie des contaminants est éliminée par précipitation au sulfate d'ammonium à 35% à 4°C pendant 15 minutes.

L'enzyme malolactique est précipitée au sulfate d'ammonium à 70% à 4°C pendant 20 minutes.

Le culot est remis en suspension et filtré sur une colonne d'Ultrogel AcA 34. Les fractions actives vis-à-vis de l'enzyme malolactique sont réunies et concentrées à l'aide d'ultrafiltres Immersible CX 30. A partir d'une culture type de *L. ænos* sur 10 litres de MA, nous obtenons 260 mg d'enzyme malolactique ayant une activité totale de 2325 U. L'activité spécifique est de 8,94 U/mg. Le rendement de la purification est de 75%. L'enzyme a été purifiée 3,3 fois. C'est cet extrait enzymatique partiellement purifié qui a été utilisé pour l'étude de l'activité malolactique et pour la fabrication des réacteurs.

La masse moléculaire relative de l'enzyme malolactique a été estimée à 132 000 et son point isoélectrique à pH 4,35.

La purification peut être améliorée. La chromatographie d'affinité sur AGNAD Type 3 élimine rapidement la D-LDH. La chromatographie sur échangeur d'ions : Q Sepharose Fast Flow donne une enzyme plus pure.

### V-3 ACTIVITÉ MALOLACTIQUE

Le milieu de mesure de l'activité malolactique est composé de 22 mM d'acide malique, de 0,45 mM de NAD, de 0,09 mM de manganèse dans du tampon phosphate à pH 6. La mesure se fait à 25°C.

L'activité des extraits bruts est conservée à 80% pendant huit mois à -20°C et à 56% à 4°C.

L'activité des extraits chromatographiés est conservée à 56% pendant 8 mois à -20°C et est nulle au bout de 6 mois à 4°C. La conservation est meilleure si les extraits sont concentrés.

Le  $K_m$  de l'enzyme malolactique pour les différents partenaires a été déterminé, ainsi que  $V_{max}$  :

$$K_{m\text{acide malique}} = 1,97 \text{ mM}$$

$$K_{m\text{NAD}} = 6,48 \cdot 10^{-3} \text{ mM}$$

$$K_{m\text{manganèse}} = 1,08 \cdot 10^{-3} \text{ mM}$$

$$V_{max} = 4,2 \text{ U/Mg}$$

Le pH optimum de l'enzyme est de 5,5.

Le NAD est nécessaire à la réaction, il ne peut pas être remplacé par l'un de ses composants.

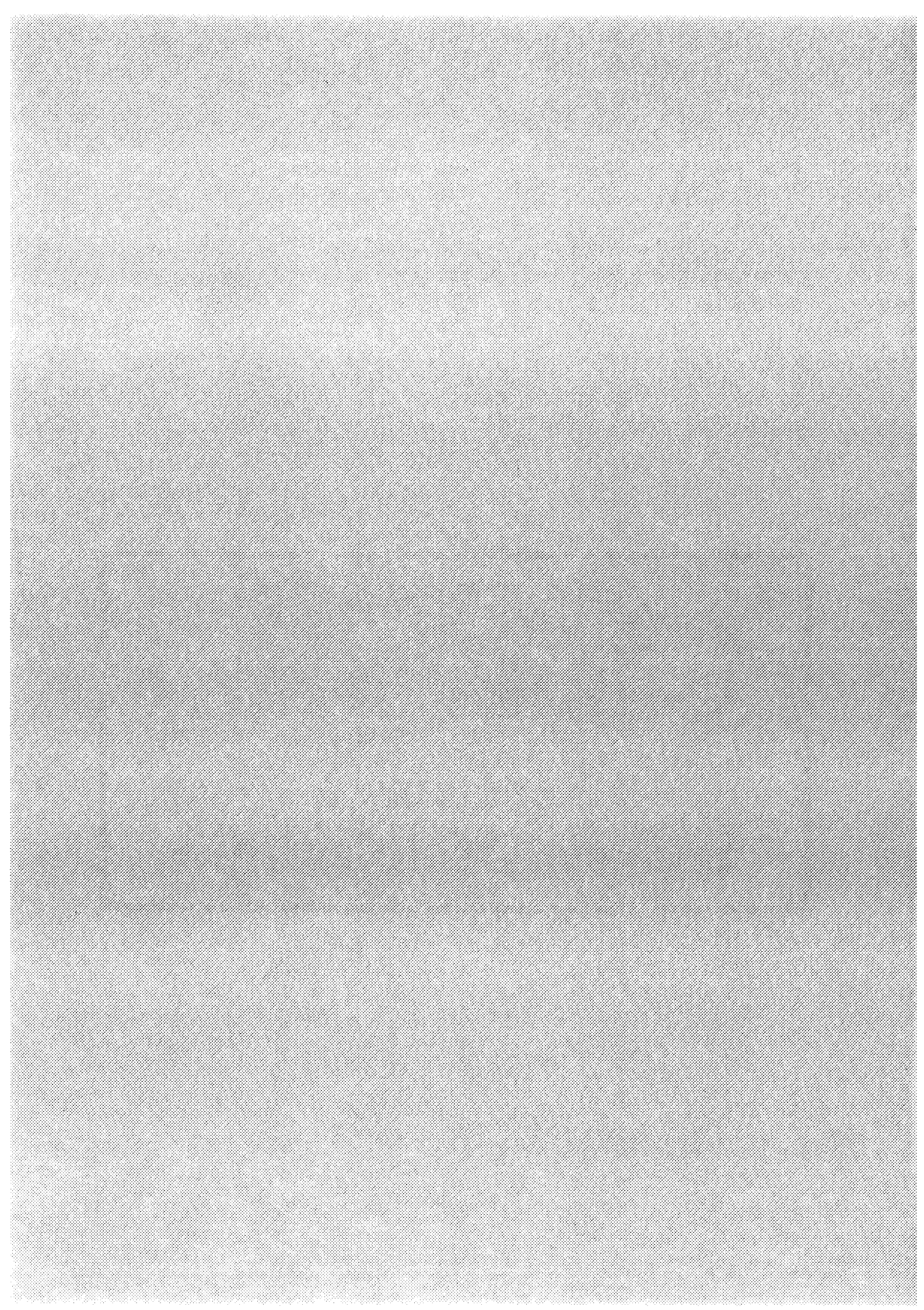
Une réduction globale du NAD n'a pas pu être mesurée. Une faible quantité de NADH se forme pendant les quinze premières minutes de la réaction et correspond à 3% du NAD de départ.

# RÉSULTATS

Deuxième Partie

Réacteur à  
Enzyme Malolactique





## CHAPITRE I

### IMMOBILISATION DE L'ENZYME MALOLACTIQUE

Une fois que la production d'enzyme malolactique a été mise au point, nous disposons de quantités suffisantes d'enzyme pour débiter l'étude du réacteur à enzyme immobilisée.

Après des essais préliminaires de fixation d'enzyme malolactique sur de petites surfaces, le premier réacteur a été testé.

#### I-1 IMMOBILISATION SUR UNE SURFACE RÉDUITE

Deux types de membranes ont été utilisées :

- membranes planes Pall,
- fibres creuses de polyamide.

##### I-1-1 Immobilisation sur membrane Pall

La membrane Pall est une membrane de polyamide préactivée. La fixation d'enzyme peut se faire directement.

La nature des groupes actifs présents sur la membrane est confidentielle, mais les fournisseurs indiquent que la fixation peut se produire avec différents groupements en fonction du pH. A des pH alcalins, ce sont les groupements amines de l'enzyme qui réagissent avec les groupements actifs de la membrane, à des pH neutres, ce sont les groupements hydroxyles et à des pH acides, les groupements carboxyles [Kumaran, 1991]. Dans notre cas, la fixation se fait à pH 6, donc l'enzyme malolactique est fixée à la membrane par l'intermédiaire de ses groupements carboxyles.

Un mélange de glutaraldéhyde (1,25%), d'albumine (5%) et d'enzyme malolactique (0,1 U) dans du tampon phosphate pH 6, est déposé directement sur la membrane de 0,5 cm<sup>2</sup>, pendant 10 minutes. Après 4 rinçages de 5 minutes dans du tampon phosphate, la membrane entière est introduite dans la cellule de mesure de  $pCO_2$  pour déterminer son activité.

Une membrane ayant reçu 0,1 U d'enzyme malolactique a une activité de 0,019 U après immobilisation. Donc 19% de l'activité initialement déposée se retrouve à la surface de la membrane.

Les membranes ainsi traitées sont conservées dans du tampon phosphate au réfrigérateur et leur activité est testée périodiquement (Figure 24).

##### I-1-2 Immobilisation sur fibres creuses de polyamide

Des fibres creuses provenant d'ultrafiltres U 2000 sont découpées en morceaux de 2 cm de longueur et traitées selon la technique de fixation d'enzymes décrite en VI-1-1 du

Matériels et Méthodes. 5 U d'enzyme sont utilisées pour 10 fibres. Les fibres sont conservées dans du tampon phosphate, au réfrigérateur, comme les membranes.

La Figure 24 montre l'évolution de l'activité résiduelle des fibres et des membranes au cours du temps.

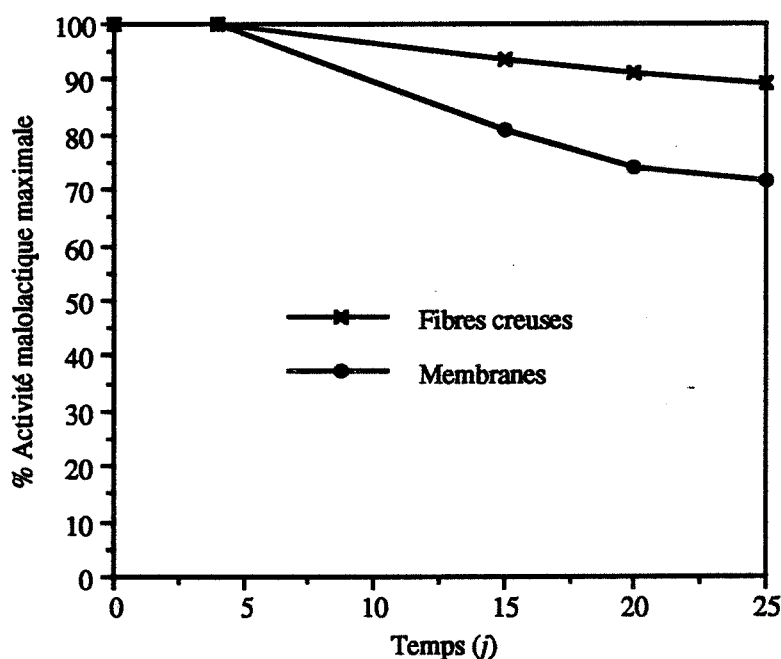


Figure 24 : Évolution de l'activité malolactique au cours du temps après immobilisation sur membranes Pall ou sur fibres creuses de polyamide.

Ces deux expériences préliminaires montrent que l'enzyme malolactique peut être immobilisée sur des membranes de polyamide, activées ou non. Les deux techniques de fixation testées sont efficaces. La fixation est stable pendant environ un mois. La fixation sur fibres creuses de polyamide semble meilleure car au bout de 25 jours, il reste encore 90% de l'activité initiale, alors que sur membrane Pall on retrouve 72%. Des phénomènes d'adsorption et de désorption peuvent expliquer en partie la baisse plus importante de l'activité sur membrane Pall.

Après ces premiers essais encourageants, nous avons essayé de fixer l'enzyme malolactique à l'intérieur des fibres creuses d'un ultrafiltre U 2000.

## I-2 IMMOBILISATION SUR ULTRAFILTRE U 2000

Les filtres à fibres creuses sont maintenant couramment employés comme réacteurs. Ils permettent l'utilisation d'une surface importante dans un espace réduit. Ils peuvent être équipés d'un ou de deux circuits, le premier à l'intérieur, le second à l'extérieur des fibres creuses.

Nous avons choisi les ultrafiltres U 2000 de Gambro car d'une part, le laboratoire en avait quelques uns, et d'autre part, parce qu'ils possédaient deux circuits.

Les ultrafiltres U 2000 sont composés de fibres creuses de polyamide. Nous avons montré précédemment que la fixation de l'enzyme malolactique était possible sur ce type de support.

L'enzyme malolactique est fixée selon la technique de fixation d'enzymes décrite en VI-1-1 du Matériels et Méthodes, à l'intérieur des fibres creuses.

Nous avons alors mis au point une technique de prise d'échantillon pour pouvoir tester l'efficacité du réacteur.

### **I-2-1 Technique de prise d'échantillons**

Pour cette première expérience, le milieu à traiter correspond au milieu de mesure de l'activité malolactique, c'est-à-dire, le substrat : malate à 22 mM, les coenzymes : NAD à 0,45 mM et manganèse à 0,09 mM, dans du tampon phosphate à pH 6.

Le milieu à traiter passe à l'intérieur des fibres creuses, directement en contact avec l'enzyme malolactique immobilisée.

Le débit est de 10 ml/h, le temps de séjour dans la lumière des fibres est de 8 minutes.

Le milieu traité est récupéré en sortie de réacteur par un collecteur de fractions et l'acide malique est dosé.

Nous avons voulu connaître la stabilité des solutions traitées pour savoir jusqu'à quel moment le dosage de l'acide malique était valide.

Les solutions ont été dosées à différents moments :

- immédiatement en sortie de réacteur,
- conservées à température ambiante et dosées de 1 à 24 heures après la sortie du réacteur,
- conservées au réfrigérateur et dosées de 1 à 24 heures après,
- congelées immédiatement ou après quelques heures, et dosées le lendemain.

Les meilleurs résultats sont obtenus lorsque le dosage est réalisé immédiatement en sortie du réacteur, ou lorsque les solutions sont congelées immédiatement.

Le dosage reste encore valable si les échantillons ont séjourné jusqu'à 12 heures à température ambiante et 24 heures à 4°C. Au-delà de ces limites les concentrations en acide malique diminuent plus rapidement au cours du temps.

Pour les expériences qui suivront, le dosage de l'acide malique et de l'acide lactique se fera le matin pour les échantillons collectés la nuit, et l'après-midi pour les échantillons collectés le jour. Les échantillons collectés le jour sont mis immédiatement à 4°C, ceux collectés la nuit séjournent à température ambiante et sont mis à 4°C au matin. L'idéal serait de mettre le collecteur de fractions à 4°C, mais cela n'a pas été possible.

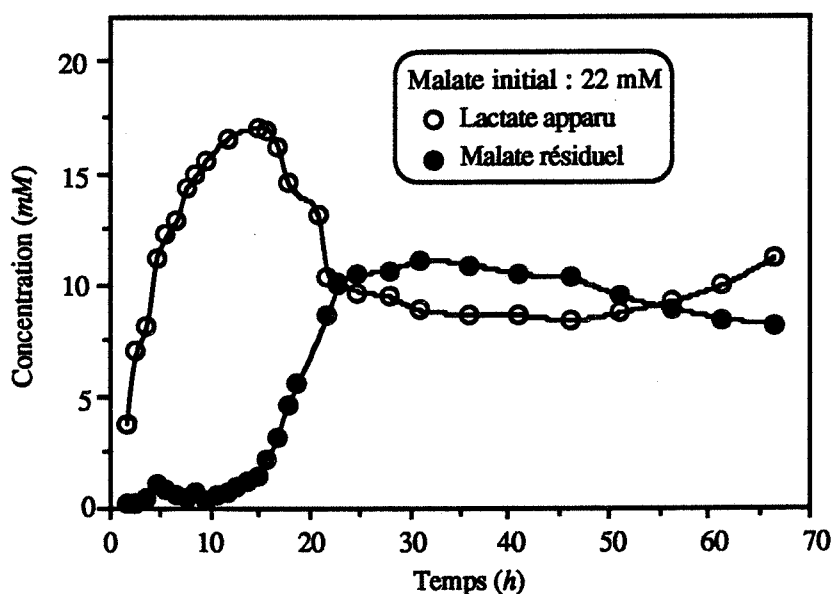
Après cette mise au point, nous avons testé le réacteur pendant plusieurs jours, avec un milieu à traiter à pH 6 ou à pH 3,3, circulant à l'intérieur des fibres creuses.

## I-2-2 Milieu à pH 6

### I-2-2-2 Avec NAD

La solution à traiter est toujours la même : milieu de mesure à pH 6. Elle circule en continu à l'intérieur des fibres creuses, directement au contact de l'enzyme immobilisée, à un débit de 2,8 ml/h.

La Figure 25 visualise l'évolution des concentrations en malate et en lactate à la sortie du réacteur au cours du temps. On ne retrouve pratiquement pas de malate durant les quinze premières heures. Pendant ce temps la production de lactate croît et atteint un maximum à 15 heures. A partir de 20 heures, la concentration de malate augmente, celle de lactate diminue en sortie de réacteur, elles s'équilibrent aux environ de 10 mM jusqu'à la fin de l'expérience.



- Circuit interne : enzyme malolactique immobilisée
- Débit : 2,8 ml/h
- Solution à traiter : malate 22 mM, NAD 0,45 mM, manganèse 0,09 mM dans du tampon phosphate pH 6
- Circuit externe vide
- Température : 20°C

Figure 25 : Évolution des concentrations en malate et en lactate à la sortie du réacteur.

Une analyse plus fine de ces résultats est faite en considérant l'évolution du taux de conversion du malate (Figure 26) et le rendement de la transformation malate-lactate (Figure 27).

Le taux de conversion du malate est d'environ 100% pendant les quinze premières heures et se stabilise à environ 50% à partir de 20 heures. Cette stabilisation résulte d'une saturation des sites enzymatiques par le malate et le lactate qui tend à ralentir la réaction.

Le rendement de la transformation du malate en lactate augmente progressivement jusqu'à 15 heures. Il atteint un maximum stable à partir de 20 heures et jusqu'à la fin de l'expérience. 80% à 90% du malate disparu est alors converti en lactate.

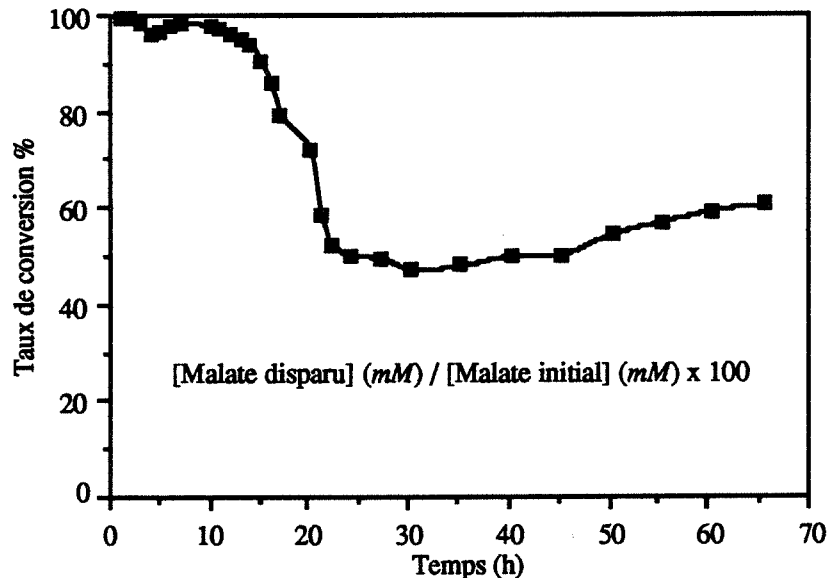


Figure 26 : Taux de conversion du malate.

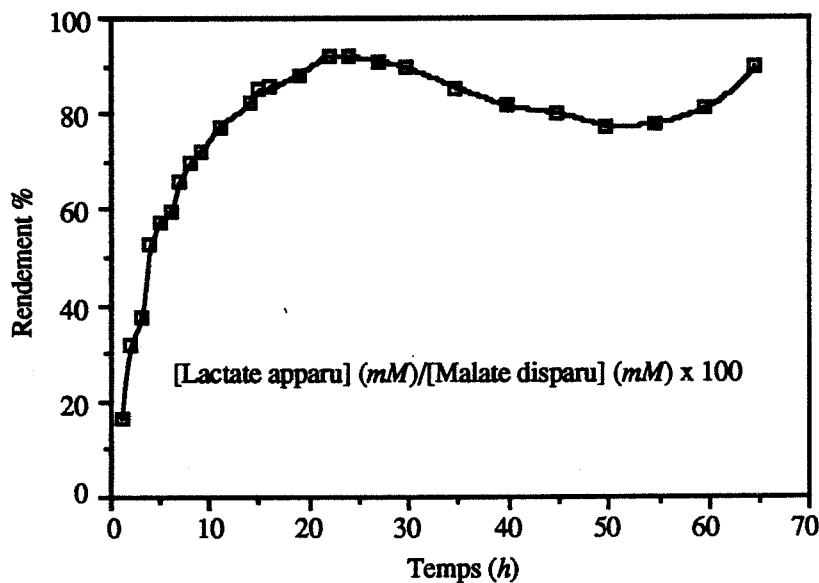


Figure 27 : Rendement de la transformation malate-lactate dans le réacteur.

Le fait que le malate disparaisse totalement et ne soit pas transformé en lactate en début d'expérience est attribué à son adsorption sur le réacteur. Une étude sur un réacteur témoin

(non greffé) montre qu'une quantité correspondant à 5 mmol d'acide malique ou lactique s'adsorbe sur les fibres creuses du réacteur. Lorsque ce dernier est saturé, l'adsorption se stabilise. Donc avant de commencer les expériences suivantes, le réacteur est saturé en acide malique par passage en circuit fermé d'une solution d'acide malique à 10 ml/h pendant une heure.

Après un régime transitoire d'une vingtaine d'heures, le réacteur atteint un régime stationnaire. Les concentrations en malate et en lactate s'équilibrent. Le rendement n'est pas de 100%, mais de 80% à 90% car une partie du malate et du lactate reste dans le réacteur.

#### I-2-2-2 Sans NAD

La même expérience a été réalisée avec une solution à traiter ne contenant pas de NAD. Le malate est adsorbé en partie pendant les cinq premières heures, puis il est retrouvé à 90% en sortie de réacteur. Aucune production de lactate n'a pu être mesurée. Donc le NAD est nécessaire à la réaction.

Nous avons ainsi montré que la transformation chimique du malate en lactate peut être réalisée à l'intérieur d'un réacteur à enzyme malolactique immobilisée, en continu, dans un milieu synthétique tamponné à pH 6 et à température ambiante.

Le taux de conversion et le rendement sont déjà importants. Ces résultats ont été obtenus sans mise au point du réacteur, ce qui laisse prévoir une amélioration importante lorsque chaque étape sera optimisée.

Nous avons testé les performances de ce réacteur à pH 3,3 qui avoisine le pH du vin.

#### I-2-3 Milieu à pH 3,3

La solution à traiter est le milieu de mesure à pH 3,3. Elle circule en continu à l'intérieur des fibres creuses, au contact de l'enzyme immobilisée, à un débit de 2,8 ml/h.

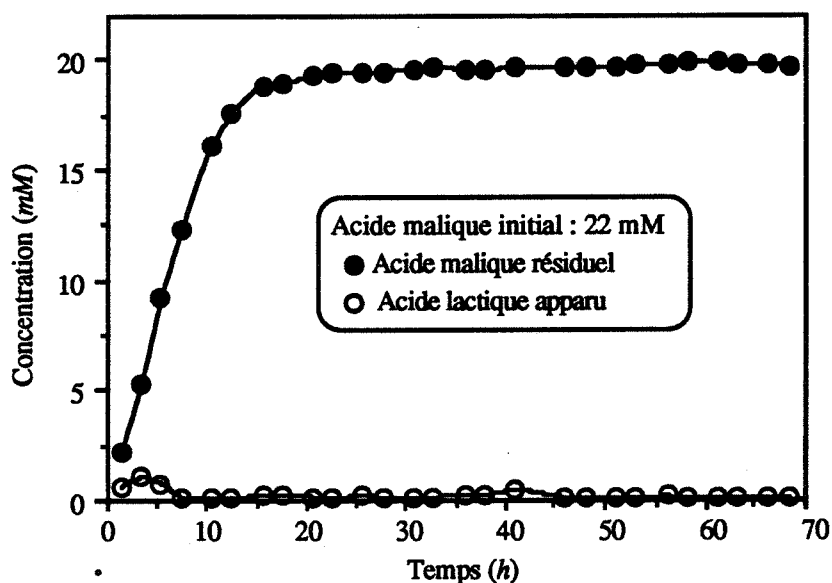
La Figure 28 montre que la concentration en acide malique en sortie de réacteur est presque nulle les premières heures. Elle augmente et se stabilise à environ 18 mM à partir de 15 heures. Le taux de conversion apparent de l'acide malique (Figure 29) est alors de 8%.

Il n'y a pratiquement pas d'apparition d'acide lactique en sortie de réacteur.

L'acide malique se fixe sur l'enzyme jusqu'à saturer les sites de fixation, c'est-à-dire jusqu'à 15 heures, mais il n'y a pas de production d'acide lactique. La réaction malolactique ne se fait pas.

Cette expérience montre que la réaction malolactique n'est pas possible à pH 3,3. Lorsque l'enzyme se trouve directement en contact avec un milieu de même acidité que le vin, elle ne fonctionne pas.

Cela aurait pu compromettre la réalisation du réacteur à enzyme malolactique immobilisée.



- Circuit interne : enzyme malolactique immobilisée
- Débit : 2,8 ml/h
- Solution à traiter : acide malique 22 mM, NAD 0,45 mM, manganèse 0,09 mM, tampon phosphate, pH 3,3
- Circuit externe vide
- Température : 20°C

Figure 28 : Évolution des concentrations en acide malique et en acide lactique à la sortie du réacteur.

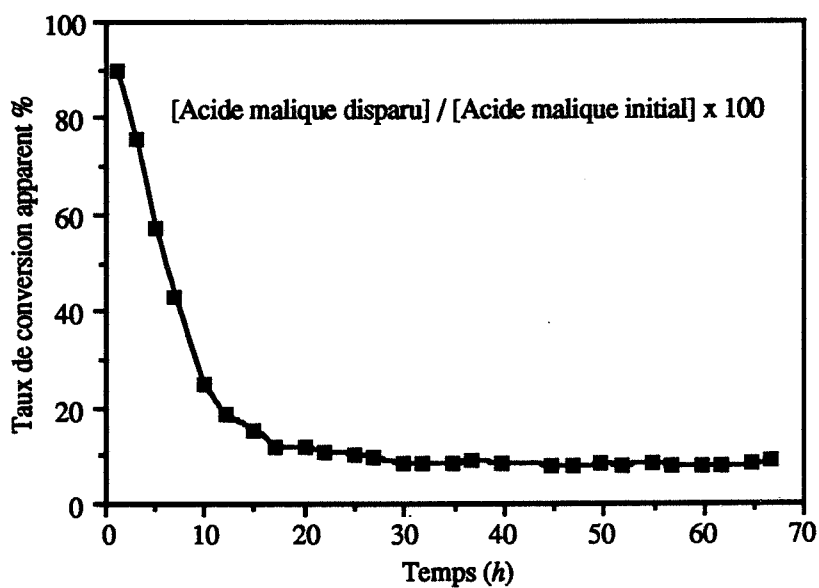


Figure 29 : Taux de conversion de l'acide malique.



Que se passe-t-il dans la nature ?

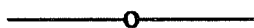
L'enzyme malolactique se trouve à l'intérieur des bactéries, dans un milieu dont le pH est favorable à la réaction chimique. Elle est séparée du milieu extérieur défavorable, vin à pH 3, par la membrane cytoplasmique et la paroi de la bactérie.

L'idée est venue d'essayer de reproduire à l'intérieur de notre réacteur, ce micro-environnement favorisant la réaction malolactique. C'est à partir de là que nous avons utilisé le second circuit des ultrafiltres. En effet, le circuit interne, constitué par la lumière des fibres creuses et renfermant l'enzyme, est séparé du circuit externe par une membrane de polyamide formée par les fibres creuses elles-même. Nous avons alors la possibilité de faire circuler à l'intérieur des fibres, au contact de l'enzyme, un milieu dont le pH était favorable à la transformation du malate en lactate, et à l'extérieur des fibres le milieu à traiter.

Un autre problème devait être résolu : celui des cofacteurs : NAD et manganèse. Jusqu'à maintenant, le NAD et le manganèse étaient fournis à l'enzyme dans le milieu synthétique. Nous avons vu que ces composés étaient indispensables à l'enzyme pour qu'elle effectue la réaction malolactique.

Le manganèse ou d'autres ions divalents de remplacement (cobalt, magnésium, fer, nickel, zinc ou cuivre) sont en quantité largement suffisante dans le vin.

Par contre, le NAD est absent. Étant donné le prix du NAD (environ 30 francs le gramme), il était hors de question de fournir en continu ce produit au réacteur. Nous avons décidé d'essayer d'immobiliser le NAD en même temps que l'enzyme.



## CHAPITRE II

### IMMOBILISATION DE L'ENZYME MALOLACTIQUE ET DU NAD

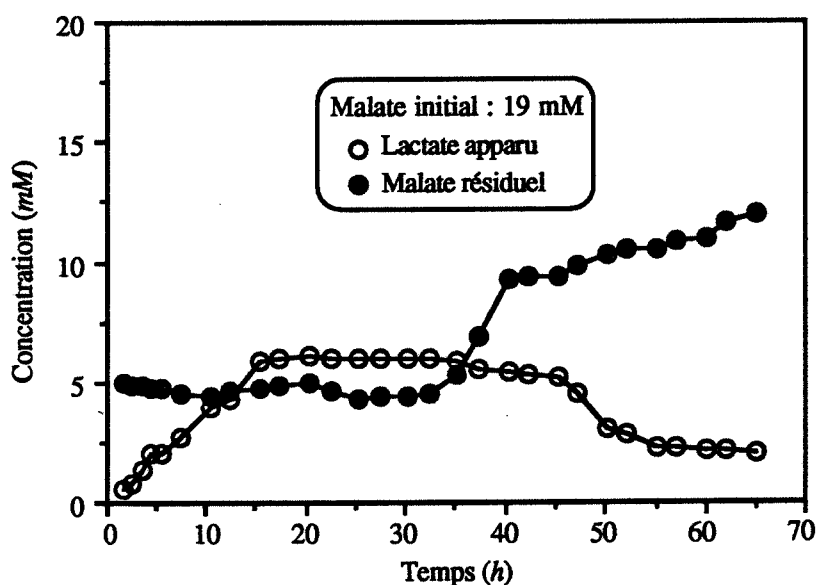
L'enzyme malolactique et le NAD ont été immobilisés selon la technique de Mazid et Laidler [1982] décrite en VI-1-2 du Matériels et Méthodes, à l'intérieur des fibres creuses.

L'efficacité du réacteur a été testée, dans un premier temps avec un milieu synthétique, et dans un second temps avec du vin.

#### II-1 ESSAIS EN MILIEU SYNTHÉTIQUE

Le test en milieu synthétique se fait avec :

- du tampon phosphate à pH 6 circulant dans le circuit interne, à un débit de 8 ml/h,
- un milieu synthétique composé du substrat : le malate à 19 mM, et du cofacteur : le manganèse à 0,09 mM, dans du tampon phosphate pH 6, circulant dans le circuit externe à un débit de 1,9 ml/h.



- **Circuit interne** : enzyme malolactique et NAD immobilisés, circuit fermé
- Débit : 8 ml/h
- Tampon phosphate pH 6
- **Circuit externe** :
- Débit : 1,9 ml/h
- Solution à traiter : malate 22 mM, manganèse 0,09 mM dans du tampon phosphate pH 6
- **Température** : 20°C

**Figure 30** : Évolution des concentrations en malate et en lactate à la sortie du réacteur.

La Figure 30 montre l'évolution des concentrations en malate et en lactate à la sortie du circuit externe du réacteur, c'est-à-dire du circuit de traitement. Une partie du malate a

disparu et il y a apparition de lactate. Ces observations montrent déjà que le malate a traversé la membrane, que la réaction a eu lieu dans le circuit interne et que le lactate produit a aussi traversé la membrane en sens inverse.

Les concentrations en malate et en lactate ont été contrôlées ponctuellement dans le circuit interne, c'est-à-dire le circuit enzymatique.

Les concentrations en malate sont équivalentes à celles trouvées dans le circuit externe pendant les 40 premières heures, ce qui montre encore une fois que ce composé a bien traversé la membrane. Ensuite les concentrations en malate diminuent dans le circuit enzymatique, alors qu'elles augmentent dans le circuit de traitement.

Les concentrations en lactate augmentent progressivement dans le circuit enzymatique et sont toujours supérieures à celles retrouvées dans le circuit externe.

Le taux de conversion du malate (Figure 31) est de 75% pendant 35 heures, puis il diminue graduellement et atteint 40% au bout de 65 heures.

Nous observons de nouveau une saturation des sites enzymatiques à partir de 40 heures.

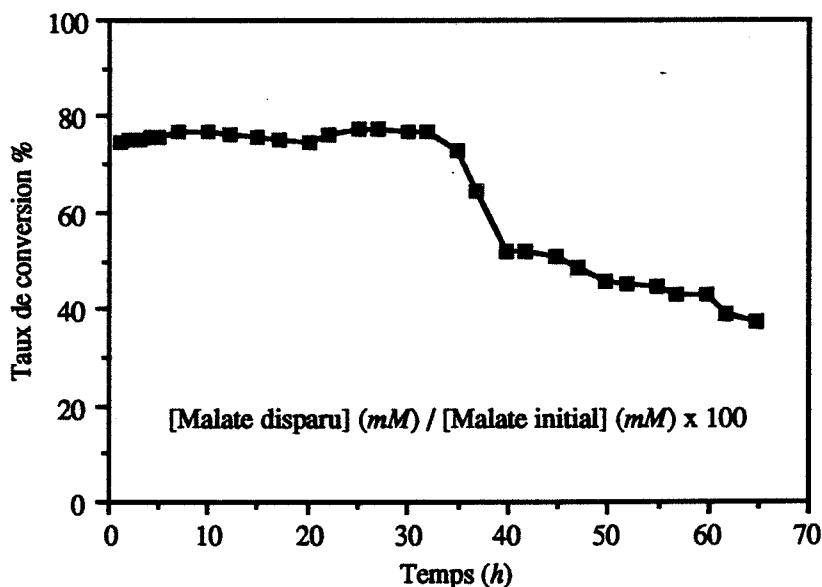


Figure 31 : Taux de conversion du malate.

Le rendement de la transformation malate-lactate en sortie de réacteur augmente progressivement et se stabilise à 40% de 15 heures à 40 heures. Il passe ensuite par un maximum à 53% entre 40 et 50 heures, puis diminue et se stabilise à 20%.

Ces valeurs sont prises par défaut car nous ne tenons pas compte des concentrations des deux composés dans le circuit enzymatique.

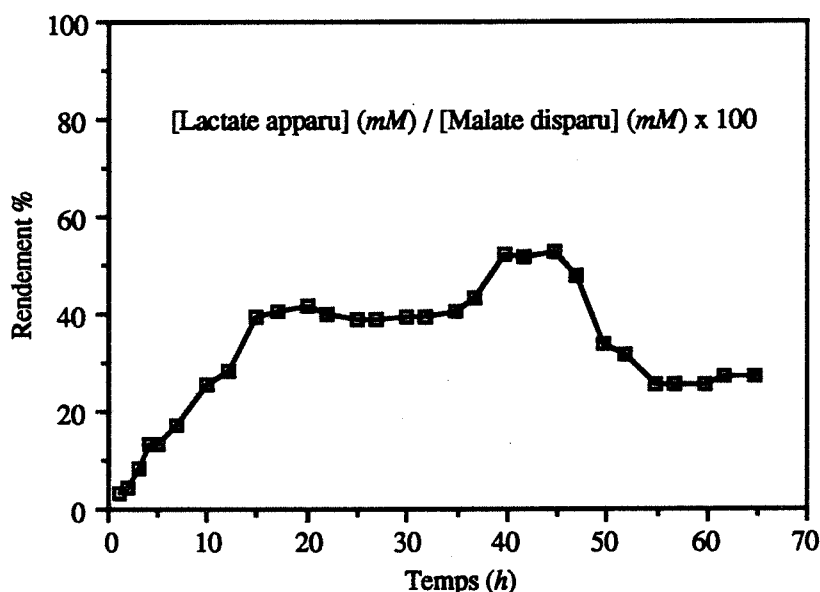


Figure 32 : Rendement de la transformation malate-lactate à l'intérieur du réacteur.

Est-ce que le NAD a bien été greffé sur la membrane de polyamide ?

Il est difficile de répondre à cette question car un dosage direct du NAD sur les fibres n'est réalisable que si l'on détruit le réacteur.

D'autre part nous pouvons mettre en doute la fixation du NAD car nous avons vu que l'enzyme utilisée renferme une petite quantité de NAD et peut ainsi fonctionner sans apport de NAD en phase homogène. Néanmoins en phase hétérogène (cf. I-2-2-2) aucune activité n'a pu être mesurée en absence de NAD, ce qui montre que le NAD est bien présent au niveau de la membrane.

Le NAD est présent au niveau de la membrane, mais est-il adsorbé ou fixé à la membrane ?

Après une dizaine d'expériences totalisant 700 heures de fonctionnement du réacteur à un débit de 2 ml/h en moyenne et autant de rinçages à un débit de 10 ml/h, le réacteur fonctionne toujours, ce qui nous permet de dire que le NAD a bien été greffé et qu'il est efficace.

Nous pouvons donc conclure que le réacteur à enzyme malolactique et NAD immobilisés fonctionne à pH 6, en double circuit et sans apport de NAD.

Comme précédemment, aucune mise au point n'a été faite, ce qui laisse prévoir une amélioration importante des performances de ce réacteur.

Il nous reste alors à montrer que ce réacteur peut fonctionner avec du vin.

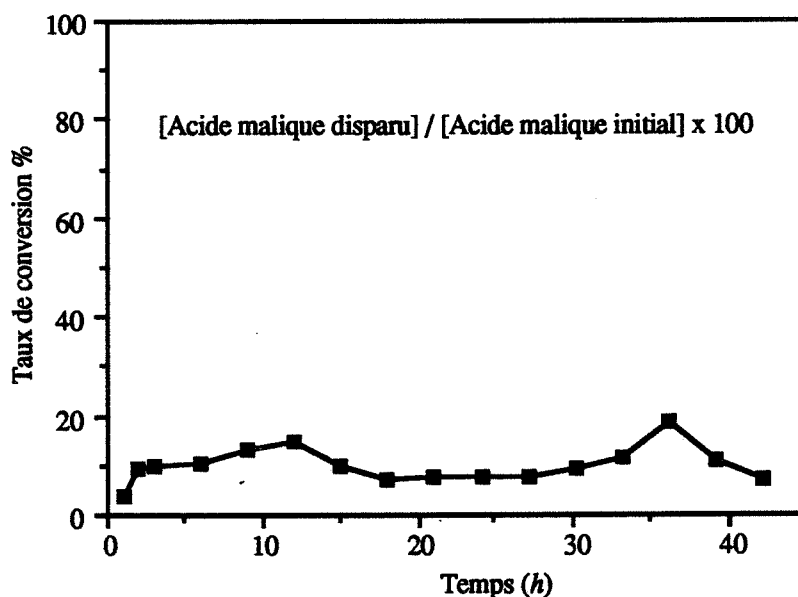
## II-2 ESSAIS AVEC LE VIN

Le vin à traiter est du Gaillac blanc n'ayant pas fait la fermentation malolactique, contenant 11 mM d'acide malique. Son pH est de 3. Il circule dans le circuit externe à un débit de 1,9 ml/h.

Au contact de l'enzyme et du NAD, dans le circuit interne, il faut mettre un milieu dont le pH est favorable à la réaction malolactique et qui ne risque pas de dénaturer le vin à traiter circulant dans le circuit externe. C'est pourquoi nous avons utilisé le même vin qui a été amené à pH 6 avec de la soude. Le vin à pH 6 circule à un débit de 8 ml/h.

La Figure 33 montre qu'au cours de cette expérience, un pourcentage d'acide malique variant de 7% à 18% a disparu à la sortie du circuit externe du réacteur.

Il n'y a pas d'apparition d'acide lactique.



- **Circuit interne** : enzyme malolactique et NAD immobilisés, circuit fermé
- Débit : 8 ml/h
- Vin Gaillac blanc pH 6
- **Circuit externe** :
- Débit : 1,9 ml/h
- Solution à traiter : vin Gaillac blanc pH 3
- Température : 20°C

**Figure 33** : Taux de conversion de l'acide malique.

Si l'acide malique du circuit interne du réacteur, c'est-à-dire le circuit enzymatique, est dosé, on s'aperçoit que sa concentration diminue de 27% après 15 heures, et de 43% après 40 heures. Il n'y a pas non plus de production d'acide lactique dans le circuit interne du réacteur.

L'acide malique se fixe sur l'enzyme mais la réaction ne se produit pas.

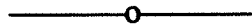
De plus, la présence d'acides dicarboxyliques inhibiteurs dans le vin nous rendait sceptiques sur l'avenir d'un tel réacteur.

Lors des expériences précédentes, nous avons remarqué que le réacteur fonctionnait avec un taux de conversion important pendant les 40 premières heures, puis la réaction ralentissait et le taux de conversion diminuait de moitié. Nous pensions alors que l'acide malique et l'acide lactique saturaient les sites enzymatiques.

Ces observations nous ont laissé supposer que l'acide malique et les autres acides dicarboxyliques présents dans le vin du circuit interne saturaient complètement l'enzyme.

S'il s'agissait vraiment d'une saturation des sites enzymatiques, le blocage de la réaction pourrait être levé en augmentant la quantité d'enzyme ou en augmentant le temps de séjour dans le réacteur. Le temps de séjour étant suffisamment long, nous avons décidé d'augmenter la quantité d'enzyme en ajoutant de l'enzyme libre dans le circuit enzymatique du réacteur.

C'est à partir de là qu'est venue l'idée de réaliser un réacteur à enzyme malolactique libre et à NAD immobilisé.





### CHAPITRE III

## RÉACTEUR À ENZYME MALOLACTIQUE LIBRE ET À NAD IMMOBILISÉ

Au départ, nous voulions fixer l'enzyme malolactique pour lui permettre de conserver le plus longtemps possible son activité enzymatique.

Nous avons montré que l'enzyme malolactique était stable au congélateur ou au réfrigérateur pendant plusieurs mois. A température ambiante, son activité diminue de 5% au bout de huit jours. D'autre part, pour obtenir une activité équivalente, il faut, lors de la fixation une quantité d'enzyme cinq fois supérieure à celle nécessaire lors de l'utilisation de l'enzyme native.

Le réacteur nous permet de retenir l'enzyme malolactique, dont la masse moléculaire relative est d'environ 130 000, dans son circuit interne car ses fibres creuses de polyamide ont un seuil de coupure à 30 000.

Il n'était alors plus nécessaire de fixer l'enzyme malolactique de façon covalente.

Le réacteur utilisé pour cette expérience est le même que pour l'expérience précédente.

Le vin à traiter est un vin rouge préparé au laboratoire. Il contient 14 mM d'acide malique et son pH est de 3,1. Il circule dans le circuit externe du réacteur à un débit de 2,8 ml/h.

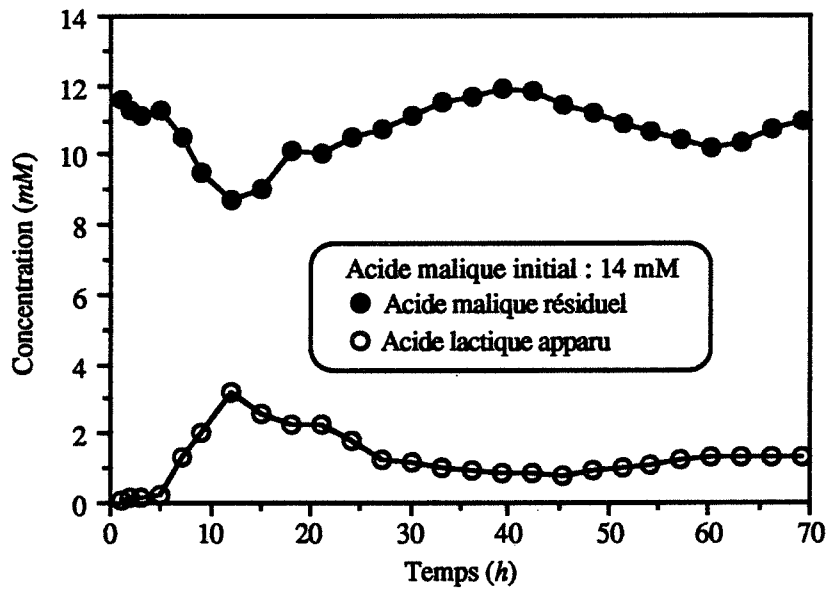
Le même vin amené à pH 6,1 et additionné de 300 U d'enzyme malolactique libre, circule au contact du NAD greffé dans le circuit interne du réacteur à un débit de 8 ml/h.

La Figure 34 montre qu'à la sortie du circuit externe du réacteur une partie de l'acide malique a disparu et que de l'acide lactique s'est formé.

Pendant les quarantes premières heures, il disparaît plus d'acide malique dans le circuit enzymatique que dans le circuit de traitement, puis les concentrations tendent à s'équilibrer de part et d'autre de la membrane. Les concentrations en acide lactique sont toujours plus importantes dans le circuit interne que dans le circuit externe, mais la différence tend à se réduire en fin d'expérience.

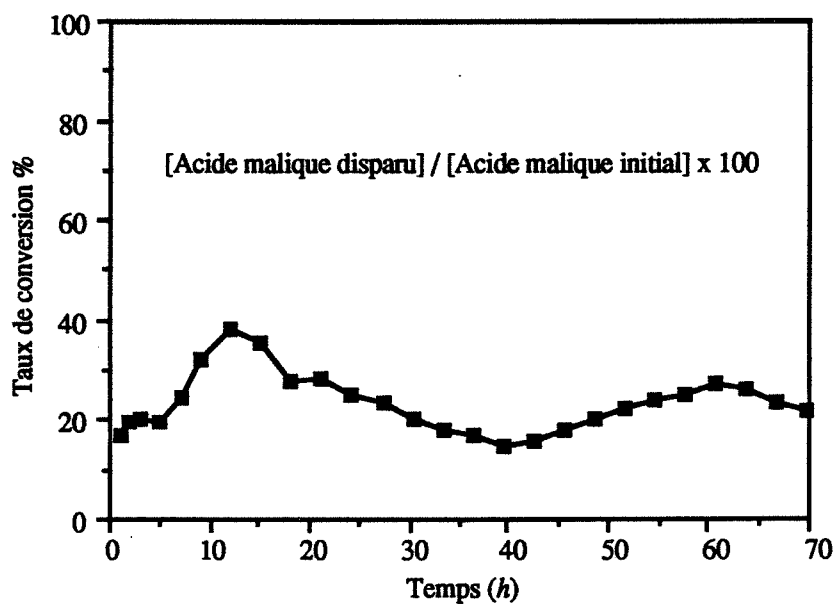
Le taux de conversion de l'acide malique dans le circuit externe atteint un maximum à 40% à 12 heures, puis il oscille entre 18 et 30% (Figure 35).





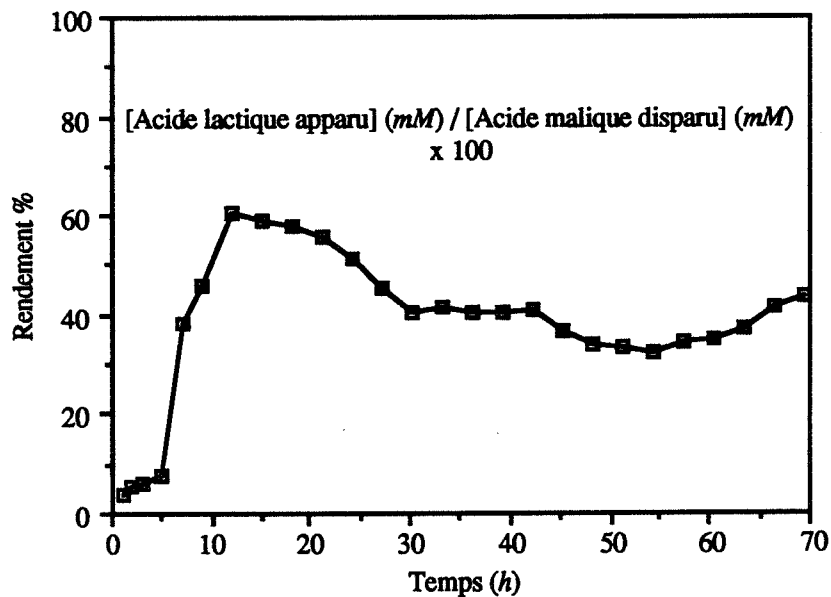
- **Circuit interne** : NAD immobilisé, 300 U d'enzyme malolactique libre, circuit fermé
- Débit : 8 ml/h
- Vin rouge du laboratoire pH 6,1
- **Circuit externe** :
- Débit : 2,8 ml/h
- Solution à traiter : vin rouge du laboratoire pH 3,1
- **Température** : 20°C

**Figure 34** : Évolution des concentrations en acide malique et en acide lactique à la sortie du réacteur.



**Figure 35** : Taux de conversion de l'acide malique.

Le rendement de la transformation de l'acide malique en acide lactique atteint aussi un maximum à 60% à 12 heures, puis il se stabilise à 40% (Figure 36).



**Figure 36 :** Rendement de la transformation malolactique à l'intérieur du réacteur.

Au cours de cette expérience, 15% à 40% de l'acide malique initial a été consommé. Il a été converti pour 40% à 60% en acide lactique.

Les taux de conversion de l'acide malique et les rendements de la transformation malate-lactate ne sont pas spectaculaires mais pourront être améliorés de façon importante, car aucune mise au point n'a été réalisée pour le moment. De plus, ces valeurs sont prises par défaut car nous ne tenons pas compte des concentrations des deux acides dans le circuit enzymatique.

Une quantité plus importante d'enzyme nous a permis de réaliser la transformation. Le blocage de la réaction a été levé en partie.

Nous avons donc montré qu'il était possible de transformer l'acide malique d'un vin en acide lactique, dans un réacteur à NAD immobilisé et à enzyme malolactique libre.

Avant de commencer les essais sur ce dernier réacteur, nous ne savions pas de quelle façon pouvait se comporter le pH de part et d'autre de la membrane, mais nous supposons que l'équilibre devait être atteint très rapidement. Au cours de ces expériences, nous avons remarqué que le pH ne s'équilibrait pas aussi vite que ce que nous avons prévu. Nous avons alors vérifié l'évolution du pH dans chacun des circuits du réacteur.



## CHAPITRE IV

### CONTRÔLE DU PH

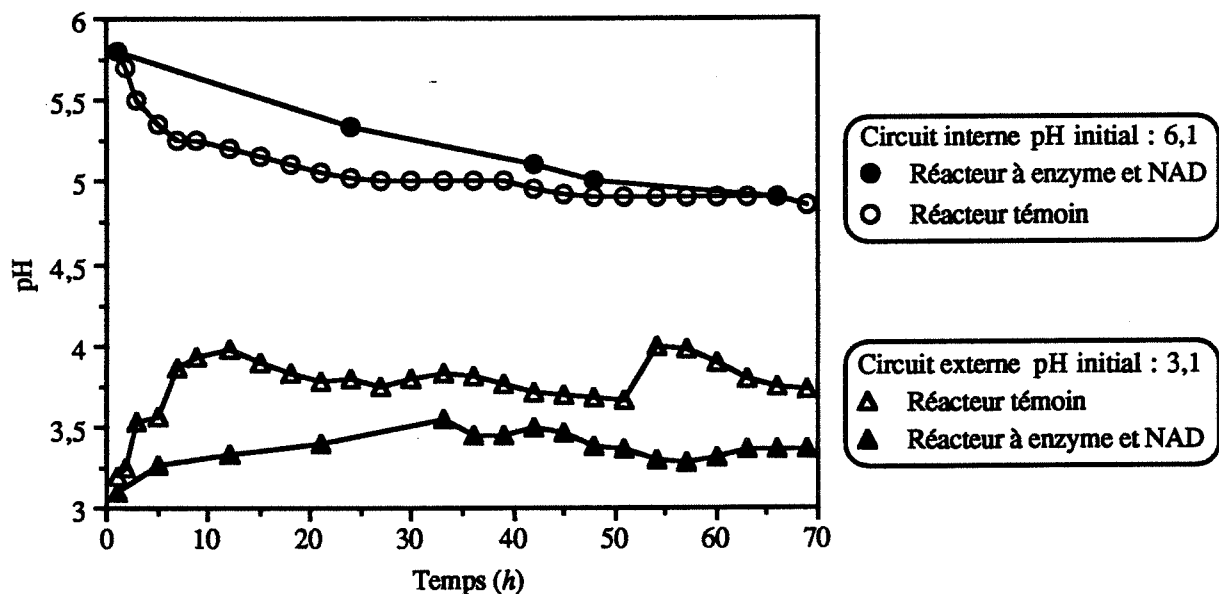
L'évolution du pH dans le circuit interne et dans le circuit externe du réacteur a été suivie au cours de l'expérience précédente.

En parallèle une expérience témoin a été réalisée sur un réacteur "nu".

Du vin à pH 3,1 circule dans le circuit externe à un débit de 2,8 ml/h.

Le même vin amené à pH 6,1 circule dans le circuit interne du réacteur à un débit de 8 ml/h.

Le pH est pris en sortie de chaque circuit.



#### RÉACTEUR TEST

- Circuit interne : NAD immobilisé, 300 U d'enzyme malolactique libre, circuit fermé
- . Débit : 8 ml/h
- . Vin rouge du laboratoire pH 6,1
- Circuit externe :
- . Débit : 2,8 ml/h
- . Solution à traiter : vin rouge du laboratoire pH 3,1 (acide malique : 14 mM)

#### RÉACTEUR TÉMOIN

- Circuit interne : nu
- . Débit : 8 ml/h
- . Vin rouge du laboratoire pH 6,1
- Circuit externe :
- . Débit : 2,8 ml/h
- . Solution à traiter : vin rouge du laboratoire pH 3,1 (acide malique : 14 mM)
- Température : 20°C

**Figure 37 :** Contrôle du pH dans le circuit interne et le circuit externe du réacteur à enzyme libre et NAD immobilisé et dans le réacteur témoin.

Au niveau du circuit interne (Figure 37 haut) le pH passe immédiatement de 6,1 à 5,2 en début d'expérience dans le réacteur témoin. Il se stabilise ensuite à 5.

Dans le réacteur à enzyme et NAD, cette chute est moins brutale. Le pH diminue progressivement et se stabilise aussi à 5 à partir de 65 heures.

Lors de l'étude de la cinétique de l'enzyme malolactique, nous avons vu que l'enzyme avait une activité encore importante à pH 5. Le pH du circuit interne pourrait être amené à 5 au lieu de 6.

Au niveau du circuit externe (Figure 37 bas) le pH du réacteur témoin atteint très rapidement un maximum à pH 4 à 10 heures, puis oscille entre 3,75 et 4.

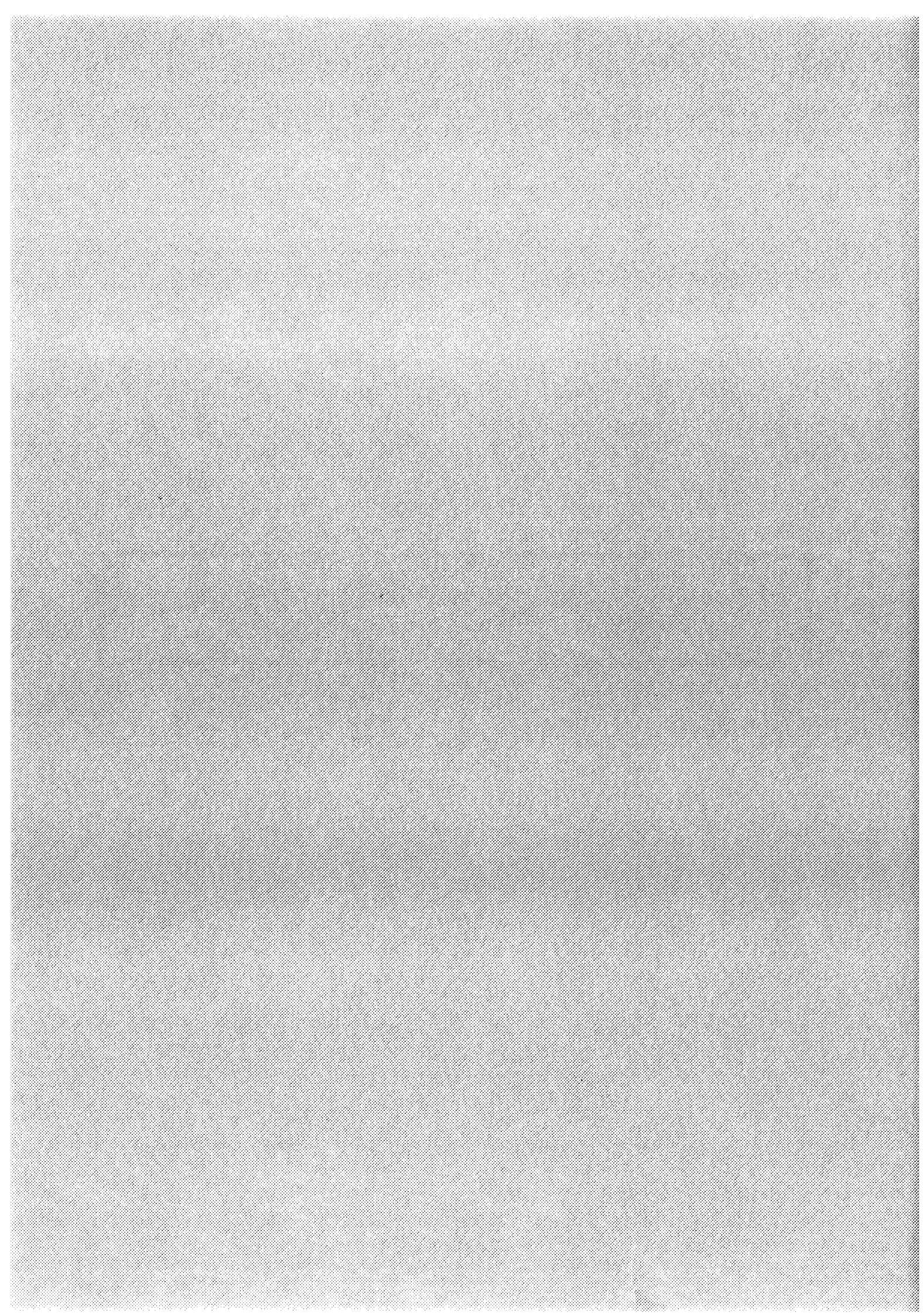
Dans le réacteur à enzyme et NAD le pH passe de 3,1 à 3,5 en 33 heures, puis se stabilise aux environs de 3,3. Il y a donc une variation de 0,2 à 0,4 unité pH.

La variation de pH dans le circuit interne ou dans le circuit externe du réacteur à enzyme et NAD est beaucoup moins importante que celle qui se produit dans le réacteur témoin.

La présence de l'enzyme malolactique et du NAD semble former une barrière au niveau de la surface membranaire et limiter ainsi les échanges.

Une demande de brevet français a été déposée le 16 octobre 1990 sous le numéro 90 13131 concernant les travaux sur le réacteur [Festaz-Furet *et al.*, 1990] Cette demande a été étendue à l'étranger sous forme d'une demande internationale dite PCT en octobre 1991.

# CONCLUSION



Nous avons cultivé *Leuconostoc ænos* 84-06 et produit, à partir de cette bactérie lactique, de l'enzyme malolactique. Cette enzyme a été extraite et partiellement purifiée par une technique rapide et nous avons obtenu une protéine relativement pure et stable.

Nous avons utilisé cette enzyme pour la mise au point d'un réacteur à NAD immobilisé et à enzyme malolactique libre.

Nous avons montré que ce réacteur pouvait réaliser la fermentation malolactique des vins.

Donc le but qui était fixé a été atteint. La fermentation malolactique des vins par un réacteur à enzyme malolactique, qui semblait difficilement envisageable il y a quelques années [Gestrelus, 1982 ; Cuenat *et al.*, 1984 ; Davis *et al.*, 1985], est maintenant possible.

Les travaux que nous avons présentés sont le point de départ d'une nouvelle voie de recherches pour l'amélioration de la fermentation malolactique des vins.

L'application de notre technique à la fermentation malolactique de grandes quantités de vin dépend du développement et de la recherche dans divers domaines.

### **1 Production et purification de l'enzyme malolactique**

*Leuconostoc ænos* est une bactérie à croissance très lente et faible productrice d'enzyme. Les recherches doivent s'orienter vers l'obtention de souches hyper-productrices d'enzyme malolactique.

La production industrielle de cette enzyme doit être réalisée.

Une quantité plus importante d'enzyme malolactique pourrait être extraite des bactéries. Il faut que les méthodes industrielles améliorent l'extraction.

L'activité spécifique de l'enzyme obtenue est assez importante pour les essais de laboratoire, mais n'est pas suffisante pour l'industrialisation du procédé. Elle doit être augmentée tout en conservant une forte stabilité à température ambiante.

### **2 Importance du NAD**

Comme nous l'avons vu, le NAD est indispensable à la réaction, mais son rôle dans la réaction n'est toujours pas compris et, par conséquent, le mécanisme d'action de l'enzyme reste obscur. Une étude fondamentale est nécessaire.



L'étude cinétique de l'enzyme malolactique a été faite en général avec des extraits bruts ou après les premières étapes de purification. Elle doit être réalisée avec de l'enzyme très pure.

La technique de fixation du NAD que nous avons utilisée est efficace et stable, mais néanmoins coûteuse. Le dérivé NAD employé est fabriqué en faible quantité.

Les recherches concernant la fixation du NAD se sont énormément développées ces dernières années. L'équipe de Mosbach en Suède étudie particulièrement ce sujet. Leurs derniers travaux sur l'attachement du NAD de façon covalente à une glucose-déshydrogénase par l'intermédiaire d'un résidu cystéine introduit par mutagenèse dirigée à proximité du site actif de l'enzyme, montrent l'évolution importante de la recherche dans ce domaine. Le complexe déshydrogénase-cystéine-NAD est couplé à une lactate-déshydrogénase pour la régénération du coenzyme [Persson *et al.*, 1991]. D'autres équipes travaillent sur des voies différentes : fixation du NADP dans un bioréacteur à membrane chargée négativement [Denki *et al.*, 1989], immobilisation du NAD par microencapsulation à l'intérieur de cellules artificielles d'un bioréacteur [Gu et Chang, 1988, 1990], co-immobilisation du NAD avec des enzymes permettant sa régénération dans un gel de Sepharose [Ukeda *et al.*, 1989 a b c]. Ceci nous laisse entrevoir de nouvelles solutions dans les prochaines années.

### 3 Réacteur et vinification

Le réacteur que nous avons mis au point ne fonctionne que dans des conditions limitées. Une étude de tous les paramètres doit être entreprise au niveau de la cinétique enzymatique à l'intérieur du réacteur, du contrôle des flux, des pressions, du pH, et ceci en tenant compte des caractéristiques du vin.

La vinification tend de plus en plus à être contrôlée et l'évolution des technologies et des matériels est importante, les caractéristiques du produit final restant déterminantes. L'utilisation de la technologie des membranes est maintenant courante et commence à concurrencer les techniques physiques classiques et les traitements chimiques ou thermiques.

La microfiltration tangentielle offre des possibilités techniques intéressantes pour la clarification des vins et des moûts et l'obtention de la stabilité microbiologique. Elle peut être appliquée à la production de moûts stériles (jus stabilisés à froid, vinification différée, réserve de moûts pour l'édulcoration), au contrôle de la flore dans la fermentation alcoolique, à l'obtention de produits mi-fermentés, à la vinification en continu par couplage fermenteur-membrane, à l'amélioration des précipitations tartriques ou à l'élimination des pigments bruns.

L'osmose inverse ou la pervaporation peuvent être appliquées à la concentration des moûts de raisin, des vins ou de sous-produits en vue de leur valorisation, à la régulation de la teneur en sucre des moûts, à la désalcoolisation, à l'obtention de bases pour l'élaboration des boissons allégées, à l'augmentation du titre alcoométrique des vins, au traitement de la stabilisation tartrique, à l'élimination du "goût de vieux".

L'électrodialyse permet la préparation industrielle des moûts de raisin concentrés rectifiés, la maîtrise de la précipitation tartrique des vins, des jus et des concentrés de moûts, la régulation de l'acidité des vins, la désulfitation et l'élaboration de produits sucrants.

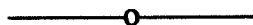
La technologie des membranes est en mutation rapide et laisse prévoir des bouleversements dans cette filière.

Nos travaux s'intègrent parfaitement dans les procédés de pointe de l'an 2000.

#### **4 Autres domaines**

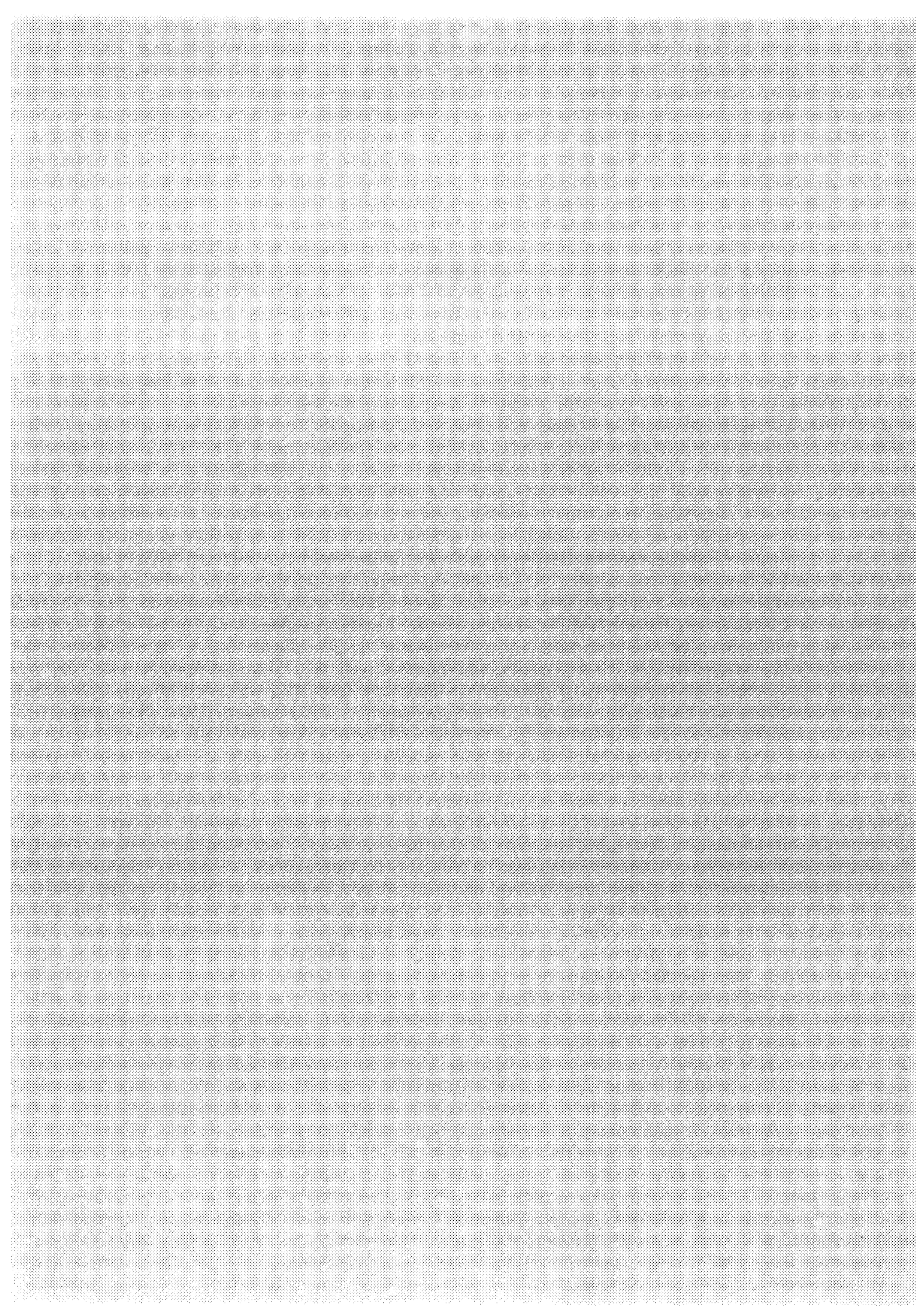
Ce type de réacteur peut avoir d'autres applications telles que la fabrication de produits nécessitant des enzymes à coenzymes nucléotidiques, ou des conditions de pH particulières.

Le principe du réacteur peut être appliqué à la fabrication de capteurs enzymatiques dont les enzymes nécessitent aussi des conditions particulières.





RÉFÉRENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES



ANSORGE, W. 1985

Fast and sensitive detection of protein and DNA bands by treatment with potassium permanganate

*J. Biochem. Biophys. Methods*, **11**, 13-20

ASTRUC, H. 1925

Note sur la composition des vins de plaine du midi (récolte 1924)

*Ann. Fals. Fraudes*, **18**, 198-204

AUKRUST, T., NES, I. F. 1988

Transformation of *Lactobacillus plantarum* with the plasmid pTV1 by electroporation

*FEMS Microbiol. Lett.*, **52** (1-2), 127-132

AURIOL, P., TULASI, S., GOMA, G., STREHAIANO, P. 1987

Cité par Chagnaud, P. 1989

BADII, R., JONES, S., WARNER, P.J. 1989

Sphaeroplast and electroporation-mediated transformation of *Lactobacillus plantarum*

*Let. Appl. Microbiol.*, **9** (2), 41-44

BATTERMANN, G., RADLER, F. 1991

A comparative study of malolactic enzyme and malic enzyme of different lactic acid bacteria

*Can. J. Microbiol.*, **37**, 211-217

BEELMAN, R. B., GALLANDER, J. F. 1979

Wine deacidification

*Adv. Food Res.*, **25**, 1-53

BRADFORD, M. M. 1976

A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding

*Anal. Biochem.*, **72**, 248-254

CASPRITZ, G., RADLER, F. 1983

Malolactic enzyme of *Lactobacillus plantarum*. Purification, properties and distribution among bacteria

*J. Biol. Chem.*, **258** (8), 4907-4910

CAVIN, J. F., PREVOST, H., LIN, J., SCHMITT, P., DIVIES, C. 1989

Medium for screening *Leuconostoc oenos* strains defective in malolactic fermentation

*Appl. Environ. Microbiol.*, **55** (3), 751-753

CHAGNAUD, P., NAOURI, P., ARNAUD, A., GALZY, P., MATHIEU, J. 1989

Purification and properties of a malolactic enzyme from a *Lactobacillus* sp. able to perform the malolactic fermentation of wines

*Biotechnol. Appl. Biochem.*, **11**, 445-458

CHAGNAUD, P. 1989

Etude biochimique et génétique d'une souche de *Lactobacillus* à activité malolactique

Thèse Université de Montpellier

CHAGNAUD, P., NAOURI, P., ARNAUD, A., GALZY, P. 1990

Optimisation des conditions d'obtention de cellules de *Lactobacillus* sp. 89 à forte activité malolactique

*Belgian Journal of Food Chemistry and Biotechnology*, **45** (1), 12-20

- CRAPISI, A., NUTI, M. P., ZAMORANI, A., SPETTOLI, P. 1987a  
Improved stability of immobilized *Lactobacillus* sp. cells for the control of malolactic fermentation in wine  
*Am. J. Enol. Vitic.*, **38** (4), 310-312
- CRAPISI, A., SPETTOLI, P., NUTI, M. P., ZAMORANI, A. 1987b  
Comparative traits of *Lactobacillus brevis*, *L. fructivorans* and *Leuconostoc oenos* immobilised cells for the control of malolactic fermentation in wine  
*J. Appl. Bacteriol.*, **63** (6), 513-521
- CUENAT, Ph., VILLETIAZ, J.-Cl. 1984  
Essais de fermentation malolactique de vins par bactéries lactiques immobilisées du genre *Leuconostoc*  
*Rev. Suisse Vitic. Arboric. Hortic.*, **16** (3), 145-151
- DAESCHEL, M. A., MC FEETERS, R. F., FLEMING, H. P., KLAENHAMMER, T. R., SANOSKY, R. B. 1987  
Lactic acid bacteria which do not decarboxylate malic acid and fermentation therewith  
Brevet US 4,666,849
- DAESCHEL, M. A., JUNG, D.-S., WATSON, B. T. 1991  
Controlling wine malolactic fermentation with nisin and nisin-resistant strains of *Leuconostoc oenos*  
*Appl. Environ. Microbiol.*, **57** (2), 601-603
- DAVID, S., SIMONS, G., DE VOS, W. M. 1989  
Plasmid transformation by electroporation of *Leuconostoc paramesenteroides* and its use in molecular cloning  
*Appl. Environ. Microbiol.*, **55** (6), 1483-1489
- DAVIS, C. R., WIBOWO, D., ESCHENBRUCH, R., LEE, T.H., FLEET, G. H. 1985  
Practical implications of malolactic fermentation : a review  
*Am. J. Enol. Vitic.*, **36** (4), 290-301
- DAVIS, C. R., WIBOWO, D. J., LEE, T. H., FLEET, G. H. 1986  
Growth and metabolism of lactic acid bacteria during and after malolactic fermentation of wines at different pH  
*Appl. Environ. Microbiol.*, **51**, 539-545
- DAVIS, C. R., WIBOWO, D., FLEET, G. H., LEE, T. H. 1988  
Properties of wine lactic acid bacteria : their potential enological significance  
*Am. J. Enol. Vitic.*, **39** (2), 137-142
- DELFINI, C. 1988  
Premiers résultats de l'étude d'un procédé expérimental d'induction de la fermentation malolactique  
*Conn. Vigne Vin*, **22** (2), 159-162
- DE MAN, J. C., ROGOSA, M., SHARPE, M. E. 1960  
A medium for the cultivation of *lactobacilli*  
*J. Appl. Bacteriol.*, **23**, 130-135
- DENKI KAGAKU, KOGYO 1989  
Denki Kagaku develops coenzyme regenerating bioreacteur  
*Jcw.*, **30**, 1539

- DESENS, C., LONVAUD-FUNEL, A. 1988  
Etude de la constitution lipidique des membranes de bactéries lactiques utilisées en vinification  
*Conn. Vigne Vin*, 22 (1), 25-32
- DICKS, L. M. T., VAN VUUREN, H. J. J., DELLAGLIO, F. 1990  
Taxonomy of *Leuconostoc* species, particularly *Leuconostoc ænos*, as revealed by numerical analysis of total soluble cell protein patterns, DNA base composition and DNA-DNA hybridization  
*Int. J. Syst. Bacteriol.*, 40 (1), 83-91
- DIVIES, C., SIESS, M. H. 1976  
Etude du catabolisme de l'acide L-malique par *Lactobacillus casei* emprisonnée dans un gel de polyacrylamide  
*Ann. Microbiol. Paris*, 127, 525-539
- DU PLESSIS, L. De W., VAN ZYL, J. A. 1963  
The microbiology of South African winemaking. Part IV. The taxonomy and incidence of lactic acid bacteria from dry wines  
*S. Afr. J. Agric. Sci.*, 6, 261-273
- DUTEURTRE, B. 1986  
La science du champagne  
*La Recherche*, 17 (183), 1478-1489
- EDWARDS, C.G., BEELMAN, R.B. 1989  
Inducing malolactic fermentation in wines  
*Biotech. Adv.*, 7, 333-360
- FERRE, L. 1922  
Cité par Lonvaud-Funel, A. 1986
- FESTAZ-FURET, B., HEALY, J.-C., TRAN-MINH, C. 1990  
Réacteur bio-catalysé, et procédé de traitement correspondant, applicables notamment à la transformation malolactique du vin  
Demande de brevet Français n° 90 13131
- FEUILLAT, M., GUILLOUX-BENATIER, M., GERBAUX, V. 1985  
Essais d'activation de la fermentation malolactique dans les vins  
*Sci. Aliments*, 5, 103-122
- FORNACHON, J. C. M. 1957  
The occurrence of malo-lactic fermentation in australian wines  
*Australian J. Appl. Sci.*, 8, 120-129
- GARVIE, E. I. 1967  
*Leuconostoc ænos* sp. nov.  
*J. Gen. Microbiol.*, 48, 431-438
- GARVIE, E. I. 1974  
*Leuconostoc*  
in *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, R.E. & Gibbons, N.E., Baltimore : Williams and Wilkins, 510-513
- GARVIE, E. I. 1986  
*Leuconostoc, Pediococcus*  
in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2, Krieg, N.R., Baltimore : William et Wilkins, 1071-1079



GEOLLER-VLALATTE, C. 1982

Produit et procédé permettant la désacidification dans des liquides divers, plus particulièrement l'élimination de l'acide malique des moûts et vins  
Brevet EP 0061949

GESTRELIUS, S. 1982

Potential application of immobilized viable cells in the food industry : malolactic fermentation of wine  
*Enzyme Eng.*, 6, 245-250

GU, K. F., CHANG, T. M. S., 1988

Conversion of  $\alpha$ -ketoglutarate into L-glutamic acid with urea as ammonium source using multienzyme systems and dextran-NAD<sup>+</sup> immobilized by microencapsulation within artificial cells in a bioreactor  
*Biotechnol. Bioeng.*, 32, 363-368

GU, K. F., CHANG, T. M. S., 1990

Production of essential L-branched-chain amino acids in bioreactors containing artificial cells immobilized multienzyme systems and dextran-NAD<sup>+</sup>  
*Biotechnol. Bioeng.*, 36, 263-269

GUILLOUX-BENATIER, M., FEUILLAT, M., CIOLFI, B. 1985

Contribution à l'étude de la dégradation de l'acide L-malique par les bactéries lactiques isolées du vin : effet stimulant des autolysats de levure  
*Vitis*, 24, 59-74

INGRAHAM, J. L., COOKE, G. M. 1960

Cité par Chagnaud, P. 1989

KANDLER, O., WEISS, N. 1986

*Lactobacillus*

in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2., Krieg, N.R., Baltimore : William et Wilkins 1209-1234

KAUFMANN, S., KORDES, S., DELCAMPILLO, 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

KELLY, W. J., ASMUNDSON, R. V., HOPCROFT, D. H. 1989

Growth of *Leuconostoc oenos* under anaerobic conditions  
*Am. J. Enol. Vitic.*, 40 (4), 277-282

KING, S. W. 1985

Recent developments of industrial malolactic starter cultures for the wine industry  
*Dev. Ind. Microbiology*, 26, 311-321

KOCH, A. 1900

Cité par Lonvaud-Funel, A. 1986

KORKES, S., OCHOA, S. 1948

Adaptive conversion of malate to lactate and carbon dioxide by *Lactobacillus arabinosus*  
*J. Biol. Chem.*, 176, 463-464

- KORKES, S., DEL CAMPILLO, A., OCHOA, S. 1950  
Biosynthesis of dicarboxylic acids by carbon dioxide fixation. IV. Isolation and properties of an adaptive "malic" enzyme from *Lactobacillus arabinosus*  
*J. Biol. Chem.*, **187**, 891-905
- KUMARAN, S. 1991  
Immobilisation d'enzymes pour la réalisation de biocapteurs. Analyse par injection en flux continu (FLA). Application au dosage des composés polluants  
Thèse Université Lyon I
- KUNKEE, R. E. 1967  
Malo-lactic fermentation  
*Adv. Appl. Microbiol.*, **9**, 235-279
- LAFON-LAFOURCADE, S. 1970  
Etude de la dégradation de l'acide L-malique par des bactéries lactiques non proliférantes isolées des vins  
*Ann. Tech. Agric.*, **19** (2), 141-154
- LAFON-LAFOURCADE, S., JOYEUX, A. 1979  
Techniques simplifiées pour le dénombrement et l'identification des microorganismes vivants dans les moûts et les vins  
*Conn. Vigne Vin*, **13** (4), 295-310
- LAUTENSACH, A., SUBDEN, R. E. 1984  
Cloning of malic acid assimilating activity from *Leuconostoc oenos* in *E. coli*  
*Microbios*, **39**, 29-39
- LAUTENSACH, A., SUBDEN, R. E. 1987  
Isolation and characterisation of *Leuconostoc oenos* mutants with defective malolactic activity  
*Microbios*, **52** (211), 115-127
- LEE, S. O., PACK, M. Y. 1980  
Immobilization of *Leuconostoc oenos* cells for wine deacidification  
*Korean J. Food Sci. Technol.*, **12** (4), 299-304
- LONVAUD, M., RIBEREAU-GAYON, P. 1973  
Utilisation d'une électrode à CO<sub>2</sub> pour la détermination de l'activité de l'enzyme malique des bactéries lactiques du vin  
*C. R. Acad. Sc.*, **276**, 2329-2331
- LONVAUD, M. 1975  
Recherches sur l'enzyme des bactéries lactiques assurant la transformation du malate en lactate  
Thèse Université Bordeaux II
- LONVAUD, M., LONVAUD-FUNEL, A., RIBEREAU-GAYON, P. 1977  
Le mécanisme de la fermentation malolactique des vins  
*Conn. Vigne Vin*, **11** (1), 73-91
- LONVAUD-FUNEL, A. 1982  
L'enzyme malolactique des bactéries lactiques du vin  
in *Utilisation des Enzymes en Technologie Alimentaire*. Dupuy P. Ed. , 451-456

- LONVAUD-FUNEL, A., STRASSER DE SAAD, A. M. 1982  
Purification and properties of a malolactic enzyme from a strain of *Leuconostoc mesenteroides* isolated from grapes  
*Appl. Environ. Microbiol.*, **43** (2), 357-361
- LONVAUD-FUNEL, A., DESENS, C., JOYEUX, A. 1985  
Stimulation de la fermentation malolactique par l'addition au vin d'enveloppes cellulaires de levure et différents adjuvants de nature polysaccharidique et azotée  
*Conn. Vigne Vin*, **19** (4), 229-240
- LONVAUD-FUNEL, A. 1986  
Recherches sur les bactéries lactiques du vin. Fonctions métaboliques, croissance, génétique plasmidique  
Thèse Université de Bordeaux II
- LONVAUD-FUNEL, A., JOYEUX, A., DESSENS, C. 1988 a  
Inhibition of malolactic fermentation of wines by products of yeast metabolism  
*J. Sci. Food Agric.*, **44**, 183-191
- LONVAUD-FUNEL, A., MASCLEF, J. -P., JOYEUX, A., PARASKEVOPOULOS, Y. 1988 b  
Etude des interactions entre levures et bactéries lactiques dans le moût de raisin  
*Conn. Vigne Vin*, **22** (1), 11-24
- LONVAUD-FUNEL, A., BITEAU, N., FREMAUX, C. 1989  
Identification de *Leuconostoc oenos* par utilisation de sondes d'ADN  
*Sci. Aliments*, **9** (3), 533-541
- LOWRY, O. H., ROSEMBROUGH, N. Z., FARRA, L., RANDALL, R. 1951  
Protein measurement with the Folin phenol reagent  
*J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275
- MANCA DE NADRA, M. C., STRASSER DE SAAD, A. M. 1987  
Effect of pH, sulfur dioxide and ethanol concentrations on the growth of lactic acid bacteria isolated from Cafayate (Argentina) wines  
*Microbiol. Aliments. Nutr.*, **5** (3), 241-245
- MARSH, G., KEAN, C. 1952  
Cité par Chagnaud, P. 1989
- MARTINEZ-MURCIA, A. J., COLLINS, M. D. 1990  
A phylogenetic analysis of the genus *Leuconostoc* based on reverse transcriptase sequencing of 16 S rRNA  
*FEMS Microbiol. Lett.*, **70** (1), 73-84
- MAZID, M.A., LAIDLER, K. J. 1982  
Kinetics of yeast alcohol dehydrogenase and its coenzyme coimmobilized in a tubular flow reactor  
*Biotechnol. Bioeng.*, **24**, 2087-2097
- MC CORD, J. D., RYU, D. D. Y. 1985  
Development of malolactic fermentation process using immobilized whole cells and enzymes  
*Am. J. Enol. Vitic.*, **36** (3), 214-218
- MC CORD, J. D., RYU, D. D. Y. 1986  
Allosteric behavior of malolactic enzyme isolated from *Leuconostoc oenos*  
*Abst. Paper. Am. Chem. Society*, **192**, 46

- MESTREZAT, W. 1908  
L'acide malique en vinification et les fermentations malo-lactiques  
*Revue de Viticulture*, XXIX, 756, 649-653
- MILLIERE, J. B., MATHOT, A. G., SCHMITT, P., DIVIES, C. 1989  
Phenotypic characterization of *Leuconostoc* species  
*J. Appl. Bacteriol.*, 67 (5), 529-542
- MOREAU, 1906  
Cité par Lonvaud-Funel, A. 1986
- MÖSLINGER, D. 1901  
Cité par Chagnaud, P. 1989
- MULLER-THURGAU, H. 1891  
Cité par Vaughn, R. H. 1955
- MULLER-THURGAU, H., OSTERWALDER, A. 1913  
Die Bakterien im Wein und Obstwein und die dadurch verursachten Veränderungen  
*Zentr. Bakteriolog. Parasitenk. Abt. II*, 36 (6/14), 129-338
- NAOURI, P., CHAGNAUD, P., GALZY, P., MATHIEU, J. 1989  
Optimisation of the conditions for preparing bacterial cultures for malolactic bioconversion  
*J. Biotechnol.*, 10, 135-150
- NAOURI, P., CHAGNAUD, P., ARNAUD, A., GALZY, P. 1990a  
Purification and properties of a malolactic enzyme from *Leuconostoc oenos* ATCC 23278  
*J. Basic Microbiol.*, 30 (8), 577-585
- NAOURI, P., CHAGNAUD, P., ARNAUD, A., GALZY, P. 1990b  
Essais de bioconversion malolactique des vins au moyen d'un réacteur à lit fluidisé et à cellules immobilisées  
*Rev. Suisse Vitic. Arboric. Hortic.*, 22 (3), 207-213
- NOVELLA, M. A., PEREZ-DUQUE, P. 1986  
Maloalcoholic fermentation by *Schizosaccharomyces*  
*Alimentaria*, 23 (177), 54-56
- OUGH, C. S., CROWELL, E. A., KUNKEE, R. E., VILAS, M. R., LAGIER, S. 1987  
A study of histamine production by various wine bacteria in model solutions and in wine  
*J. Food Process. Preserv.*, 12 (1), 63-70
- PASTEUR, L. 1858  
Mémoire sur la fermentation appelée lactique  
*Ann. Chim. Phys.*, 52, 404-418
- PASTEUR, L. 1866  
Cité par Lonvaud-Funel, A. 1986
- PERSSON, M., MANSSON, M.-O., BULOW, L., MOSBACH, K., 1991  
Continuous regeneration of NAD(H) covalently bound to a cysteine genetically engineered into glucose dehydrogenase  
*Biotechnology*, 9, 280-284
- PEYNAUD, E. 1968  
Mécanisme biochimique de la fermentation malolactique  
*C. R. Acad. Sc. Paris*, T 267 D, 121-122

- PILONE, G. J., KUNKEE, R. E. 1972  
Characterization and energetics of *Leuconostoc oenos* ML 34  
*Am. J. Enol. Vitic.*, **23**, 61-70
- POITTEVIN, E., CARRASCO, A., GIOIA, M. N. 1963  
Studies on malolactic fermentation of wines in Uruguay. IV. Studies on lactic bacteria from experimental wine process  
*Rev. Lat.-amer. Microbiol.*, **6** (3-4), 147-158
- PRAHL, C., LONVAUD-FUNEL, A., KORSGAARD, S., MORRISON, E., JOYEUX, A. 1988  
Etude d'un nouveau procédé de déclenchement de la fermentation malolactique  
*Conn. Vigne Vin*, **22** (3), 197-207
- PRIEST, F. G., PLEASANTS, J. G. 1988  
Numerical taxonomy of some leuconostocs and related bacteria isolated from scotch whisky distilleries  
*J. Appl. Bacteriol.*, **64** (5), 379-387
- RADLER, F. 1958  
Untersuchung des biologischen Säureabbaus im Wein Isolierung und Charakterisierung von Äpfelsäure-abbauenden Bakterien  
*Archiv F. Mikrobiologie*, **30**, 64-72
- RADLER, F., BROHL, K. 1984  
The metabolism of several carboxylic acids by lactic acid bacteria  
*Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **179**, 228-231
- RADLER, F. 1986  
Microbiol biochemistry (of wine)  
*Experientia*, **42** (8), 884-893
- RADLER, F. 1986  
Wine : starter cultures and new developments. Wein : Starter Kulturen und neue Entwicklungen  
*Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.*, **10** (1/2), 5-12
- REEVES, M. J., DAVIS, C. R., BROOKS, J. D. 1987  
Malolactic fermentation - An important second  
*Food Technol. N. Z.*, **22** (2), 22-23
- RENAULT, P., HESLOT, H. 1987  
Selection of *Streptococcus lactis* mutants defective in malolactic fermentation  
*Appl. Environ. Microbiol.*, **53** (2), 320-324
- RENAULT, P., GAILLARDIN, C., HESLOT, H. 1988  
Role of malolactic fermentation in lactic acid bacteria  
*Biochimie*, **70**, 375-379
- RENAULT, P., GAILLARDIN, C., HESLOT, H. 1989  
Product of the *Lactococcus lactis* gene required for malolactic fermentation is homologous to a family of positive regulators  
*J. Bacteriol.*, **171** (6), 3108-3114
- RIBEREAU-GAYON, P., PEYNAUD, E. 1937-1946  
Cité par Lonvaud-Funel, A. 1986

ROSENTHIEL, 1908

Cité par Lonvaud-Funel, A. 1986

ROSSI, J., CLEMENTI, F. 1984

L-malic acid catabolism by polyacrylamide gel entrapped *Leuconostoc oenos*  
*Am. J. Enol. Vitic.*, **35** (2), 100-102

SALMON, J. M. 1987

Determination of malic enzyme activity on permeabilized cells of *Saccharomyces cerevisiae*,  
using a dissolved CO<sub>2</sub> probe  
*Biotechnology Techniques*, **1** (1), 7-10

SCHÜTZ, M., RADLER, F. 1973

Das "Malatenzyme" von *Lactobacillus plantarum* und *Leuconostoc mesenteroides*  
*Arch. Mikrobiol.*, **91**, 183-202

SEIFERT, W. 1901

Cité par Lonvaud-Funel, A. 1986

SEVERINGHAUS, J. W. 1968

Measurements of blood gases : pO<sub>2</sub> and pCO<sub>2</sub>  
*Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **148**, 115-132

SNOW, S. R., KUNKEE, R. E., HODGES, R. A., WILLIAMS, S. A. 1984

Malolactic gene  
Brevet EP 0103399

SNOW, R. 1985

Genetic engineering of a yeast strain for malolactic fermentation of wine  
*Food. Technol.*, Octobre, 96-101

SPETTOLI, P., BOTTACIN, A., NUTI, M. P., ZAMORANI, A. 1982 a.

Immobilisation of *Leuconostoc oenos* ML 34 in calcium alginate gels and its application to  
wine technology  
*Am. J. Enol. Vitic.*, **33** (1), 1-4

SPETTOLI, P., NUTI, M. P., BOTTACIN, A., ZAMORANI, A. 1982 b.

Technological traits of malolactic activity from *Leuconostoc oenos* ML 34 immobilized in  
calcium alginate gels  
in *Utilisation des Enzymes en Technologie Alimentaire*. Dupuy Ed., 451-456

SPETTOLI, P., ZAMORANI, A. 1983

Purification of malolactic activity from *Leuconostoc oenos* ML 34 by affinity  
chromatography  
in *Progress In Food Engineering* Forster-verlag A. G. Künsnacht R F A. C. Cantarelli And  
C. Peri Ed., 377-378

SPETTOLI, P., NUTI, M. P., ZAMORANI, A. 1984 a

Properties of malolactic activity purified from *Leuconostoc oenos* ML 34 by affinity  
chromatography  
*Appl. Environ. Microbiol.*, **48** (4), 900-901

SPETTOLI, P., NUTI, M. P., DAL, A., PERUFFO, B., ZAMORANI, A. 1984 b

Malolactic fermentation and secondary product formation in wine by *Leuconostoc oenos* cells  
immobilized in a continuous-flow reactor  
*Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **434**, 461-464

- SPETTOLI, P., NUTI, M. P., CRAPISI, A., ZAMORANI, A. 1987  
Technological improvement of malolactic fermentation in wine by immobilized microbial cells in a continuous flow reactor  
*Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **501**, 385-389
- STRASSER DE SAAD, A. M., PESCE DE RUIZ HOLGADO, A., OLIVER, G. 1984  
Purification and properties of malolactic enzyme from *Lactobacillus murinus* CNRZ 313  
*J. Appl. Biochem.*, **6**, 374-383
- STRASSER DE SAAD, A. M., PESCE DE RUIZ HOLGADO, A., OLIVER, G. 1985  
Kinetic studies of malolactic enzyme from *Lactobacillus murinus* : role of Mn<sup>2+</sup>  
*J. Appl. Biochem.*, **7**, 228-234
- THORNTON, R. J., RODRIGUEZ, S. B. 1986  
Improved wine making inoculants and related means and methods  
Brevet EP 226328
- TOTSUKA, A., HARA, S. 1981  
Decomposition of malic acid in red wine by immobilized microbial cells  
*Hakkokogaku*, **59**, 231-237
- TRACEY, R. P., BRITZ, T. J. 1987  
A numerical taxonomic study of *Leuconostoc oenos* strains from wine  
*J. Appl. Bacteriol.*, **63** (6), 523-532
- TRUCK, H. U., HAMMES, W. P. 1989  
Die Verwendung eines Fließbettreaktors zur Ausführung des biologischen Säureabbaus im Wein mit immobilisierten Zellen  
*Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.*, **12**, 119-126
- UKEDA, H., KAMIKADO, H., MATSUMOTO, K., OSAJIMA, Y. 1989 a  
A new approach to the co-immobilization of alcohol dehydrogenase and NAD on glutaraldehyde-activated Sepharose and its application to the enzymatic analysis of ethanol  
*Agric. Biol. Chem.*, **53** (1), 25-30
- UKEDA, H., ONO, K., IMABAYASHI, M., MATSUMOTO, K., OSAJIMA, Y. 1989 b  
Direct immobilisation of NAD to Sepharose 4B by using the bifunctional reagent glutaraldehyde  
*Agric. Biol. Chem.*, **53** (1), 235-237
- UKEDA, H., IMABAYASHI, M., MATSUMOTO, K., OSAJIMA, Y. 1989 c  
The co-immobilization of alcohol dehydrogenase, diaphorase, and NAD on glutaraldehyde-activated Sepharose  
*Agric. Biol. Chem.*, **53** (8), 2263-2265
- VAUGHN, R. H. 1955  
Bacterial spoilage of wines with special reference to California conditions  
*Adv. Food Research.*, **6**, 67-108
- WIBOWO, D., ESCHENBRUCH, R., DAVIS, C. R., FLEET, B. H., LEE, T. H. 1985  
Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine : a review  
*Am. J. Enol. Vitic.*, **36** (4), 302-313
- WIBOWO, D., FLEET, G.H., LEE, T.H., ESCHENBRUCH, R.E. 1988  
Factors affecting the induction of malolactic fermentation in red wines with *Leuconostoc oenos*  
*J. Appl. Bacteriol.*, **64** (5), 421-428

---

WILLIAMS, S. A., HODGES, R. A., STRIKE, T. L., SNOW, R., KUNKEE, R. E.  
1984

Cloning the gene for the malolactic fermentation of wine from *Lactobacillus delbruedkii* in *E. coli* and yeasts

*Appl. Environ. Microbiol.*, **47** (2), 288-293

YANG, D., WOESE, C. R. 1989

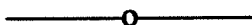
Phylogenetic structure of the "Leuconostocs". An interesting case of a rapidly evolving organism

*System. Appl. Microbiol.*, **12**, 145-149

YOSHIZUMI, H. 1963

Studies on the bacteria found during the process of wine making

*Agr. Biol. Chem.*, **27** (8), 590-595







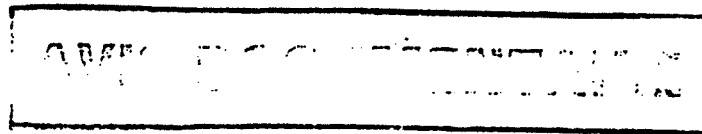
# ANNEXE



BREVET déposé le : 16 OCT 1990

N° : 90. 13131

dessins N° : 13787 - 2pl



Réacteur bio-catalysé, et procédé de traitement correspondant, applicables notamment à la transformation malolactique du vin

Titulaire : Fondation reconnue d'utilité publique,  
selon le décret du 24.10.88 (JO du 28.10.88)  
dite :  
FONDATION RHONE-ALPES FUTUR  
17 Boulevard des Belges  
69006 LYON

Inventeur : Madame Bernadette FESTAZ FURET  
Les Quarts  
Mollon  
01800 VILLIEU-LOYES MOLLON

Monsieur Jean-Claude HEALY  
16 Allée Crêt de Montaud  
42000 SAINT-ETIENNE

Monsieur Canh TRAN-MINH  
2 Allée Fénélon  
42100 SAINT ETIENNE

Correspondance et Facturation :

FONDATION RHONE-ALPES FUTUR  
17 Boulevard des Belges  
69006 LYON

A l'attention de Madame BONNERUE



**Réacteur bio-catalysé, et procédé de traitement correspondant,  
applicables notamment à la transformation malolactique du vin**

La présente invention concerne un réacteur pour le traitement d'une matière, par la transformation chimique biocatalysée d'un substrat contenu  
5 dans la matière à traiter, ainsi qu'un procédé pour réaliser ce traitement, pouvant être mis en oeuvre notamment par ce réacteur.

Par transformation chimique d'un substrat, on entend toute réaction, en une ou plusieurs étapes, conduisant à la formation d'au moins un produit différent du substrat, le substrat étant une molécule en solution ou en  
10 suspension dans la matière à traiter, qui peut être un milieu synthétique, biologique, tel qu'un fluide corporel, ou alimentaire.

Une telle transformation chimique peut aussi bien être conduite pour obtenir, après isolement ou simple évaporation du solvant, seulement le produit de transformation d'un substrat, que pour obtenir le produit de  
15 transformation en mélange avec la matière traitée.

Par transformation chimique biocatalysée, on entend toute réaction chimique activée par un catalyseur biologique, c'est-à-dire un enzyme. Un certain nombre d'enzymes ont besoin de cofacteurs et/ou de coenzymes, pour exercer leur action catalytique, aussi de manière générale on parlera de  
20 transformation chimique catalysée par un "système enzymatique", ce dernier comportant l'enzyme ou les enzymes spécifiques de cette transformation, et les cofacteurs nécessaires, et les coenzymes.

La présente invention concerne plus particulièrement un réacteur pour le traitement d'une matière comportant un substrat tel que défini  
25 précédemment, comprenant une enceinte et au moins une membrane semi-perméable disposée dans cette enceinte, séparant cette dernière en au moins deux compartiments, l'un dit primaire, et l'autre dit secondaire, ladite membrane comprenant un matériau greffable chimiquement, deux circuits associés à ladite enceinte, incorporant respectivement undit compartiment  
30 primaire et undit compartiment secondaire, l'un desdits circuits dit enzymatique étant affecté à la rétention du "système enzymatique", avec circulation d'un milieu liquide dans ledit circuit, et l'autre desdits circuits dit de traitement étant affecté à la circulation de la matière à traiter, le transfert du substrat au moins, d'un compartiment à l'autre, s'effectuant par diffusion  
35 au travers de la membrane.

Les travaux de G. BRUNNER et F. TEGTMEIER publiés dans Artificial Organs, (1984) 8, 161-166 décrivent un réacteur et un procédé mis en oeuvre

par ce réacteur, pour traiter du sang. Ce traitement est une détoxification qui consiste en la transformation chimique biocatalysée des substrats toxiques de type phénolique, du sang en produits glucuronylés. Le "système enzymatique" spécifique de cette transformation chimique comprend l'uridine-5 5'-phosphate-glucuronyltransférase dite UDP-glucuronyltransférase, et son coenzyme, l'acide 5'-diphosphoglucuronique (UDPGA). Ce réacteur comprend une enceinte et une membrane tubulaire disposée dans cette enceinte, sous la forme d'une pluralité de fibres creuses, en matériau polypropylène, séparant dans ladite enceinte deux compartiments primaire et secondaire, respectivement, à l'extérieur des fibres creuses, et à l'intérieur des fibres creuses. Le circuit primaire extérieur est affecté à la circulation du "système enzymatique", en milieu aqueux, le circuit secondaire intérieur est affecté à la circulation de la matière à traiter, à savoir le sang. La membrane semi-perméable est préalablement traitée par une phase lipidique, qui emplit les pores de ladite membrane, de manière à obtenir un passage sélectif des molécules hydrophobes au travers de la membrane, du circuit de traitement au circuit enzymatique et du circuit enzymatique au circuit de traitement. Le substrat phénolique toxique contenu dans le sang est hydrophobe. Il diffuse, du circuit de traitement au circuit enzymatique, au travers de la membrane, subit sa transformation chimique, à savoir une glucuronidation catalysée par le "système enzymatique", pour conduire à un glucuronide. Le glucuronide formé est hydrophile, et par conséquent demeure dans le circuit enzymatique.

Un tel réacteur permet donc de réaliser la détoxification extra-corporelle du sang, par transformation du substrat toxique sous forme de produits glucuronylés, ces derniers étant séparés et éliminés du sang traité.

Un tel réacteur présente l'avantage de pouvoir conserver le "système enzymatique", à savoir l'enzyme et le coenzyme, en libre circulation dans le circuit enzymatique, sans risque de diffusion au travers de la membrane, puisque ce sont des molécules hydrophiles et, par conséquent, de bénéficier d'un rendement élevé pour la transformation chimique biocatalysée.

Cependant, la diffusion au travers de la membrane de ce réacteur est liée aux propriétés hydrophobes/hydrophiles des molécules, et l'emploi d'un tel réacteur apparaît limité à des matières particulières.

D'autre part, il ne permet pas de réaliser la transformation chimique biocatalysée de substrats hydrophiles ou lipophobes, et, dans le cas où le substrat est hydrophobe, il ne permet pas de récupérer par passage en sens inverse dans la membrane semi-perméable le produit de transformation dans

la matière traitée, si ledit produit est hydrophile.

Les travaux de M.A. MAZID et de K.J. LAIDLER, publiés dans *Biotechnology and Bioengineering* (1982) 24, 2087-2097, concernent aussi la transformation chimique d'un substrat, catalysée par un "système enzymatique", dans un réacteur, et plus particulièrement la déshydrogénation de l'éthanol en acétaldéhyde, catalysée par l'alcool-déshydrogénase de levure; et son coenzyme, le nicotinamide-adénine-dinucléotide (NAD).

Le réacteur comprend une membrane semi-perméable tubulaire, en matériau polyamide, définissant un compartiment intérieur appartenant au circuit de traitement de la matière première, à savoir l'éthanol, et sur la paroi interne de laquelle sont greffés d'une part l'enzyme et d'autre part le coenzyme. Le coenzyme est indirectement greffé sur la membrane, au moyen d'un bras ou chaîne moléculaire flexible, lui permettant d'accéder au centre actif de l'enzyme, au cours de la transformation chimique.

Le circuit intérieur de la membrane tubulaire est ainsi affecté, et au "système enzymatique" fixé sur ladite membrane, et à la circulation de la matière à traiter, qui est dans ce cas le substrat lui-même, à savoir l'éthanol. Le produit de transformation est recueilli à la sortie du tube.

Ce réacteur permet de réaliser une transformation chimique catalytique d'un substrat, et de récupérer le produit obtenu avec un rendement élevé, et sans étape d'isolement du produit, de la fraction du "système enzymatique".

Cependant, le même circuit intérieur met en présence le "système enzymatique", le substrat à transformer et le produit de transformation, et, dans ces conditions, l'enzyme peut être rapidement inhibé par le produit de transformation. Ce dernier s'avère souvent être un inhibiteur de l'enzyme en y restant lié, et en masquant ainsi son site actif.

Un tel réacteur présente donc un risque d'inactivation de l'enzyme ou de diminution considérable de l'activité enzymatique, à cause des produits de transformation, mais aussi des inhibiteurs présents dans la matière à traiter, à côté du substrat. Un tel réacteur peut aussi travailler à un pH, à savoir celui de la matière à traiter, bien différent de la zone de pH optimum pour l'activité catalytique du "système enzymatique", ce qui peut ralentir considérablement la transformation chimique du substrat.

La présente invention a pour objet de remédier aux inconvénients exposés précédemment.

Un premier but de la présente invention concerne un réacteur ou procédé de traitement, avec membrane semi-perméable et "système



enzymatique", permettant de traiter toute matière première, incorporant un substrat approprié, quelles que soient les propriétés hydrophiles/hydrophobes, lipophiles/lipophobes du substrat et du produit de transformation chimique.

5 Un second but de la présente invention concerne un réacteur ou procédé de traitement, du type défini précédemment, permettant lors de la transformation chimique de réintégrer le ou les produits dans la matière traitée.

10 Un troisième but de la présente invention concerne aussi un réacteur tel que défini précédemment, permettant une activité optimum du "système enzymatique".

Tous ces buts peuvent être atteints par la ou les caractéristiques techniques définies ci-après, considérées isolément ou en combinaison :

1) La membrane semi-perméable présente un caractère électriquement neutre vis-à-vis du substrat, comme vis-à-vis du produit de transformation, et permet un transfert de ce dernier au moins, en sens inverse du transfert du substrat ; par "électriquement neutre", on entend que la membrane ou son matériau constitutif greffable chimiquement ne présente pour l'essentiel aucun caractère hydrophile/hydrophobe, lipophile/lipophobe particulier, vis-à-vis au moins du substrat et du produit de transformation ; en d'autres termes, avec une membrane selon l'invention la diffusion au travers de cette dernière est essentiellement soumise aux lois de la dialyse.

2) Au moins l'enzyme ou le coenzyme du "système enzymatique" est greffé chimiquement, directement ou indirectement, sur la membrane, sur la face de cette dernière, en relation avec le circuit enzymatique.

25 La présente invention concerne également un procédé pour le traitement en continu d'une matière comportant un substrat transformable chimiquement en au moins un produit, consistant à :

- disposer dans un circuit dit enzymatique un "système enzymatique" de catalyse de ladite transformation chimique du substrat, comprenant au moins un enzyme et un coenzyme,

30 - établir dans ledit circuit enzymatique la circulation d'un milieu liquide,

- établir une circulation, dans un circuit dit de traitement, de la matière à traiter,

35 - séparer localement ces deux circuits par une membrane semi-perméable, permettant la diffusion au travers de ladite membrane dudit substrat, du circuit de traitement au circuit enzymatique, et dudit produit du circuit

enzymatique au circuit de traitement,

- greffer chimiquement au moins l'enzyme ou le coenzyme du "système enzymatique" directement ou indirectement, sur la membrane, sur la face de cette dernière en relation avec le circuit enzymatique.

5 De manière surprenante, on a observé avec un protocole expérimental adéquat que, selon l'invention, dans le cas où les pH du milieu contenant le "système enzymatique" et de la matière à traiter sont différents, le greffage de l'un ou/et l'autre de l'enzyme et du coenzyme entraîne un ralentissement substantiel de l'évolution de la différence de pH, de part et d'autre de la  
10 membrane semi-perméable. Cette caractéristique apporte une solution déterminante au problème de la faiblesse de l'activité enzymatique quand celle-ci est liée au pH.

L'invention trouve une application toute particulière dans le traitement de jus alimentaires contenant de l'acide malique, notamment un vin ayant subi  
15 la fermentation alcoolique, et correspondant à l'étape postérieure de fermentation malolactique.

Ce traitement des jus alimentaires, et du vin en particulier, consiste à transformer chimiquement par décarboxylation, l'acide malique contenu dans le vin en acide lactique. Cette transformation chimique est catalysée par le  
20 "système enzymatique" suivant :

- un enzyme malolactique, nicotinamide-adénine-dinucléotide, et ions métalliques type Mn, Co, Mg, Zn, Ni.

L'intérêt de cette étape malolactique tient à la désacidification et à l'amélioration gustative du vin qui en résulte, et tant qu'elle n'a pas eu lieu,  
25 le vin ne peut être mis en bouteille. A l'heure actuelle, elle se déroule de manière spontanée, sous l'influence de la flore bactérienne présente naturellement dans le vin, à la fin de la fermentation alcoolique, les bactéries responsables de la fermentation malolactique étant les bactéries lactiques du vin, à savoir Leuconostoc, Pediococcus et Lactobacillus.

30 Les procédés couramment utilisés pour favoriser la croissance bactérienne, consistent à modérer le sulfitage de la vendange, à contrôler la température ou à effectuer une désacidification chimique. Cependant, le déclenchement de la fermentation malolactique reste toujours aléatoire et, depuis une décennie, il se développe des procédés d'immobilisation de  
35 bactéries lactiques.

L'application de tels procédés à la fermentation malolactique soulève des problèmes liés aux risques de contamination des bactéries, liés à une

perte rapide de l'activité malolactique des bactéries, et liés aux risques de relarguage de produits indésirables dans le vin.

La présente invention, telle que définie précédemment, peut être appliquée à la fermentation, ou plus exactement à la transformation malolactique du vin, de la manière suivante :

- le "système enzymatique" comprend un enzyme malolactique, obtenu et purifié à partir d'une culture de bactéries Leuconostoc oenos ou d'autres bactéries lactiques, en général, et du NAD (nicotinamide-adénine-dinucléotide) à titre de coenzyme, ou un dérivé du NAD,

- le milieu liquide du circuit enzymatique est obtenu à partir du vin traité,

- le pH du milieu liquide dans le circuit enzymatique est ajusté à une valeur située dans la zone de pH d'activité optimum du "système enzymatique",

- la pression transmembranaire entre le circuit enzymatique et le circuit de traitement est substantiellement nulle,

- on contrôle la température des deux circuits à une valeur optimum pour l'activité du "système enzymatique",

- le circuit enzymatique et le circuit de traitement sont disposés à co-courant.

La présente invention apporte alors une solution déterminante aux problèmes spécifiquement posés par la fermentation malolactique, et non résolus à ce jour par des systèmes plus ou moins complexes, à bactéries immobilisées.

L'invention apporte tout d'abord un réacteur bio-catalysé, au sens d'un système de traitement continu dans lequel le vin entre avec de l'acide malique, et sort avec de l'acide lactique.

L'invention apporte ensuite un traitement malolactique naturel, c'est-à-dire sans adjonction de produits ou additifs chimiques particuliers, ce qui préserve l'intégrité biochimique du vin.

L'invention apporte un réacteur pour le traitement d'une matière, dont la fraction la plus coûteuse, à savoir le NAD, est préservée dans le circuit enzymatique, durant le traitement complet, au sens où il n'apparaît nécessaire, ni de le régénérer, ni de le remplacer, en tout cas lors du traitement malolactique du vin.

Pour terminer, on peut observer qu'à ce jour, si le "système enzymatique" malolactique a été décrit dans la littérature, il n'a jamais été envisagé de le

fixer sur un support, par exemple une membrane ; cf : P. CUENAT et J.C. VILLETAZ, Revue Suisse Vitic. Arboric. Hortic., (1984) 16 (3) 145-151, et P. CHAGNAUD Thèse (1989) Montpellier,

5 d'une part en raison de son pH d'activité optimum, de l'ordre de 6, très éloigné de celui du vin, en général de l'ordre de 3, et d'autre part en raison de l'instabilité du NAD en milieu acide.

10 La présente invention est maintenant décrite dans le cadre de la transformation malolactique du vin, et par référence au dessin annexé, représentant selon la figure 1, de manière schématique, un réacteur conforme à l'invention.

Le réacteur selon l'invention permet de traiter en continu un vin ayant subi la fermentation alcoolique, comportant de l'acide malique à transformer chimiquement en acide lactique.

Ce réacteur comprend de manière générale :

15 - une enceinte 1, formée par un tube cylindrique fermé à ses deux extrémités

20 - une membrane semi-perméable 2 disposée dans ladite enceinte, formée par une multiplicité de fibres creuses 3, ayant chacune une forme tubulaire ; les fibres 3 s'étendent en parallèle, d'une extrémité à l'autre de l'enceinte 1, d'un distributeur 4 à un collecteur 5 ; ces fibres délimitent donc dans l'enceinte 1, un compartiment primaire 6, délimité à l'extérieur des fibres 3 par le tube 1, et un compartiment secondaire 7 intérieur aux fibres 3, communiquant à une extrémité avec le distributeur 4, et à l'autre extrémité avec le collecteur 5 ; le matériau constitutif des fibres creuses 3, et donc de la membrane semi-perméable est un polymère greffable chimiquement, par exemple un polyamide

25 - un circuit 8 associé à l'enceinte 1, dit enzymatique, incorporant le compartiment secondaire 7 intérieur aux fibres 3, pour la rétention du "système enzymatique" de catalyse défini ci-après ; à l'extérieur de l'enceinte 1, ce circuit comprend un conduit 9 reliant le collecteur 5 au distributeur 4, par l'intermédiaire d'un pot de dégazage 10, lui-même comportant un orifice 11 de dégazage et une résistance 12 de chauffage, et par l'intermédiaire d'une pompe 13 ; ce circuit enzymatique permet une circulation d'un milieu liquide, constitué au démarrage du réacteur par une fraction prélevée sur le vin traité, dont le pH a été amené à une valeur optimum, par exemple aux environs de 6

35 - un circuit 14 dit de traitement, affecté à la circulation du vin à

traiter, incorporant le compartiment primaire 6 extérieur aux fibres creuses 3, défini précédemment ; à l'extérieur de l'enceinte 1, ce circuit comporte un échangeur 15 permettant de porter le vin à une température optimum de traitement, et un filtre 16 à l'entrée du réacteur, permettant si  
5 nécessaire de filtrer le vin à traiter ; on observera par ailleurs que le circuit de traitement 14 et le circuit enzymatique 8 sont à co-courant l'un de l'autre, de manière à maintenir plus facilement une pression transmembranaire substantiellement nulle, entre le circuit enzymatique et le circuit de traitement.

10 Le "système enzymatique" retenu pour la transformation malolactique consiste en un enzyme malolactique, obtenu et purifié à partir d'une culture de bactéries Leuconostoc oenos, et du NAD (nicotinamide-adénine-dinucléotide).

Ce système est greffé chimiquement, sur la membrane 2, et plus précisément sur la face intérieure des fibres creuses 3, en relation avec le  
15 circuit enzymatique 8. Ce greffage est obtenu de manière traditionnelle, par des traitements chimiques appropriés du matériau polymère des fibres 3, tels que décrits dans le document suivant : M.A. MAZID et K.J. LAIDLER, Biotechnol. Bioeng. (1982) 24, 2087-2097, dont le contenu est incorporé à la présente description, en tant que de besoin. Selon cette technique antérieure,  
20 un dérivé du coenzyme NAD, à savoir le N<sup>6</sup>[(6-aminohexyl)carbamoyleméthyl]-NAD est fixé sur la face interne des fibres creuses 3, en présence du 1-cyclohexyl-3(2-morpholinoéthyl)-carbodiimide métho-p-toluène sulfonate (CMC) et comprend ainsi un bras flexible permettant l'accès de l'enzyme par le coenzyme.

25 Par ailleurs, comme déjà dit plus haut, la membrane semi-perméable présente un caractère électriquement neutre vis-à-vis de l'acide malique comme vis-à-vis de l'acide lactique, de telle sorte que le passage du substrat à transformer (acide malique) de l'extérieur à l'intérieur des fibres creuses 3, et le passage du produit de réaction (acide lactique) de l'intérieur vers  
30 l'extérieur des fibres creuses 3, est régi pour l'essentiel par les lois traditionnelles de la dialyse.

S'agissant de la membrane constitutive des fibres creuses 3, celle-ci présente un coefficient de diffusion du substrat à transformer, et un coefficient de diffusion du produit de transformation, au travers de la membrane,  
35 sensiblement du même ordre, et au moins égaux à  $10^{-7}$  cm<sup>2</sup>/s. Le seuil de coupure de cette membrane est compris entre 10000 et 30000 Daltons.

Le réacteur décrit précédemment permet de traiter en continu un vin

introduit par l'entrée 17 du réacteur, et évacué à l'état traité par la sortie 18 du même réacteur. Ce procédé consiste de manière générale à :

- disposer dans le circuit enzymatique 8 le "système enzymatique" identifié précédemment,
- 5 - établir dans ce circuit 8 la circulation d'un milieu liquide, à savoir une fraction prélevée sur le vin traité, dont le pH a été amené à une valeur optimum, par exemple aux environs de 6,
- établir une circulation du vin à traiter dans le circuit de traitement 14,
- 10 - séparer localement ces deux circuits par la membrane semi-perméable 2, permettant au travers des fibres 3, d'une part la diffusion de l'acide malique, de l'extérieur vers l'intérieur, et d'autre part la diffusion de l'acide lactique, en sens inverse, de l'intérieur vers l'extérieur des fibres 3.

Le mode d'exécution décrit précédemment peut être modifié selon les  
15 variantes suivantes :

- le circuit enzymatique incorpore le compartiment primaire extérieur aux fibres creuses 3, moyennant quoi un enzyme et/ou un coenzyme du "système enzymatique" décrit précédemment, est greffé sur la surface externe des fibres creuses ; et le circuit de traitement incorpore le compartiment  
20 secondaire intérieur aux fibres creuses 3,

- la membrane semi-perméable 3 est plane, et disposée d'une extrémité à une autre de l'enceinte 1, de manière à délimiter dans cette dernière deux compartiments aplatis, en lieu et place des compartiments tubulaires décrits précédemment.

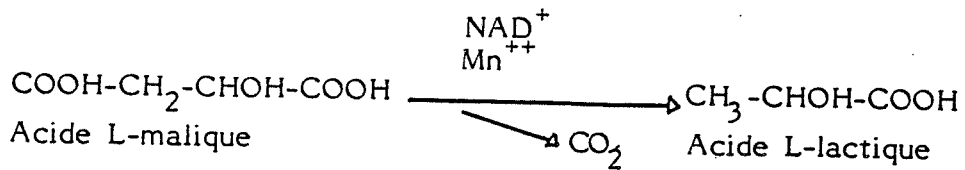
- 25 - seul l'enzyme du "système enzymatique" est greffé sur la membrane 3, et alors le coenzyme du même système est greffé sur un polymère, dissous ou en suspension dans le milieu liquide du circuit enzymatique, et de taille macromoléculaire supérieure au seuil de coupure de la membrane 3,

- 30 - l'enzyme du "système enzymatique" est dissous ou en suspension dans le milieu liquide du circuit enzymatique, et le coenzyme du même système est greffé sur l'enzyme lui-même,

- le coenzyme est greffé sur un bras flexible, lui-même greffé sur la membrane, alors que l'enzyme est dissous ou en suspension dans le milieu  
35 liquide du circuit enzymatique.

La présente invention est maintenant décrite au plan expérimental par référence à la transformation malolactique du vin selon le schéma réactionnel

suivant :



5

Cette réaction est catalysée par l'enzyme malolactique présent dans certaines bactéries lactiques du vin, des genres Leuconostoc, Lactobacillus, et Pediococcus.

#### EXEMPLE 1

10

Un enzyme malolactique partiellement purifié est obtenu à partir de la bactérie Leuconostoc oenos, selon le schéma général suivant :

1) Culture bactérienne de Leuconostoc oenos, selon le protocole décrit par Caspritz G. et Radler F. 1983, Malolactic enzyme of Lactobacillus plantarum, purification, properties and distribution among bacteria, J. Biol. Chem, 258 (8), 4907-4910, publication dont le contenu est incorporé à la présente description, en tant que de besoin.

15

2) Après récolte des bactéries, obtention et purification par chromatographie sur gel de l'enzyme, selon le protocole décrit par Lonvaud-Funel A. et Stasser de Saad A.M., 1982, Purification and properties of a malolactic enzyme from a strain of Leuconostoc mesenteroides isolated from grapes, Appl. Environ. Microbiol., 43(2), 357-361, publication dont le contenu est incorporé à la présente description, en tant que de besoin.

20

On obtient ainsi un enzyme partiellement purifié, dont le poids moléculaire peut être évalué environ à 100 000 Daltons, utilisé pour la suite des expériences.

25

On utilise ensuite un réacteur tel que décrit précédemment par référence à la figure 1, dont l'enceinte 1 avec les fibres creuses 3 constitue un module de membrane semi-perméable présentant les caractéristiques suivantes :

30

- 2100 fibres creuses de polyamide représentant une surface totale de 0,16 m<sup>2</sup>,

- diamètre interne de chaque fibre : 215 µm

- longueur de chaque fibre : 115 mm,

- volume interne du module : 8,8 ml,

35

- volume externe du module : 20 ml.

A l'intérieur des fibres creuses, 300 unités de l'enzyme partiellement purifié tel qu'obtenu précédemment et du NAD ont été fixés sur les fibres de





Après une hydrolyse acide des brins de polyamide, qui libère des fonctions  $\text{COO}^-$  et  $\text{NH}_3^+$ , on fixe sur la fonction  $\text{COO}^-$  un dérivé du NAD : le  $\text{N}^6$ [(6-aminohexyl)carbamoylmethyl]-NAD, en présence de CMC. Puis par l'intermédiaire du glutaraldéhyde, on fixe l'enzyme sur les fonctions amine libres.

5 A cette fin, on utilise le mode opératoire suivant :

- pour chaque étape, les différents produits circulent en continu et en circuit fermé, à l'intérieur du réacteur, à un débit de 10 ml/h, sauf pour les rinçages pour lesquels les produits circulent en circuit ouvert, à un débit de 200 ml/h

10 - hydrolyse HCL 2N, 23h

- rinçage à l'eau distillée, 1h

- 50 mg de dérivé NAD + 290 mg de CMC dans 17 ml d'eau distillée, pH 5, 21 h

- rinçage à l'eau distillée, 1h

15 - glutaraldéhyde 12,5 % dans du tampon borate 0,2 M, pH 8,5, 2h

- rinçage en tampon phosphate 0,1 M, pH 6, 20 mn

- enzyme malolactique : 15 ml correspondant à 300 unités au total, 90h à 4°C

20 - rinçage en tampon phosphate 0,1 M, pH 6, 17h à 4°C, à un débit de 10 ml/h

Avec le réacteur tel qu'obtenu précédemment, et conforme à la figure 1, on procède alors au plan d'expérience suivant.

L'efficacité du réacteur est tout d'abord testée avec une matière à traiter, du type milieu synthétique, comportant le substrat à transformer, et le cofacteur manganèse, selon la composition suivante :

- acide L-malique : 22 mM

-  $\text{MnCl}_2$  : 0,09 mM

- tampon phosphate pH 6 : 0,05 M

30 Ce milieu circule dans le circuit de traitement (14) avec un débit de 1,9 ml/h. Du tampon phosphate pH 6 circule dans le circuit enzymatique du réacteur à un débit de 8 ml/h.

En collectant différentes fractions à la sortie du réacteur, et en procédant à un dosage en acide malique et en acide lactique sur les fractions recueillies, on constate que :

35 - il existe une bonne correspondance entre la quantité d'acide malique disparu et la quantité d'acide lactique apparu, le second se situant en dessous du premier, sans doute en raison de la rétention de l'acide lactique dans le

réacteur, ce qui tend à inhiber la réaction,

- le rendement en acide lactique apparu par rapport à l'acide malique disparu, s'établit en moyenne à 60 %.

L'efficacité du réacteur est ensuite testée avec du vin, à savoir du  
5 Gaillac blanc, n'ayant pas subi la fermentation malolactique, contenant  
11 mM d'acide malique, et dont le pH est de 3. Ce vin circule dans le circuit  
de traitement du réacteur. Une partie du même vin est prélevée pour le  
circuit enzymatique, et amenée à pH 6 avec de la soude.

Toujours avec la même méthode expérimentale que précédemment, on  
10 constate que :

- la consommation d'acide malique est d'environ 10 % et reste stable,  
- cependant, l'acide lactique obtenu a tendance à rester à l'intérieur du  
réacteur.

#### EXEMPLE 2

15 On a ensuite utilisé un réacteur selon Fig. 1, mais dont seulement le  
NAD a été greffé chimiquement sur les fibres creuses en polyamide, selon la  
technique de greffage décrite par Mazid et Laidler ; dans ces conditions, seul  
l'enzyme (300 unités) circule librement dans le circuit enzymatique, où il est  
retenu.

20 Ce réacteur est ensuite expérimenté dans les conditions précédentes,  
directement avec du vin à pH 3 et contenant 13 mM d'acide malique. On  
obtient ainsi une consommation de 25 % de l'acide malique disponible,  
converti avec un rendement de 60 % en acide lactique, pour un débit de  
2,8 ml/h dans le circuit de traitement.

25 Cette expérience met en évidence l'amélioration de l'efficacité du  
réacteur, quand l'enzyme circule librement dans le circuit enzymatique.

#### EXEMPLE 3

Pour un même réacteur, tel que celui décrit par référence à Fig. 1, on  
a observé l'évolution du pH dans le circuit enzymatique et dans le circuit de  
30 traitement, dans les deux conditions suivantes :

1) le réacteur est "nu", c'est-à-dire ne comporte aucun "système  
enzymatique", greffé ou non, dans le circuit enzymatique,

2) le réacteur comporte selon l'exemple 1 "un système enzymatique"  
greffé, c'est-à-dire un enzyme et le NAD, greffés chimiquement à l'intérieur  
35 des fibres polyamide,

toutes choses égales par ailleurs, c'est-à-dire de débit du vin, circulant dans  
le circuit de traitement, et de débit du milieu liquide circulant dans le circuit

enzymatique.

On obtient alors les courbes représentées selon Fig. 2 et Fig. 3, représentant respectivement l'évolution du pH dans le circuit enzymatique, et l'évolution du pH dans le circuit de traitement, avec les conventions  
5 suivantes :

- pour Fig. 2, la courbe supérieure est relative au réacteur avec "système enzymatique" immobilisé, et la courbe inférieure au réacteur nu,

- pour Fig. 3, la courbe supérieure est relative au réacteur nu, et la courbe inférieure relative au réacteur avec "système enzymatique"  
10 immobilisé.

On observe donc que, que ce soit dans le circuit enzymatique ou dans le circuit de traitement, le pH évolue moins vite dans le réacteur où le "système enzymatique" est immobilisé, que dans le réacteur nu.

On peut expliquer a posteriori cette observation, par le fait que  
15 l'enzyme et son coenzyme forment une barrière à la surface de la membrane semi-perméable, du côté du circuit enzymatique, ce qui ralentit les échanges de part et d'autre, notamment ioniques. On en déduit que la fixation d'au moins l'enzyme ou le coenzyme apporte une meilleure stabilisation du pH dans les deux circuits du réacteur, de traitement et enzymatique.

Cet effet est d'autant plus important pour la transformation malo-  
20 lactique, que cette dernière entraîne en général une augmentation du pH de 0,1 à 0,3 unités.

15  
REVENDEICATIONS

1 - Réacteur pour le traitement en continu d'une matière comportant un substrat transformable chimiquement en au moins un produit, comprenant une enceinte (1) et au moins une membrane (3) semi-perméable disposée dans ladite enceinte, séparant cette dernière en au moins deux compartiments (6,7), l'un dit primaire et l'autre dit secondaire, ladite membrane comprenant un matériau greffable chimiquement, deux circuits (8) (14,18) associés à ladite enceinte, incorporant respectivement un dit compartiment primaire et un dit compartiment secondaire, l'un (8) des circuits dit enzymatique étant affecté à la rétention d'un "système enzymatique" de catalyse de la transformation chimique du substrat, comprenant au moins un enzyme et un coenzyme, avec circulation d'un milieu liquide dans ledit circuit, et l'autre (14,18) des circuits dit de traitement étant affecté à la circulation de la matière à traiter, le transfert du substrat au moins, d'un compartiment à l'autre, s'effectuant par diffusion au travers de la membrane, caractérisé en ce que la membrane semi-perméable présente un caractère électriquement neutre vis-à-vis du substrat, comme vis-à-vis du produit, et permet également un transfert du produit au moins, en sens inverse du transfert du substrat.

2 - Réacteur selon la revendication 1, caractérisé en ce que la membrane semi-perméable présente un coefficient de diffusion du substrat, et un coefficient de diffusion du produit, sensiblement du même ordre.

3 - Réacteur selon la revendication 2, caractérisé en ce que les coefficients de diffusion du substrat et du produit respectivement, au travers de la membrane semi-perméable sont au moins égaux à  $10^{-7}$  cm<sup>2</sup>/s.

4 - Réacteur selon la revendication 1, caractérisé en ce que le seuil de coupure de la membrane semi-perméable est compris entre 10 000 et 30 000 Daltons.

5 - Réacteur selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'au moins l'enzyme ou le coenzyme du "système enzymatique" est greffé chimiquement, directement ou indirectement, sur la membrane, sur la face de cette dernière en relation avec le circuit enzymatique.

6 - Réacteur selon la revendication 5, caractérisé en ce que l'enzyme du "système enzymatique" est greffé sur la membrane, et le coenzyme du "système enzymatique" est greffé sur un polymère dissous ou en suspension dans le milieu liquide du circuit enzymatique, et de taille macromoléculaire supérieure au seuil de coupure de la membrane.

7 - Réacteur selon la revendication 5, caractérisé en ce que l'enzyme

du "système enzymatique" est dissous ou en suspension dans le milieu liquide du circuit enzymatique, et le coenzyme dudit "système enzymatique" est greffé chimiquement sur la membrane.

5 8 - Réacteur selon la revendication 5, caractérisé en ce que l'enzyme du "système enzymatique" est dissous ou en suspension dans le milieu liquide du circuit enzymatique, et le coenzyme dudit "système enzymatique" est greffé sur l'enzyme lui-même.

10 9 - Réacteur selon la revendication 7 ou 8, caractérisé en ce que le coenzyme est greffé sur un bras flexible, lui-même greffé sur la membrane ou sur l'enzyme lui-même.

15 10 - Réacteur selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce qu'il est affecté à la transformation malolactique de jus alimentaires contenant de l'acide malique, le "système enzymatique" comprenant un enzyme malolactique purifié à partir d'une culture de Bactéries Leuconostoc oenos ou d'autres bactéries lactiques, et le coenzyme du nicotinamide-adénine-dinucléotide (NAD), ou un dérivé.

11 - Réacteur selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il est affecté à la transformation malolactique d'un vin ayant subi la fermentation alcoolique.

20 12 - Réacteur selon les revendications 9 et 10, caractérisé en ce qu'un dérivé du NAD, à savoir le  $N^6$ [(6-aminohexyl)carbamoyleméthyl]-NAD est greffé sur la membrane en présence de 1-cyclohexyl-3-(2-morpholinoéthyl) carbodiimide métho-p-toluène sulfonate (CMC).

25 13 - Procédé pour le traitement en continu d'une matière comportant un substrat transformable chimiquement en au moins un produit, consistant à :

- disposer dans un circuit dit enzymatique un "système enzymatique" de catalyse de ladite transformation chimique du substrat, comprenant au moins un enzyme et un coenzyme,

30 - établir dans ledit circuit enzymatique la circulation d'un milieu liquide,

- établir une circulation dans un circuit dit de traitement, de la matière à traiter,

35 - séparer localement ces deux circuits par une membrane semi-perméable, permettant la diffusion au travers de ladite membrane dudit substrat, du circuit de traitement au circuit enzymatique et dudit produit obtenu du circuit enzymatique au circuit de traitement,

caractérisé en ce qu'on greffe chimiquement au moins l'enzyme ou le coenzyme du "système enzymatique", directement ou indirectement, sur la membrane, sur la face de cette dernière en relation avec le circuit enzymatique.

5           14 - Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce que le milieu liquide est obtenu par prélèvement sur la matière à traiter.

          15 - Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce qu'on ajuste le pH du milieu liquide aqueux du circuit enzymatique à une valeur située dans la zone de pH d'activité optimum du "système enzymatique".

10           16 - Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce que la pression transmembranaire entre le circuit enzymatique et le circuit de traitement est substantiellement nulle.

          17 - Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce qu'on contrôle la température des deux circuits.

15           18 - Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce que le circuit enzymatique et le circuit de traitement sont à co-courant.

          19 - Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce qu'on traite un jus alimentaire contenant de l'acide malique, l'enzyme du "système enzymatique" étant un enzyme malolactique, et le coenzyme, le nicotinamide-adénine-dinucléotide (NAD).

20           20 - Procédé selon la revendication 19, caractérisé en ce qu'on traite un vin ayant subi la fermentation alcoolique.



## A B R E G E

Réacteur bio-catalysé, et procédé de traitement correspondant, applicables notamment à la transformation malolactique du vin

Réacteur pour le traitement en continu d'une matière comportant un substrat transformable chimiquement en au moins un produit, et procédé pouvant être mis en oeuvre par ce réacteur.

Le réacteur comprend une enceinte (1) et au moins une membrane semi-perméable (2) disposée dans l'enceinte (1), séparant cette dernière en au moins deux compartiments, l'un dit primaire (6) et l'autre dit secondaire (7), ladite membrane (2) comprenant un matériau greffable chimiquement, deux circuits associés à ladite enceinte, incorporant respectivement un dit compartiment primaire et un dit compartiment secondaire, l'un des circuits (8) dit enzymatique étant affecté à la rétention d'un "système enzymatique" de catalyse de la transformation chimique du substrat, comprenant au moins un enzyme et un coenzyme, avec circulation d'un milieu liquide dans ledit circuit, et l'autre des circuits (14) dit de traitement étant affecté à la circulation de la matière à traiter. La membrane semi-perméable (2) est électriquement neutre vis-à-vis du substrat et du produit, permettant leur transfert respectif d'un compartiment à l'autre.

Réacteur et procédé notamment mis en oeuvre pour la fermentation malolactique de jus alimentaires tels que le vin.

Fig. 1



FIG. 1

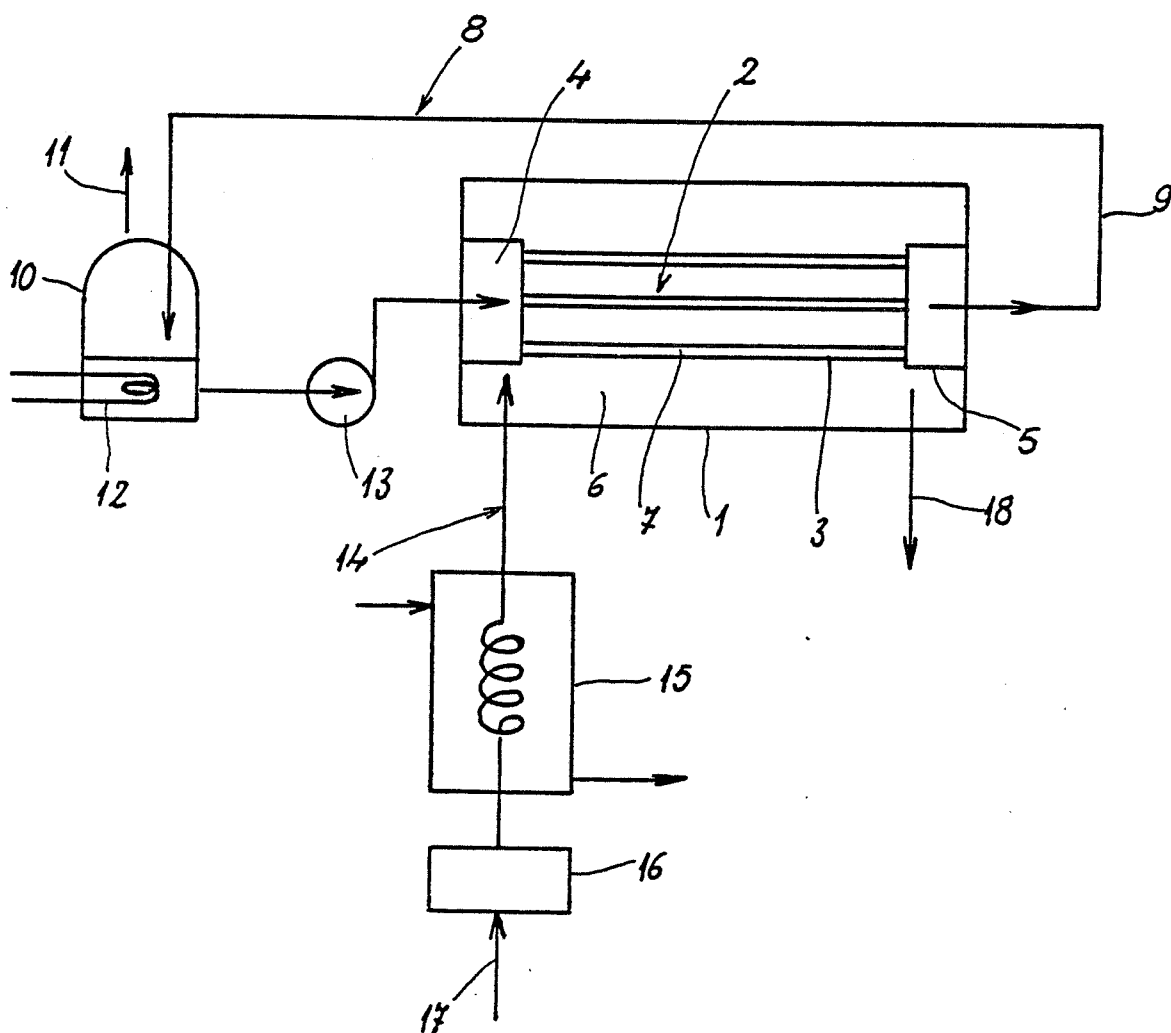


FIG.2

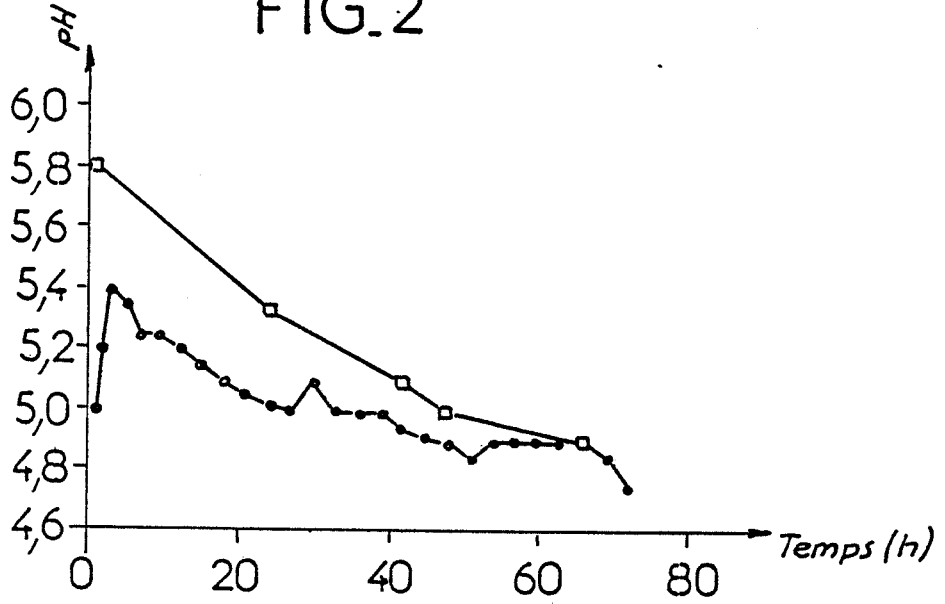
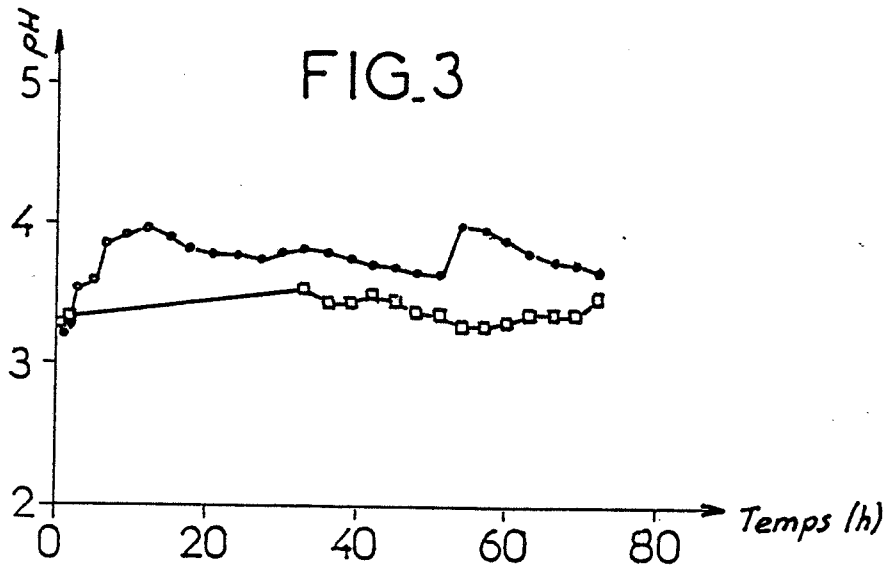


FIG.3







DIPLOME DE DOCTORAT

Date de la soutenance : le 22 Novembre 1991

Nom et Prénom de l'auteur : FESTAZ-FURET Bernadette

Titre de la Thèse :

**REACTEUR A ENZYME MALOLACTIQUE ET NAD  
PRODUCTION DE L'ENZYME MALOLACTIQUE DE *LEUCONOSTOC OENOS* 84-06  
MISE AU POINT D'UN REACTEUR A ENZYME MALOLACTIQUE ET NAD  
APPLICATION A LA FERMENTATION MALOLACTIQUE DES VINS**

Résumé :

La faisabilité d'un réacteur à enzyme malolactique pour effectuer et contrôler la fermentation malolactique (FML) des vins est étudiée.

Des bactéries lactiques du vin, *Leuconostoc oenos* 84-06, sont cultivées en fermenteur de 10 litres, sur un milieu induisant la fabrication de l'enzyme malolactique. La production d'enzyme est de 0,5 à 0,7 U/ml de milieu de culture, en 60 heures. L'enzyme malolactique est extraite par désintégration des bactéries aux ultrasons. Après action de la DNase I et précipitations au sulfate d'ammonium à 35 % puis à 70 %, l'extrait est filtré sur une colonne de chromatographie d'Ultrogel AcA 34. L'enzyme obtenue a une activité spécifique de 8,9 U/mg ; elle a été purifiée à 3,3 fois avec un rendement de 75 %. Sa masse moléculaire relative est d'environ 132 000, son point isoélectrique se situe à pH 4,35 et son pH optimum d'activité est de 5,5.

Cette enzyme est utilisée pour fabriquer le réacteur (demande de brevet Français n° 13131, déposée le 16 octobre 1990). Il s'agit d'un module d'ultrafiltration en fibres creuses de polyamide composé de deux circuits. Dans le circuit interne, le NAD est fixé et l'enzyme circule librement dans un milieu à pH 6 (milieu synthétique ou vin). Le milieu à traiter (milieu synthétique ou vin à pH 3) circule dans le circuit externe. Après passage dans le réacteur d'un milieu synthétique, le rendement de la FML est de 80 % à 95 % pendant 3 jours. Avec le vin, le rendement est de 50 % à 60 %.

Nous avons montré que la FML des vins est maintenant techniquement réalisable avec un réacteur à enzyme malolactique et NAD. Il faut optimiser chaque étape de façon à pouvoir appliquer cette technique à la FML en continu pour de plus grandes quantités de vin.

Mots clés :

Fermentation malolactique - *Leuconostoc oenos* - Enzyme malolactique - Production - Vin - Réacteur - Fibres creuses - NAD immobilisé.