ETUDE DE LA FORMATION DES POLYOLS DANS LA FERMENTATION LACTIQUE DES GLUCIDES

G. GUIMBERTEAU
Station Agronomique et Œnologique de Bordeaux

SU

BIBLIOTHEQUE
ISVV

SOMMAIRE

I. Introduction

II. Méthodes analytiques

A. - Séparation et estimation des polyols par chromatographie de partage sur papier

1° Mise au point des techniques
Purification sur échangeurs d'ions
Solvants
Révélateurs
Chromatographie directe

2° Description et application de la technique de séparation des polyols

B. - Autres méthodes analytiques utilisées

III. Expérimentation sur la formation de polyols dans la fermentation lactique des glucides

A. - Milieu, matériel et conditions de l'expérimentation

B. - Résultats

IV. Résumé

V. Références bibliographiques

I. — INTRODUCTION

Plusieurs espèces de microorganismes participent à l'élaboration des vins. Les premiers qui interviennent sont les levures, champignons microscopiques qui transforment les glucides en divers produits, le plus important quantitativement étant l'éthanol. Puis, dans certaines conditions, d'autres microorganismes, les bactéries lactiques, peuvent se développer en modifiant plus ou moins profondément la composition chimique du vin ainsi que son goût, son bouquet et même sa couleur. Les bactéries lactiques sont spécialisées dans la formation d'acide lactique à partir de divers substrats. Il existe un grand nombre d'espèces de bactéries lactiques qui peuvent attaquer les constituants du vin à des degrés divers. Leur action peut être favorable à la qualité, c'est le cas si elle se limite à la transformation de l'acide malique en acide lactique. Par contre, si elle s'exerce sur l'acide tartrique, le glycérol ou les glucides suivant l'ampleur du développement bactérien, elle conduit à une altération plus ou moins profonde du vin.

Nous connaissons parfaitement les espèces de levures, ainsi que le mécanisme chimique, les produits intermédiaires et finaux de la fermentation alcoolique. Il n'en est pas de même pour la fermentation lactique. Le nombre de travaux sur les bactéries lactiques est aussi important que leur nombre d'espèces, mais ils portent surtout sur celles qui se cultivent facilement. Les études effectuées sur les bactéries isolées d'un milieu acide, en particulier du vin, sont beaucoup moins nombreuses. De plus, pendant longtemps, les recherches conduites sur les bactéries perdirent une partie de leur intérêt, du fait de la classification encore incertaine de ces microorganismes et des méthodes analytiques peu sensibles et peu spécifiques. La recherche bactérienne en œnologie, pendant les vingt dernières années, a conduit à une meilleure connaissance des bactéries lactiques en particulier de celles responsables de la transformation de l'acide malique en acide lactique; les bactéries de maladie ont été beaucoup moins étudiées pendant la même période.

La Station œnologique a adopté un vaste programme de recherches concernant les bactéries lactiques pouvant se développer dans les vins.

Caractéristiques des polyols

Polyols	Formule	Poids moléculaire	Point de fusion	$[\alpha]_D$ (eau)	Dérivés servant à l'identification
Glycérol	$CH_2OH—CHOH—CH_2OH$	92,09	17,9 °C	—	Chlorure de *p*-nitrobenzoyle, F 188 °C.
L-érythritol	H H $CH_2OH—C—C—CH_2OH$ OH OH	122,12	116 °C 121,5 °C	Inactif	Tétra-acétate, F 85 °C Tétra-benzoate, F 186-187 °C
D-arabitol	H H OH $CH_2OH—C—C—C—CH_2OH$ OH OH H	152,15	103 °C	+ 7°7 en solution saturée de borax ; + 131° avec excès d'acide molybdique.	Penta-acétate, F 76 °C.
D-mannitol	H H OH OH $CH_2OH—C—C—C—C—CH_2OH$ OH OH H H	182,17	166 °C	Très faiblement lévogyre, fortement dextrogyre avec borax ; + 169° avec excès d'acide molybdique.	Hexa-acétate, F 119-120 °C.
Butane-diol-2,3	$CH_3—CHOH—CHOH—CH_3$	90,12	liquide	D (—), — 13°	Diacétate, F 41 °C. Diphényluréthane, F 201-202 °C.

Les études se poursuivent sur l'étude de la systématique, de la morphologie, de l'écologie des bactéries lactiques du vin, ainsi que la description détaillée des principales espèces, leurs caractères physiologiques, les conditions de leur développement, etc. C'est dans le cadre de ce programme que nous avons effectué ce travail.

Le point de départ fut l'étude d'une méthode sensible et spécifique de caractérisation du mannitol dans les milieux de culture à base de fructose. Depuis une quinzaine d'années, la chromatographie de partage sur papier s'est révélée, par sa sélectivité et la possibilité de séparer des micro-quantités de substance, comme une des meilleures méthodes pour aborder et résoudre de nombreux problèmes dans tous les domaines de la chimie analytique; aussi, c'est vers cette technique que nous nous sommes orienté. La chromatographie sur papier nous est familière, nous l'utilisons dans les tests de fermentation des glucides servant à la différenciation des espèces de levures et à la classification des bactéries lactiques.

Après une étude détaillée des possibilités qu'offre la chromatographie sur papier dans le domaine des polyols et des glucides, nous montrons que l'utilisation de papier imprégné d'acide borique permet une bonne résolution du mélange mannitol-fructose. Nous décrivons ensuite une méthode de caractérisation et d'estimation du mannitol dans les milieux à base de fructose. L'application de cette méthode nous ayant permis d'observer, dans les milieux fermentés, d'autres polyols que le mannitol et le glycérol, nous avons été amené ensuite à une étude analytique de la formation de ces substances par les bactéries lactiques à partir de différents glucides. Nous avons mis en évidence la formation d'érythritol, d'arabitol et de mannitol à partir des hexoses (glucose et fructose) et des pentoses (arabinose et xylose). A l'aide d'une méthode d'estimation calquée sur celle du mannitol, nous avons montré que les différents polyols formés sont variables en nature et en quantité suivant l'espèce des bactéries et le glucide fermenté.

II. — METHODES ANALYTIQUES

A. - SEPARATION ET ESTIMATION DES POLYOLS PAR CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE SUR PAPIER

1° Mise au point des techniques

Parmi les tests physiologiques servant à la classification des bactéries lactiques, la formation de mannitol à partir de fructose caractérise les bactéries hétérolactiques, d'où l'importance de la recherche de ce corps dans les milieux de culture. La technique la plus utilisée pour observer la présence de ce polyol, consiste à faire évaporer lentement à l'air quelques millilitres du milieu dans un verre de montre ; le mannitol apparaît cristallisé sous forme d'aiguilles prismatiques fines et soyeuses, rayonnant autour de différents centres. On peut par ce procédé déceler 1 g par litre. La sensibilité est légèrement améliorée par une défécation préalable au charbon décolorant; elle reste malgré tout insuffisante. D'ailleurs cette technique ne permet pas, dans le cas d'un résultat négatif, d'affirmer absolument l'absence de mannitol ; en effet la cristallisation en milieu complexe est parfois inhibée ou s'effectue de façon anormale. Pour déterminer le mannitol, nous avons essayé de mettre au point une méthode spécifique et sensible de caractérisation et d'estimation quantitative applicable à un milieu complexe. Nous avons utilisé la chromatographie de partage sur papier, méthode qui concilie les qualités demandées à une certaine rapidité d'exécution. D'ailleurs dans beaucoup d'études microbiologiques, pour identifier les produits du métabolisme microbien ou aider à la caractérisation des espèces, les procédés chromatographiques simples et précis sont couramment adoptés. Les chercheurs du National Institute for Research in Dairying de Reading (G.B.) ont utilisé la chromatographie de partage sur papier des aminoacides extraits de cellules bactériennes (1) comme moyen possible de différenciation. LAMBION et MESKHI (2) ont appliqué la chromatographie sur papier à la recherche des acides organiques formés à partir des différents substrats offerts aux bactéries. Dans le même domaine des bactéries lactiques, la Station agronomique et œnologique de Bordeaux, a remplacé le test classique de fermentation des glucides par une technique chromatographique (3), qui permet d'obtenir des réponses précises en une seule culture et de travailler sur plusieurs glucides simultanément.

Dans le but d'obtenir des séparations fines et des révélations régulières, la solution à chromatographier doit, autant que possible, être purifiée de façon à éliminer les sels minéraux et surtout les substances se trouvant en forte proportion par rapport aux composés qu'on désire déceler. Il est bien connu que les taches des constituants les plus abondants peuvent recouvrir totalement ou rendre indistinctes celles des composés mineurs. Par ailleurs, de fortes proportions d'un corps modifient la vitesse de migration des corps associés en très faibles proportions. Dans les milieux de culture bactériens, les substances pouvant perturber la caractérisation du mannitol sont, à côté des éléments minéraux, les acides organiques en particuliers l'acide lactique, le glycérol connu comme produit secondaire de la fermentation lactique et le fructose pouvant éventuellement rester dans le milieu de culture. Le fructose se sépare assez mal des polyols et se révèle de la même façon sur les chromatogrammes, aussi est-il très important de l'éliminer. La méthode la plus usitée consiste à le détruire, avec les autres oses, en milieu alcalin à chaud. On opère par chauffage au bain-marie en présence d'un grand excès de magnésie fraîchement calcinée, la destruction des glucides est en effet totale, mais les produits formés peuvent interférer et il est difficile de s'en débarrasser. Nous avons pensé que l'emploi des résines échangeuses d'anions fortement basiques, pour fixer les glucides était préférable et pouvait permettre une bonne purification des milieux à chromatographier.

— **Purification sur échangeurs d'ions.** On utilise de façon courante les résines échangeuses d'ions pour déminéraliser les solutions avant chromatographie ; les cations et certains acides aminés sont fixés par une résine cationique sous forme H^+ ; après passage la solution contient, à côté des glucides, les acides organiques et minéraux à l'état libre ; ces acides sont alors fixés sur une résine anionique placée sous forme carbonate ce qui évite la fixation et la destruction des glucides. Or dans le cas présent, nous nous intéressons uniquement aux polyols et recherchons donc l'élimination des glucides, du fructose en particulier.

La fixation et la destruction des glucides sur résines bases fortes sous leur forme hydroxylée sont déjà bien connues. ROSEMAN et *al.* (4), ont étudié la rétention des glucides sur Amberlite IRA 400, préparée par lavage à la soude normale et saturée par la baryte. Ils ont remarqué que les glucides réducteurs, glucose, mannose, arabinose, galactose, fructose, lactose et glucosamine sont retenus, tandis que le mannitol, le sorbitol, l'inositol et le méthyl-D-glucopyranoside ne sont pas fixés de façon appréciable. Le saccharose n'est que partiellement fixé. Mettant à profit cette

propriété des résines échangeuses d'anions, USSEGLIO-TOMASSET et CASTINO (5) ont mis au point une technique de défécation pour doser quantitativement la somme glycérol + butanediol-2,3 en présence de glucides dans les vins.

Pour notre part, nous avons vérifié le comportement des polyols (mannitol et glycérol) et les glucides réducteurs (glucose et fructose) sur diverses résines échangeuses d'anions traitées par la soude normale, puis lavées à l'eau distillée jusqu'à ce que l'effluent soit neutre. L'essai est effectué dans des colonnes de 15 mm de diamètre, contenant 40 g de résine humide, 50 mg de substance dissous dans 20 ml d'eau distillée, sont placés au sommet de la colonne. A la suite on fait passer de l'eau distillée à la vitesse de 2 ml par minute jusqu'à un volume de 100 ml. Les glucides et des polyols non fixés sont dosés par oxydation périodique.

TABLEAU I

Fixation des glucides et des polyols sur diverses résines échangeuses d'anions

(% de substance dans 100 ml de solution après passage sur l'échangeur, par rapport à la quantité mise en œuvre).

	Glucose	Fructose	Mannitol	Glycérol
DOWEX 1 X 2	5	5	40	100
DOWEX 1 X 4	50	50	50	100
DOWEX 2 X 4	20	25	96	100
DOWEX 2 X 10	30	30	100	100
DOWEX 2 X 8	35	30	100	100
Amberlite IRA 400	0	0	60	100

Dans le tableau I, nous avons rassemblé les résultats qui permettent de comparer l'action de diverses qualités de résines vis-à-vis de diverses substances étudiées. Les résines DOWEX 1 X 2 et Amberlite IRA 400 fixent bien la totalité des glucides réducteurs et d'une façon assez semblable ; ces résines possèdent le même groupement actif $-N^{+}(CH_3)_3$; le glycérol est retrouvé en totalité, mais une forte partie du mannitol reste fixé sur l'échangeur. Nous avons procédé à l'élution en opérant par fractions de 100 ml ; nous donnons dans le tableau II les résultats pour les deux résines qui retenaient le mieux les glucides. On voit que pour récupérer la totalité du mannitol, il faut dans les conditions indiquées recueillir au moins 300 ml d'effluent.

TABLEAU II

Récupération du fructose et du mannitol en fonction du volume d'éluant (% de substance entraînée dans l'éluant par rapport à la quantité fixée).

	DOWEX 1 X 2		Amberlite IRA 400	
	Fructose	Mannitol	Fructose	Mannitol
100 ml	5	40	0	60
200 ml	5	50	0	90
300 ml	5	96	0	100

Le passage de 300 ml d'eau n'entraîne pas de glucide de manière appréciable ; le glucose et les pentoses (arabinose et xylose) se conduisent comme le fructose.

A la suite de ces essais, nous utilisons la technique suivante pour purifier le milieu de culture avant chromatographie.

Les résines employées sont les DOWEX 50W-X4 (20-50 mesh) (cationique) et Amberlite IRA 400 (anionique). Avant emploi, elles sont mises à gonfler quelques heures dans l'eau. Nous procédons ensuite à l'activation par passages alternés de solutions normales d'acide chlorhydrique et de soude. Entre chaque passage, on lave à l'eau distillée jusqu'à neutralité. Après deux cycles d'activation, la résine cationique est conservée sous forme H^+ et la résine anionique sous forme OH^-. Ces différentes opérations s'effectuent commodément en tubes de verre d'une longueur de 500 mm et d'un diamètre intérieur de 40 mm. Le volume de solution utilisé pour le traitement des résines doit être de l'ordre de dix fois le volume d'échangeurs traités et la vitesse de passage voisine de 5 ml par minute.

Les colonnes utilisées pour la purification des milieux sont plus petites que celles affectées au traitement des résines ; longueur 360 mm, diamètre intérieur 15 mm, elles sont à niveau constant. Au fond de chaque colonne, on place un petit tampon de coton de verre et on introduit 40 ml de résines en évitant la présence de bulles d'air. Les colonnes sont disposées en deux rangées parallèles et montées de façon à permettre au liquide sortant de la colonne cationique de traverser automatiquement la colonne anionique (fig. 1).

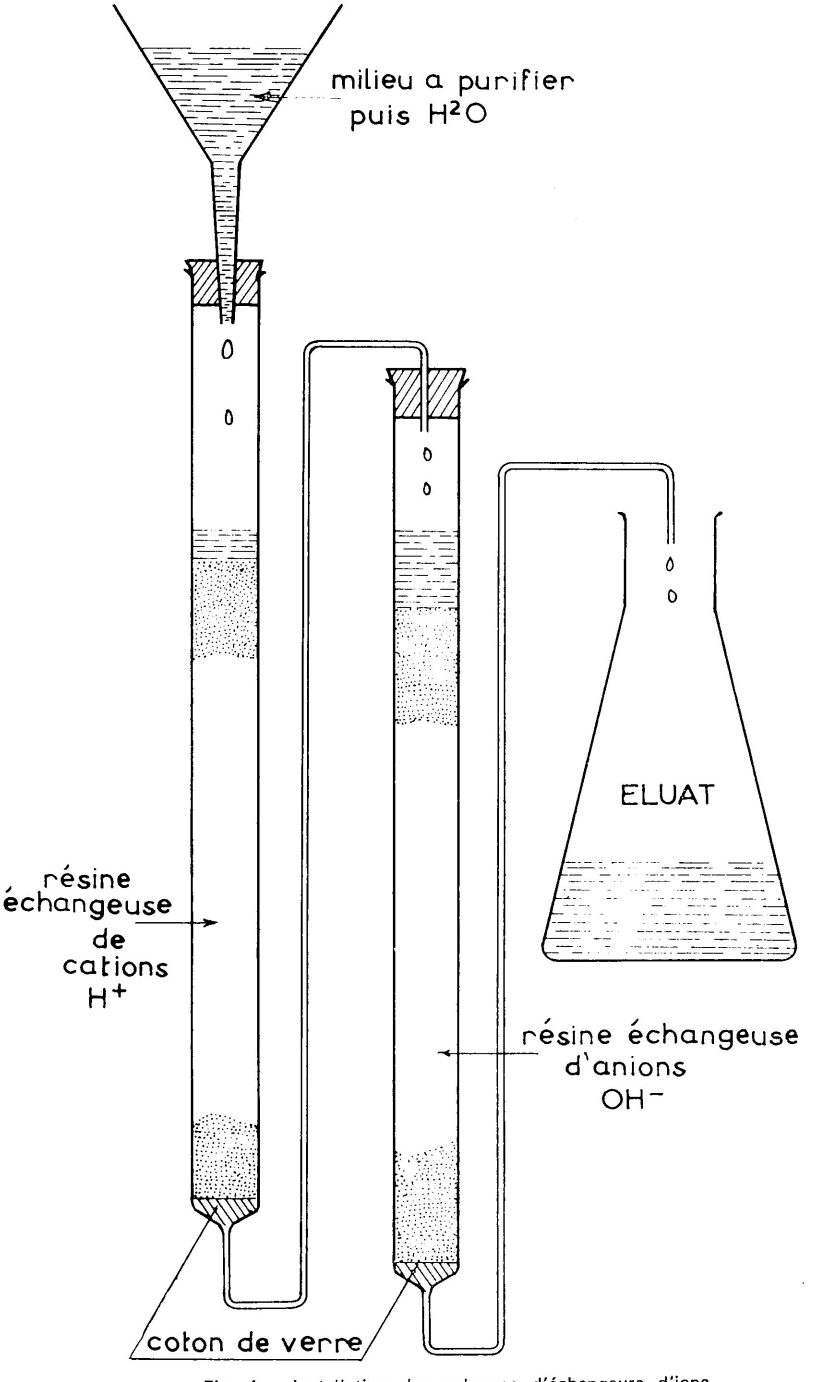


Fig. 1 - Installation des colonnes d'échangeurs d'ions permettant la purification des milieux de culture.

On introduit 20 ml de la solution à analyser au sommet de la colonne cationique. On reçoit l'effluent à la sortie de la colonne anionique dans un erlenmeyer. A la suite de la solution, on fait passer 300 ml d'eau distillée pour entraîner les substances non fixées sur les échangeurs. Cet effluent qui contient le mannitol, et la fraction minime de fructose non fixé, est versé sans perte dans le ballon d'un évaporateur rotatif sous vide. On concentre à basse température (45 °C environ), jusqu'à un volume voisin de 10 ml. La solution concentrée ainsi obtenue est portée quantitativement dans une fiole jaugée de 20 ml et complétée au trait de jauge.

— **Chromatographie directe.** Dans certains cas particuliers, la recherche d'une substance peut être effectuée sans élimination des autres substances, c'est ainsi que la chromatographie directe a été recommandée pour la mise en évidence d'un glucide après réaction enzymatique (6) ou pour l'estimation de l'acide malique dans les vins (7). Pour éviter la purification précédemment décrite par passage sur les échangeurs d'ions, opération longue à effectuer, nous avons essayé de chromatographier directement le milieu fermenté. La principale difficulté à laquelle nous nous sommes heurté est la présence de fructose qui, dans les solvants classiques se sépare assez mal du mannitol. Le milieu de culture étant toujours plus ou moins coloré, nous avons procédé toutefois à une décoloration par une petite quantité de charbon décolorant; à 50 ml de milieu nous ajoutons la quantité de charbon juste nécessaire pour obtenir la décoloration, nous agitons à plusieurs reprises et nous filtrons sur papier plissé ; on refiltre les premières portions de liquide jusqu'à ce que la limpidité soit obtenue. A partir de ce filtrat nous pouvons opérer dans certains cas la séparation chromatographique.

— **Solvants.** Le choix du solvant est fonction des substances à séparer, dans le cas présent nous devons choisir un système permettant une migration différente pour le glycérol, le mannitol et éventuellement, lors de la chromatographie directe, du fructose.

La séparation individuelle des différents polyols et des différents glucides a fait l'objet de nombreuses tentatives, aussi la littérature est-elle riche en formules de solvants (8). Mais on constate, que si l'utilisation d'un solvant convenable permet une bonne résolution d'un mélange de glucides ou d'un mélange de polyols, à l'exception des hexols linéaires. il n'en est pas de même pour la séparation des polyols et de certains glucides, glucose et fructose, ces divers corps ayant des valeurs de Rf trop voisines dans les divers solvants utilisés. Pour réaliser cette séparation, différents chercheurs ont mis à profit la propriété de ces substances

TABLEAU III

Valeurs de Rf de polyols et de glucides dans divers solvants sur papier imprégné ou non d'acide borique

Chromatographie ascendante

Solvants	Butanol-1 4 Ac. acétique 1 Eau 5		Acétate d'éthyle 65 Ethanol 20 Eau 15 Ac. acétique 1		Acétate d'éthyle 6 Ac. acétique 3 Eau 2		Phénol 75 g Eau 25 g		Propanol-1 7 Acétate d'éthyle 1 Eau 2	
Papiers / Substances	Whatman 1	Whatman 1 à l'acide borique	Whatman 1	Whatman 1 à l'acide borique	Arches 302	Arches 302 à l'acide borique	Arches 302	Arches 302 à l'acide borique	Whatman 1	Whatman 1 à l'acide borique
Glucose	0,18	0,19	0,06	0,06	0,23	0,23	0,39	0,40	0,24	0,22
Fructose	0,23	0,21	0,11	0,11	0,29	0,28	0,56	0,53	0,29	0,23
Arabinose	0,24	0,22	0,15	0,14	0,31	0,30	0,55	0,53	0,31	0,27
Mannitol	0,21	0,28	0,10	0,19	0,28	0,35	0,49	0,47	0,28	0,35
Sorbitol	0,20	0,29	0,10	0,22	0,29	0,38	0,49	0,51	0,26	0,38
Arabitol	0,26	0,33	0,17	0,25	0,36	0,43	0,56	0,56	0,33	0,42
Erythritol	0,37	0,37	0,26	0,28	0,41	0,48	0,62	0,68	0,42	0,48
Glycérol	0,48	0,49	0,37	0,35	0,56	0,57	0,74	0,78	0,57	0,58

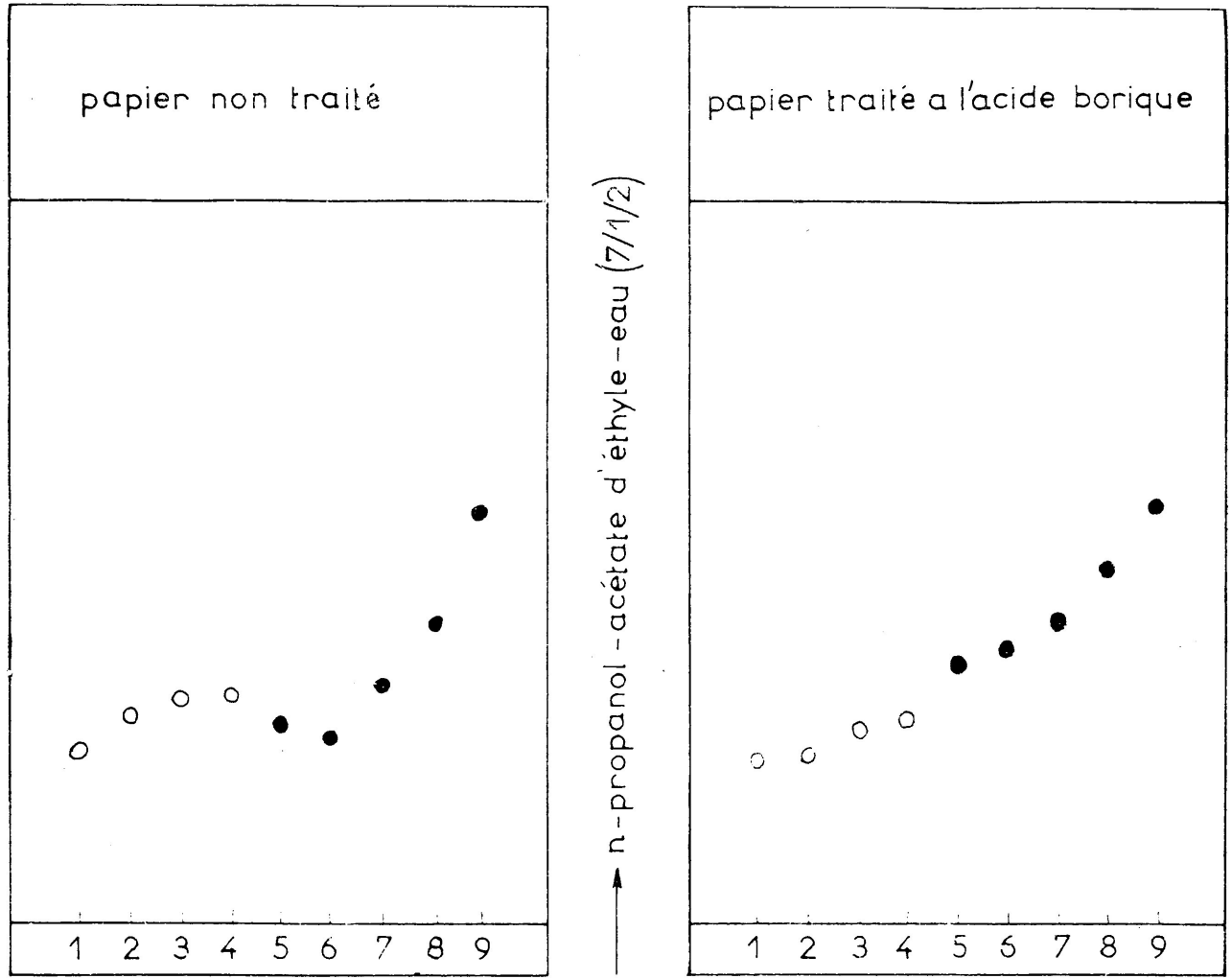


Fig. 2 — Comparaison de la migration des polyols et des glucides sur papier traité à l'acide borique et sur papier non traité.

0 glucides : 1 glucose 2 fructose 3 arabinose 4 xylose

● polyols : 5 mannitol 6 sorbitol 7 arabitol 8 érythritol 9 glycérol

de former des complexes avec les borates. La séparation du glucose et du sorbitol a été ainsi réalisée par REES et REYNOLDS (9) en utilisant un solvant de composition suivante : méthyléthylcétone - acide acétique - eau saturée en acide borique (9:1:1). Nous avons constaté que la séparation du fructose et du mannitol n'est pas très bonne et avons obtenu avec ce solvant des taches allongées et des effets de « traînées ». GENEST et CHAPMAN (10) ont modifié légèrement la composition de ce solvant sans obtenir un meilleur résultat. La technique de développements multiples qui permet d'accroître la distance entre les taches a été également utilisée (8). Par développement continu pendant trois jours à 30 °C à l'aide de butanol saturé d'eau, BARZOTTI et Mc CLESKEY (11) sont arrivés à une assez bonne séparation.

Après étude de plusieurs solvants et de plusieurs techniques, nous en avons retenu une qui consiste à chromatographier les complexes boratés des polyols et des glucides. Mais au lieu de placer l'acide borique dans le solvant, comme beaucoup d'auteurs l'ont fait, nous avons imprégné au préalable le papier avec de l'acide borique et effectué ensuite le développement chromatographique avec un solvant classique. Le papier est traité de la façon suivante : on pulvérise uniformément à sa surface une solution aqueuse d'acide borique à 40 g par litre, et on le laisse sécher à la température ambiante. Cette méthode donne de bien meilleures séparations des polyols et des glucides. Les résultats obtenus par cette technique sont donnés dans le tableau III. D'une façon générale, avec les solvants utilisés, les glucides étudiés se déplacent à peu près de la même façon sur papier ordinaire ou sur papier imprégné d'acide borique. Dans le solvant à base de propanol, ils se déplacent moins, en particulier le fructose sur ce dernier papier (fig. 2). Pour les polyols au contraire on note un déplacement plus important, sauf pour le solvant à base de phénol, sur le papier traité à l'acide borique que sur le papier non traité. Le comportement des deux hexols isomères, le mannitol et le sorbitol, est sensiblement le même. En somme la formation de complexe borique ne modifie pas la mobilité des glucides alors que celle des polyols est généralement accrue. Nous avons comparé les séparations obtenues avec des solvants et avec notre technique en utilisant du papier imprégné au préalable d'acide borique (tableau IV). Pour le solvant à base d'acétate d'éthyle, on n'observe aucune différence quel que soit le mode d'apport de l'acide borique. Par contre avec le solvant de composition suivante : propanol-1 - acétate d'éthyle - eau (7:1:2) les différences de déplacement sont nettement plus importantes sur le papier directement traité à l'acide borique que si l'on utilise de l'eau saturée d'acide borique dans la préparation du solvant.

TABLEAU IV

Comparaison des valeurs de Rg de polyols et de glucides

Papier Whatman n° 54
Chromatographie ascendante

$$Rg = \frac{\text{distance de déplacement de la substance}}{\text{distance de déplacement du glucose}}$$

	Acétate d'éthyle 6 Ac. acétique 3 Eau 2			Acétate d'éthyle 7 Propanol-1 1 Eau 2		
	Sans acide borique	Acide borique sur le papier	Acide borique dans le solvant	Sans acide borique	Acide borique sur le papier	Acide borique dans le solvant
Fructose	1,2	1,5	1,4	1,2	1,1	1,1
Arabinose	1,4	1,4	1,5	1,3	1,3	1,3
Mannitol	1,3	1,9	1,8	1,1	1,6	1,3
Sorbitol	1,2	1,9	1,9	1,0	1,8	1,3
Arabitol	1,8	2,4	2,3	1,3	2,0	1,8
Erythritol	2,3	2,8	2,7	1,7	2,2	2,2
Glycérol	3,1	3,3	3,4	2,4	2,7	2,7

Nos essais montrent donc en définitive, qu'en fixant de l'acide borique par un traitement préalable, il est possible à l'aide du solvant à base de propanol d'obtenir une bonne séparation chromatographique sur papier du mannitol et du fructose. Dans tous les solvants, le glycérol se sépare très bien des autres composés.

Dans le tableau V, nous donnons les valeurs de Rf de quelques glucides et polyols que nous avons obtenues dans d'autres solvants. Nous avons procédé à des essais sur des solutions simples contenant du mannitol et des teneurs croissantes en fructose. Notre technique avec le papier imprégné d'acide borique permet une séparation tant que la teneur en fructose n'est pas trop élevée mais dès que pour 1 g de mannitol il reste 10 g de fructose la séparation n'est plus possible et il est nécessaire d'éliminer le fructose. Dans les milieux contenant peu de fructose, l'utilisation de papier imprégné au préalable d'acide borique permet une estimation du mannitol en opérant sur le milieu décoloré simplement au charbon.

— **Révélateurs.** Les techniques de révélation des polyols sont nombreuses (8), mais elles manquent généralement de sélectivité. Les révélateurs des polyols donnent en particulier des résultats positifs avec les glucides. Nous avons essayé plusieurs techniques de révélation et nous en avons retenu une qui fait appel à l'oxydation périodique des polyols : on pulvérise sur le chromatogramme sec, une solution aqueuse à 1 % de métapériodate de sodium. On laisse agir pendant 3 à 4 minutes, puis on pulvérise une solution de permanganate de potassium à 1 %. Après 5 minutes, on observe des taches brunes d'oxyde de manganèse. Par lavage à l'eau on élimine l'excès de permanganate et on laisse sécher à l'air. La sensibilité est moyenne, 10 µg pour le mannitol. Pour obtenir un contraste plus net des taches sur le fond, on peut également, comme le recommandent WOLFROM et MILLER (8), pulvériser ensuite un réactif à la benzidine ayant la composition suivante : benzidine 0,5 g - acide trichloracétique à 40 % 10 ml - acide acétique cristallisable 10 ml - éthanol 80 ml. On obtient des taches bleues sur fond blanc.

Dans la suite de ce travail, nous avons été également amené à révéler sur les chromatogrammes les glucides réducteurs, nous donnons les formules des révélateurs que nous avons utilisés et qui nous ont donné de bons résultats. Certains étaient déjà connus, mais nous avons sensibilisé un révélateur pour les cétoses.

TABLEAU V

Valeurs de Rf des polyols et de divers glucides

	Butanol-1 4 Ac. acétique 1 Eau 5	Acétate d'éthyle 6 Ac. acétique 3 Eau 2	Butanol-1 4 Acétone 5 Eau 1	Propanol 8 Pyridine 8 Eau 4 Ac. acétique 1
D-Ribose	0,29	0,44	0,23	0,76
L-Arabinose ..	0,22	0,31	0,13	0,70
D-Xylose	0,26	0,32	0,17	0,73
L-Rhamnose ...	0,37	0,46	0,33	0,83
D-Glucose	0,18	0,24	0,09	0,65
Mannose	0,19	0,28	0,14	0,70
Galactose	0,17	0,22	0,09	0,63
D-Fructose ...	0,22	0,29	0,13	0,70
Saccharose	0,10	0,16	0,04	0,62
Maltose	0,07	0,11	0,02	0,47
Lactose	0,07	0,08	0,01	0,46
D-Mélibiose ..	0,04	0,09	0,01	0,45
Raffinose	0,03	0,06	0,00	0,46
Tréhalose	—	—	—	0,52
Butanediol-2,3 .	0,65	0,80	0,60	—
Glycérol	0,47	0,56	0,41	0,82
L-Erythritol	0,35	0,41	0,23	0,77
D-Arabitol	0,28	0,36	0,15	0,73
Dulcitol	0,18	0,26	0,08	0,63
D-Sorbitol	0,18	0,29	0,12	0,64
Mannitol	0,19	0,28	0,11	0,65
Méso-inositol ..	0,06	0,02	0,00	0,31

Pour révéler les glucides, on utilise principalement la propriété de former par chauffage en milieu acide des dérivés du furfural qui donnent facilement des réactions colorées avec les amines ou les phénols. On obtient, suivant le glucide, un composé de coloration déterminée, ce qui facilite son identification.

Nous avons utilisé les révélateurs suivants :

Phtalate acide d'aniline. Dans un bécher, on pèse 16,6 g d'acide phtalique ; on ajoute 30 ml d'eau distillée et on triture avec un agitateur. On dilue la pâte obtenue dans 500 ml d'acétate d'éthyle et on ajoute 9,3 g d'aniline. On porte le liquide à l'ébullition sous reflux jusqu'à ce qu'il devienne limpide. Après refroidissement, on complète au litre avec de l'acétate d'éthyle. Avec ce révélateur les aldopentoses donnent une couleur rouge, les aldohexoses et méthylpentoses des teintes brunes. Les cétoses conduisent à une légère coloration jaunâtre, les diholosides et triholosides ne donnent pas de coloration. La révélation se fait en étuve ventilée à la température de 105 °C, pendant 5 minutes.

Anthrone. On dissout 300 mg d'anthrone dans 10 ml d'acide acétique. On ajoute 20 ml d'éthanol à 95° et 3 ml d'acide orthophosphorique concentrée. Le chromatogramme pulvérisé avec cette solution est porté 5 à 6 minutes dans une étuve ventilée dont la température est fixée à 105°C. Les cétoses apparaissent en jaune brillant. Certains polyosides se révèlent en jaune très pâle. Les autres glucides ne donnent pas de coloration. L'acide orthophosphorique attaquant la cellulose assez rapidement, il faut éviter de laisser les chromatogrammes trop longtemps dans l'étuve ou à une température supérieure à celle indiquée. Les chromatogrammes ne se conservent pas, ils brunissent rapidement.

Si la sensibilité du phtalate acide d'aniline est bonne pour les pentoses et les aldohexoses, par contre celle de l'anthrone pour les cétoses est assez faible en particulier du fait du brunissement rapide du papier. Le nombre de révélateurs proposés par les divers auteurs étant très élevé, nous avons cherché parmi ceux-ci un révélateur plus sensible des cétoses. Notre choix s'est porté sur le N-(1-naphtyl) éthylène diamine préconisé par GORDON et *al.* (12). On prépare le réactif de la façon suivante : on dissout 1,3 g de dichlorhydrate de N-(1-naphtyl) éthylène diamine (produit Eastman 4835) dans un mélange de 2,5 ml de glycérol, 5 ml d'eau distillée et 42 ml d'acétone. Cette solution peut se conserver indéfiniment à 0 °C. Le chromatogramme pulvérisé avec cette solution est séché à l'air pendant 10 à 15 minutes, puis placé pendant 4 minutes à 110 °C. Ce révélateur donne des résultats moyens. Nous avons augmenté sa sensibilité

TABLEAU VI

Révélation de différents glucides et polyols avec trois techniques nouvelles

Quantité de substance : 20 µg par cm²

L'intensité de la couleur est notée de 5 à 0 par ordre décroissant

	N-(1-naphtyl) éthylène diamine en solution avec H_3PO_4		1°) periodate 2°) amino-2 diphényle		1°) periodate 2°) N-(1-naphtyl) éthylène diamine en solution avec H_3PO_4	
D-Ribose ...	rose foncé	3	rose	2	rose	2
L-Arabinose .	rose-brun	2	brun-rose	3	rose	2
D-Xylose ...	rose-brun	2	brun-rose	3	rose	2
L-Rhamnose .	rose-clair	1	rouge clair	2	rose clair	1
D-Glucose .	brun	2	brun	3	rose brun	3
Mannose ...	brun violacé	2	brun	3	rose brun	2
Galactose ..	brun violacé	2	brun	3	rose brun	2
D-Fructose .	violet foncé	5	brun vert	3	rouge violacé	3
Saccharose .	violet	4	brun	3	violet	2
Maltose	brun violacé	2	brun clair	1	brun clair	1
Lactose	brun violacé	2	brun vert	2	brun rose	1
D-Mélibiose	brun violacé	2	brun vert	2	rose	1
Raffinose ..	violet	4	brun vert	2	rouge violacé	2
Tréhalose ..	—	0	—	0	rose pâle	1
Butanediol-2,3	—	0	jaune très pâle	1	—	0
Glycérol ...	—	0	jaune très pâle	1	—	0
L-Erythritol .	—	0	jaune	3	rose	2
D-Arabitol ..	—	0	jaune	3	rose	2
Dulcitol	—	0	jaune vert	2	rose brun	2
D-Sorbitol ..	—	0	jaune	3	rose	2
Mannitol ...	—	0	jaune	3	rose	2
Méso-inositol	—	0	jaune très pâle	1	jaune très pâle	1

de 1 à 10 en lui incorporant 5 % d'acide orthophosphorique juste avant l'utilisation (tableau VI). Une solution de amino-2 diphényle donne des taches rouges avec les pentoses et pourpres avec les acides uroniques (12). Avec les hexoses les taches sont vert-brun et elles apparaissent plus rapidement pour les aldoses que pour les cétoses. Ce révélateur réagit avec tous les composés possédant au moins une fonction —CHO ; nous avons pensé l'utiliser après oxydation périodique ; on obtient ainsi pour les polyols des taches jaunes sur fond brun clair différentes de celles des glucides. Ce révélateur a la composition suivante : amino-2 diphényle 1,7 g - acide oxalique anhydre 0,9 g - glycérol 5 ml - H O 10 ml et acétone 85 ml.

2° **Description et application de la technique de séparation des polyols.**

Suivant la teneur en fructose du milieu de culture, nous purifions soit sur échangeurs d'ions soit par simple décoloration au charbon. Dans les deux cas, on dépose deux fois 50 µl du milieu obtenu, sur papier Arches 302 préalablement imprégné d'acide borique. Sur ce même papier on dépose également 50 µl de solution de mannitol à 0,25 ; 0,5 ; 1,0 ; 1,5 ; 2,0 ; 2,5 et 3,0 g par litre. Les solutions à chromatographier sont déposées sous forme de taches n'excédant pas 6 à 7 mm de diamètre espacées de 3 cm et situées à 3 cm du bord inférieur de la feuille. Le papier est ensuite enroulé en cylindre et maintenu rigide par agrafage. Il est placé verticalement dans une cuve à chromatographie, sa base plongeant de 5 mm dans le solvant à base de propanol. Quand le solvant a parcouru une trentaine de cm (douze ou quinze heures environ) le papier est séché sous une hotte ventilée. On découpe la bande correspondante à la première tache du milieu à analyser, puis le reste du chromatogramme est révélé, par oxydation périodique et aspersion d'une solution de permanganate de potassium à 1 %. Par comparaison avec les taches témoins, il est assez facile d'estimer la teneur en mannitol du milieu analysé. Dans le cas d'une teneur supérieure à 3 g par litre, il est nécessaire d'effectuer une nouvelle chromatographie après dilution. La première bande découpée est révélée par le N-(1-naphtyléthylène diamine) en milieu phosphorique pour vérifier l'absence du fructose ou du moins contrôler que sa séparation d'avec le mannitol est bonne et ne vient pas augmenter la superficie et l'intensité de la tache de ce dernier.

L'application de cette technique nous a permis d'affirmer dans plusieurs milieux de culture la présence de mannitol dans le cas où la

méthode classique donnait un résultat négatif. Mais elle nous a surtout permis d'observer que sur divers chromatogrammes, on trouvait encore, entre les taches du mannitol et du glycérol, une ou deux autres taches suivant le milieu analysé. Pour identifier ces substances, nous avons également utilisé la chromatographie de partage pour les séparer à partir du milieu initial. Nous avons employé des grandes feuilles de papier épais (Arches 304) qui permettent de mettre en œuvre une quantité relativement importante de substances. Nous avons opéré simultanément sur plusieurs feuilles, en chromatographie descendante, avec le solvant de composition suivante : acétate d'éthyle - acide acétique - eau (6:3:2). Après révélation de deux bandes latérales pour fixer l'emplacement de chacune des substances nous avons découpé les parties correspondant à chacune d'entre elles et les avons éluées. A cet effet, elles étaient suspendues dans une cuve à chromatographie équipée pour la technique descendante, et nous avons fait circuler de l'eau distillée en recueillant l'éluat dans une capsule. L'opération a demandé une dizaine d'heures. Puis les capsules sont placées dans un dessicateur et l'éluat évaporé sous vide jusqu'à résidu sec. Nous avons repris par la quantité minimum d'eau et avons chromatographié à nouveau dans plusieurs solvants différents, parallèlement à des solutions de divers polyols. Les substances séparées présentaient le même Rf que l'érythritol et le D-arabitol. Pour confirmer l'identification de ces corps, nous avons ensuite mélangé chaque substance avec celle présumée et dans une nouvelle chromatographie nous n'avons pas observé de séparation dans aucun des solvants utilisés ; les colorations obtenues par plusieurs révélateurs correspondaient également à celles obtenues avec l'arabitol et l'érythritol témoins, observation qui renforce la possibilité de la présence de ces polyols. La même identification a été effectuée à partir de divers milieux contenant avant la fermentation lactique du glucose ou de l'arabinose ou du xylose. L'estimation quantitative de ces divers polyols a été effectuée de la même façon que celle du mannitol, en utilisant le solvant à base de propanol ou d'acétate d'éthyle ; les glucides restant éventuellement étaient révélés à l'aide du phtalate acide d'aniline.

B. - AUTRES METHODES ANALYTIQUES UTILISEES

Les méthodes analytiques utilisées dans ce travail sont généralement celles qui sont décrites dans le Traité d'Œnologie de RIBEREAU-GAYON et PEYNAUD (13). Les glucides restant sont simplement dosés par la liqueur de Fehling en tenant compte du pouvoir réducteur de chacun des glucides. Le pH est déterminé à l'aide d'un appareil de Quéré à électrode de verre. L'acidité titrable est déterminée en utilisant la phénolsulfonephtaléine comme indicateur (point de virage pH 7,4). L'acidité volatile est séparée par distillation directe suivant la méthode DUCLAUX-GAYON. L'acide formique est dosé, après entraînement par la vapeur d'eau, par réduction par le magnésium en milieu chlorhydrique et colorimétrie du méthanal formé par l'acide chromotropique.

Le dosage de l'acide lactique est effectué par la méthode PEYNAUD-CHARPENTIER, qui repose sur la transformation quantitative de l'acide lactique en éthanol par oxydation par le permanganate de potassium. On titre l'éthanal formé par la méthode JAULMES et ESPEZEL ; une défécation préalable élimine les autres acides organiques par précipitation plombique et les sucres par précipitation barytique dans l'alcool ; le butanediol-2,3, dont l'oxydation donne également de l'éthanal est chassé au préalable par évaporation.

Le butanediol-2,3 est dosé par la méthode PEYNAUD suivant la technique utilisée dans l'analyse des vins : séparation par entraînement à la vapeur, oxydation périodique et titrage de l'éthanal formé après séparation par distillation ; le méthanal provenant de l'oxydation du glycérol est bloqué par addition d'asparagine. Avec cette méthode l'acétoïne éventuellement présente est comptée comme butanediol-2,3.

III. — EXPERIMENTATION SUR LA FORMATION DES POLYOLS DANS LA FERMENTATION LACTIQUE DES GLUCIDES

A. - MILIEU, MATERIEL ET CONDITIONS DE L'EXPERIMENTATION

Après avoir exposé les techniques analytiques que nous avons été amené à utiliser, nous allons traiter successivement des conditions expérimentales, milieu de culture et souches de bactéries lactiques utilisés.

Milieu de culture.

Les formules de milieux de culture pour bactéries abondent dans la littérature (14). Mais rares sont ceux qui conviennent aux bactéries lactiques isolées de milieux acides comme le vin. Ces bactéries sont en général difficiles à cultiver; ce n'est d'ailleurs que récemment que le développement sur milieu synthétique des bactéries opérant dans les vins la transformation de l'acide malique en acide lactique, a été réalisé. Nous avons utilisé pour les cultures une solution nutritive à base de milieu de CARR dont la composition est la suivante :

Caséine hydrolysée	5 g
Extrait de levure Difco	4 g
Phosphate acide de potassium	2 g
Chlorure de potassium	0,5 g
Chlorure de calcium	0,1 g
Sulfate de magnésium	0,1 g
Chlorure ferrique	2,5 mg
Sulfate de manganèse	2,5 mg
Acide tartrique	3 g

Ces produits sont dissous dans la quantité d'eau bidistillée suffisante ; on amène à pH 4,6 avec de la soude, on ajoute 20 g de glucide à étudier

et on complète à un litre. Nous avons préparé ainsi quatre séries contenant respectivement du glucose, du fructose, du xylose et de l'arabinose.

Bactéries utilisées.

La fermentation de ce milieu stérilisé est provoquée par ensemencement d'une culture récente d'une souche pure de bactérie.

Nous avons eu à notre disposition, les bactéries lactiques de la collection de la Station œnologique. Les souches qui la composent proviennent d'isolements monospermes à partir de moûts de raisin et de vins d'origine variée ; d'autres souches de bactéries proviennent aussi de collections.

Ces bactéries sont conservées par repiquages fréquents sur un milieu constitué par du jus de raisin dilué au demi, enrichi en substances azotées et en facteurs de croissance et amené à pH 4,5. Sur ce milieu, les bactéries conservent leurs caractères et se multiplient de façon satisfaisante.

Les 21 souches de bactéries étudiées comprennent des coques et des bacilles homolactiques et hétérolactiques appartenant aux genres **Pediococcus, Streptococcus, Leuconostoc** et **Lactobacillus** ; nous donnons dans le tableau VII la liste des bactéries utilisées, ainsi que leurs principales caractéristiques. Chaque bactérie est affectée d'un numéro afin de rendre plus claire la lecture des tableaux où sont rassemblés les résultats analytiques.

Conditions d'aération et température.

Le milieu de culture est placé en flacons de 500 ml, possédant un dispositif de fermeture stérile et bien hermétique ; les flacons sont complètement pleins.

Après ensemencement, les flacons sont placés pendant deux mois à l'étuve à 25 °C, délai suffisant à l'accomplissement de la fermentation lactique. Après ce délai les milieux, débarrassés des bactéries par décantage et centrifugation, sont répartis en flacons de 90 ml et pasteurisés pour éviter les altérations pendant la période des analyses.

TABLEAU VII

Liste et caractéristiques des bactéries utilisées

N°	Forme des cellules	Caractères fermentaires	Fermentation des pentoses	Nom de l'espèce (a)	Origine
1	coques	homo	négative	**Pediococcus cerevisiae**	A.T.C.C. 8081 (b)
2	coques	homo	arabinose +	**Streptococcus sp.**	A.T.C.C. 8042 (b)
3	coques	hétéro	négative	**Leuconostoc dextranicum**	moût en fermentation Saint-Emilion 1960
4	coques	hétéro	négative	**Leuconostoc dextranicum**	moût en fermentation Saint-Emilion 1960
5	coques	hétéro	arabinose +	**Leuconostoc mesenteroides**	RADLER (c)
6	coques	hétéro	arabinose +	**Leuconostoc mesenteroides**	moût Saint-Caprais 1960
7	coques	hétéro	xylose +	**Leuconostoc mesenteroides**	moût Saint-Caprais 1960
8	coques	hétéro	xylose +	**Leuconostoc mesenteroides**	moût Margaux 1960
9	coques	hétéro	arabinose+ xylose+	**Leuconostoc mesenteroides**	moût Pauillac 1960
10	coques	hétéro	arabinose+ xylose+	**Leuconostoc mesenteroides**	moût Saint-Emilion 1960
11	bacilles	homo	arabinose +	**Lactobacillus plantarum**	BIDAN (d)
12	bacilles	homo	arabinose +	**Lactobacillus plantarum**	A.T.C.C. 8014 (b)
13	bacilles	homo	négative	**Lactobacillus casei**	vin Quinsac 1956
14	bacilles	homo	négative	**Lactobacillus casei**	JERCHEL (e)
15	bacilles	homo	pentoses faibles	**Lactobacillus casei**	RADLER (c)
16	bacilles	hétéro	arabinose+ xylose+	**Lactobacillus sp.**	LAMBION (f)
17	bacilles	hétéro	arabinose+ xylose+	**Lactobacillus sp.**	CARR (g)
18	bacilles	hétéro	arabinose +	**Lactobacillus sp.**	vin Léognan 1956
19	bacilles	hétéro	arabinose +	**Lactobacillus sp.**	BIDAN (d)
20	bacilles	hétéro	xylose +	**Lactobacillus sp.**	vin Quinsac 1957
21	bacilles	hétéro	xylose +	**Lactobacillus sp.**	moût Sauternes 1960

(a) Ces dénominations sont commodes pour différencier les différents groupes de bactéries, mais elles ne doivent pas être considérées comme définissant de manière précise des espèces microbiologiques.
(b) American Type Culture Collections, Washington.
(c) Souches isolées de vins allemands par RADLER, Forschungs Institut für Rebenzüchtung, Geilweilerhof, Allemagne.
(d) Souches isolées de vins français par BIDAN, Station de Technologie végétale, Versailles.
(e) Souche isolée d'un vin allemand par JERCHEL et FLESCH.
(f) Souche isolée d'un vin de fruit par LAMBION, Centre d'Enseignement et de Recherches des Industries alimentaires, Bruxelles.
(g) Souche isolée d'un cidre par CARR, Research Station, Long Ashton, Angleterre.

B. - RESULTATS

L'ensemble des résultats analytiques est rassemblé sous forme de tableaux. Nous avons adopté deux modes d'expression : en milliéquivalents par litre dans le tableau VIII, et en millimoles pour 100 millimoles de glucide fermenté dans le tableau IX, suivant la manière classique adoptée dans l'établissement des bilans de la fermentation lactique.

Les souches de coques homolactiques se sont mal développées, la quantité de glucide fermentée a été très faible, de l'ordre de 1 g.

Formation d'acides.

Bien que cela ne soit pas le but de notre travail, il était indispensable de doser l'acide lactique formé par chaque souche de façon à situer l'importance de la fermentation lactique. Nous avons également déterminé la teneur globale en acides volatils. Nous n'avons pas recherché la constitution de ces acides volatils, vraisemblablement constitués par de l'acide acétique. Pour quelques bactéries nous avons dosé cependant l'acide formique, qui a été souvent indiqué comme produit du métabolisme bactérien. Les teneurs trouvées sont faibles, de l'ordre de quelques milligrammes par litre, la quantité la plus élevée est de 18 mg par litre. Les bactéries homolactiques forment toujours des acides volatils et à partir de certains glucides en quantités parfois aussi importantes que les hétérolactiques. Pour toutes les bactéries, la quantité d'acides volatils formée dépend du glucide fermenté, c'est à partir du glucose qu'elle est la plus faible, elle est pratiquement doublée lorsqu'on utilise le fructose pour les coques hétérolactiques ; pour les bacilles, on enregistre également une augmentation lorsqu'on passe du glucose au fructose mais elle est irrégulière. A partir des pentoses, la formation d'acides volatils est très importante ; elle atteint quatre à cinq fois la teneur formée à partir du fructose et même beaucoup plus pour deux bacilles homolactiques. Le fait que des teneurs très élevées sont formées à partir des pentoses et sans qu'elles soient sous la dépendance du pH, comme nous l'avons montré par ailleurs, est digne d'intérêt ; il pourrait expliquer l'augmentation lente de l'acidité volatile dans les vins nouveaux bien vinifiés, dont le taux de substances réductrices est inférieur à 2 g par litre, et dont la fermentation malolactique est terminée; 1 g de pentose produisant en moyenne 6 milliéquivalents d'acides volatils, soit 0,30 g d'acidité volatile exprimée en acide sulfurique.

TABLEAU VIII

PRODUITS FORMES PAR LA FERMENTATION LACTIQUE

Coques

Sauf indication spéciale, les chiffres sont des milliéquivalents par litre.

Produits	Bactéries / Glucides	Homolactiques		Hétérolactiques							
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Glucide fermenté (g/l)	Glucose	8,5	5,4	19,5	17,7	21,0	21,0	21,0	15,6	21,0	19,5
	Fructose	1,0	1,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0
	Arabinose	—	4,2	—	—	14,8	14,7	—	—	14,8	15,5
	Xylose	—	—	—	—	—	—	7,2	1,0	16,5	15,6
pH	Glucose	3,50	3,55	3,40	3,50	3,40	3,85	3,75	3,90	3,78	3,35
	Fructose	4,10	3,75	3,50	3,50	3,35	3,70	3,45	3,50	3,45	3,40
	Arabinose	—	3,90	—	—	3,15	3,20	—	—	3,20	3,15
	Xylose	—	—	—	—	—	—	3,35	4,20	3,15	3,15
Acidité titrable	Glucose	67	51	100	87	107	115	15	83	113	95
	Fructose	10	24	90	54	98	68	72	86	78	84
	Arabinose	—	27	—	—	206	206	—	—	210	208
	Xylose	—	—	—	—	—	—	112	26	220	208
Acidité volatile	Glucose	3,1	3,1	16,3	17,4	18,8	34,0	18,2	14,3	13,7	18,8
	Fructose	1,2	2,5	28,8	36,3	31	36,3	31,2	34,3	31,8	31,2
	Arabinose	—	8,0	—	—	128	114	—	—	124	122
	Xylose	—	—	—	—	—	—	67	5,0	111	114
Acide lactique	Glucose	32	28	71	60	80	83	88	52	90	89
	Fructose	8	19	42	30	46	30	49	48	34	34
	Arabinose	—	4	—	—	76	82	—	—	73	86
	Xylose	—	—	—	—	—	—	39	4	91	83

Différence entre l'acidité titrable et la somme des acides dosés	Glucose	−35	−20	−13	−10	− 8	+ 2	− 9	−17	− 9	+13
	Fructose	− 1	−15	−19	+12	−21	− 2	+12	− 4	−12	−19
	Arabinose	—	− 3	—	—	− 2	−10	—	—	−13	0
	Xylose	—	—	—	—	—	—	− 6	−17	−18	−11
Glycérol	Glucose	2	2	10	10	10	10	5	5	10	10
	Fructose	2	0	10	10	10	10	20	10	10	10
	Arabinose	—	3	—	—	15	25	—	—	20	25
	Xylose	—	—	—	—	—	—	20	0	20	20
Erythritol	Glucose	0	0	15	10	15	20	10	10	10	20
	Fructose	0	0	10	10	10	0	10	20	10	10
	Arabinose	—	0	—	—	traces	traces	—	—	0	10
	Xylose	—	—	—	—	—	—	2	0	2	2
Arabitol	Glucose	0	0	0	0	0	traces	0	1	1	1
	Fructose	0	0	0	0	0	traces	0	0	0	0
	Arabinose	—	0	—	—	1	1	—	—	0	0
	Xylose	—	—	—	—	—	—	0	0	0	1
Mannitol	Glucose	0	0	0,5	3	0,5	6	3	6	3	3
	Fructose	0	0	25	15	50	75	25	50	50	50
	Arabinose	—	0	—	—	3	3	—	—	0	0
	Xylose	—	—	—	—	—	—	0	0	0	0
Butanediol-2,3	Glucose	0,3	0	4,3	1,5	5,7	1,6	2,0	3,1	3,3	3,7
	Fructose	0	0	1,2	0,7	2,6	0,5	2,1	0,5	1,5	3,0
	Arabinose	—	0,4	—	—	0,4	0,4	—	—	0	0
	Xylose	—	—	—	—	—	—	1,4	0	0	1,5

TABLEAU VIII (suite)

PRODUITS FORMES PAR LA FERMENTATION LACTIQUE

Bacilles

Sauf indication spéciale les chiffres sont des milliéquivalents par litre.

Produits	Bactéries / Glucides	Homolactiques					Hétérolactiques					
		11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Glucide fermenté g/l	Glucose	12,4	12,7	8,5	21,0	21,0	17,0	15,5	21,0	21,0	21,0	21,0
	Fructose	11,1	9,2	7,5	14,8	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0
	Arabinose	8,8	10,2	—	—	0,5	18,0	18,0	1,0	8,4	—	—
	Xylose	—	—	—	—	1,0	18,5	18,5	—	—	17,0	16,5
pH	Glucose	3,25	3,22	3,40	3,10	2,95	3,45	3,75	3,55	3,50	3,40	3,35
	Fructose	3,15	3,30	3,30	3,10	2,90	3,60	4,00	3,50	3,50	3,50	3,50
	Arabinose	3,35	3,35	—	—	4,30	3,20	3,30	4,35	3,40	—	—
	Xylose	—	—	—	—	3,60	3,15	3,25	—	—	3,15	3,20
Acidité titrable	Glucose	113	115	67	172	213	100	87	100	105	113	109
	Fructose	130	88	74	160	199	82	64	74	92	102	72
	Arabinose	170	112	—	—	10	218	206	10	112	—	—
	Xylose	—	—	—	—	46	236	194	—	—	230	206
Acidité volatile	Glucose	5,7	5,7	1,2	29,4	31,2	2,4	2,4	21,8	43	34,9	25,1
	Fructose	3,7	1,2	1,8	63,1	61,8	42	22	6,9	53	50	34
	Arabinose	74,7	50	—	—	3,2	124	130	3,0	58	—	—
	Xylose	—	—	—	—	27	140	112	—	—	118	107
Acide lactique	Glucose	88	92	49	126	179	63	52	68	51	63	66
	Fructose	103	55	53	115	150	28	28	30	38	28	40
	Arabinose	72	43	—	—	5	76	76	6	30	—	—
	Xylose	—	—	—	—	14	87	95	—	—	96	82

Différence entre l'acidité titrable et la somme des acides dosés	Glucose	−19	−17	−17	−17	−13	−35	−33	−10	−11	−15	−18
	Fructose	−23	−33	−19	+18	+13	−12	−14	−37	− 1	−24	+ 2
	Arabinose	−23	−19	—	—	− 2	−18	0	− 1	−24	—	—
	Xylose	—	—	—	—	− 5	− 9	—	—	—	−16	−17
Glycérol	Glucose	10	5	10	10	10	15	10	10	15	15	15
	Fructose	5	0	5	5	5	20	10	10	20	20	10
	Arabinose	20	20	—	—	2	1	5	15	20	—	—
	Xylose	—	—	—	—	2	2	10	—	—	10	10
Erythritol	Glucose	0	1	0	1	1	10	10	10	10	1	10
	Fructose	0	0	0	0	1	10	4	15	10	10	4
	Arabinose	0	0	—	—	0	5	0	0	0	—	—
	Xylose	—	—	—	—	0	10	0	—	—	0	0
Arabitol	Glucose	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0
	Fructose	0	0	0	0	0	traces	0	0	0	0	0
	Arabinose	traces	traces	—	—	0	1	0	0	0	—	—
	Xylose	—	—	—	—	0	5	0	—	—	0	5
Mannitol	Glucose	0	5	0	0	5	5	5	0,5	0	0,5	3
	Fructose	0,5	0,5	0,5	0,5	10	10	50	50	50	50	50
	Arabinose	0	0	—	—	0	0,5	0	1	1	—	—
	Xylose	—	—	—	—	0	1	0	—	—	0	0
Butane-diol-2,3	Glucose	0	0	0	0	0	9,7	4,5	5,5	11,0	11,1	7,0
	Fructose	0	0	1,0	0	0,2	11,5	5,2	3,6	7,1	5,0	1,6
	Arabinose	0	0	—	—	0,6	1,1	3,9	0,9	0	—	—
	Xylose	—	—	—	—	0	2,1	1,2	—	—	0	0

TABLEAU IX

PRODUITS FORMES PAR LA FERMENTATION LACTIQUE

Coques

Sauf indication spéciale les résultats sont exprimés en millimolécules par 100 millimolécules de glucide fermenté.

Produits	Bactéries / Glucides	Homolactiques		Hétérolactiques							
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Acidité titrable (meq/l)	Glucose	142	170	92	89	92	99	99	97	97	88
	Fructose	*	*	81	48	88	61	65	77	70	75
	Arabinose	—	96	—	—	210	210	—	—	214	201
	Xylose	—	—	—	—	—	—	233	*	200	200
Acidité Volatile (meq/l)	Glucose	6,6	10,3	15	17,7	16,2	29	15,7	16,6	11,8	17,4
	Fructose	*	*	26	32,7	28	32,7	28,1	30,9	28,6	28,1
	Arabinose	—	28	—	—	130	116	—	—	126	118
	Xylose	—	—	—	—	—	—	139	*	100	109
Acide Lactique	Glucose	68	93	66	61	68	71	76	60	77	82
	Fructose	*	*	38	27	41	27	44	43	31	30
	Arabinose	—	44	—	—	77	84	—	—	74	83
	Xylose	—	—	—	—	—	—	81	*	83	80

Glycérol	Glucose	4	6,6	10	10	9	9	4	5	9	9
	Fructose	*	*	9	9	9	9	18	9	9	9
	Arabinose	—	10,7	—	—	15	25	—	—	20	25
	Xylose	—	—	—	—	—	—	40	*	18	20
Erythritol	Glucose	0	0	15	10	13	17	9	10	9	18
	Fructose	*	*	9	9	9	0	9	18	9	9
	Arabinose	—	0	—	—	traces	traces	—	—	0	10
	Xylose	—	—	—	—	—	—	4	*	2	2
Arabitol	Glucose	0	0	0	0	0	traces	0	1	1	1
	Fructose	*	*	0	0	0	traces	0	0	0	0
	Arabinose	—	0	—	—	1	1	—	—	0	0
	Xylose	—	—	—	—	—	—	0	*	0	1
Mannitol	Glucose	0	0	0,5	3	0,4	5	3	6	3	3
	Fructose	*	*	22	18	45	65	22	45	45	45
	Arabinose	—	0	—	—	3	3	—	—	0	0
	Xylose	—	—	—	—	—	—	0	*	0	0
Butanediol-2,3	Glucose	0,6	0	4,0	1,5	4,9	1,4	1,7	3,6	2,8	3,4
	Fructose	*	*	1,0	0,6	2,3	0,4	1,9	0,4	1,3	2,7
	Arabinose	—	1,4	—	—	0,4	0,4	—	—	0	0
	Xylose	—	—	—	—	—	—	2,8	*	0	1,4

* la quantité de glucide fermenté est trop faible pour permettre un calcul valable.

TABLEAU IX (suite)

PRODUITS FORMES PAR LA FERMENTATION LACTIQUE

Bacilles

Sauf indication spéciale les résultats sont exprimés en millimolécules par 100 millimolécules de glucide fermenté.

Produits	Bactéries / Glucides	Homolactiques					Hétérolactiques					
		11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Acidité titrable (meq/l)	Glucose	164	164	142	148	183	106	101	86	90	97	94
	Fructose	209	172	180	195	179	73	57	66	83	91	65
	Arabinose	93	164	—	—	*	181	171	*	200	—	—
	Xylose	—	—	—	—	*	191	157	—	—	203	187
Acidité Volatile (meq/l)	Glucose	8,2	8,1	2,5	25,3	26,8	2,5	2,7	18,8	37	30	21,6
	Fructose	5,2	2,3	4,3	77	55,6	38	20	6,2	48	45	30
	Arabinose	128	73	—	—	*	103	108	*	103	—	—
	Xylose	—	—	—	—	*	113	91	—	—	104	97
Acide lactique	Glucose	127	131	104	108	154	67	60	58	44	54	57
	Fructose	166	107	129	140	135	25	25	27	34	25	36
	Arabinose	124	63	—	—	*	63	63	*	53	—	—
	Xylose	—	—	—	—	*	71	77	—	—	85	74

Glycérol	Glucose	14,5	7	21	8,6	8,6	16	11,6	8,6	13	13	13
	Fructose	8	0	12	6	4,5	18	9	9,0	18	18	9
	Arabinose	34	29	—	—	*	0,8	4,2	*	35	—	—
	Xylose	—	—	—	—	*	1,6	8	—	—	8,8	9
Erythritol	Glucose	0	1,4	0	0,8	0,8	10	11,6	8,6	8,6	0,8	8,6
	Fructose	0	0	0	0	0,9	9	3,6	13,5	9,0	9,0	3,6
	Arabinose	0	0	—	—	*	4	0	*	0	—	—
	Xylose	—	—	—	—	*	8	0	—	—	0	0
Arabitol	Glucose	0	1,4	0	0	0	0	1	0,8	0	0	0
	Fructose	0	0	0	0	0	traces	0	0	0	0	0
	Arabinose	traces	traces	—	—	*	0,8	0	*	0	—	—
	Xylose	—	—	—	—	*	4	0	—	—	0	4,5
Mannitol	Glucose	0	7	0	0	4,3	5	5,8	0,4	0	0,4	2,5
	Fructose	0,8	1	1,2	0,6	9,0	9,0	45	45	45	45	45
	Arabinose	0	0	—	—	*	0,4	0	*	1,7	—	—
	Xylose	—	—	—	—	*	0,8	0	—	—	0	0
Butane-diol-2,3	Glucose	0	0	0	0	0	10,3	5,2	4,7	9,4	9,5	6,0
	Fructose	0	0	2,4	0	0,2	10,3	4,7	3,2	6,4	4,5	1,4
	Arabinose	0	0	—	—	*	9,1	3,2	*	0	—	—
	Xylose	—	—	—	—	*	1,7	0,9	—	—	0	0

* la quantité de glucide fermenté est trop faible pour permettre un calcul valable.

La formation d'acide lactique par les bactéries à caractère hétérofermentatif est plus faible à partir du fructose qu'à partir du glucose, à l'inverse donc de la formation des acides volatils. Pour les bacilles homolactiques, la teneur en acide lactique est du même ordre de grandeur sur fructose et sur glucose. A partir des hexoses la formation est très importante pour les bacilles homolactiques, mais sans toutefois atteindre le rendement théorique correspondant au sucre fermenté. A partir des pentoses, la formation est sensiblement équivalente à celle enregistrée à partir du glucose.

Nous avons calculé le bilan acidimétrique des transformations (tableau VIII) et on constate que ce bilan n'est acceptable que dans très peu de cas. Il est connu que les bactéries lactiques forment également de l'acide succinique, mais lorsque le déficit est important il est peu vraisemblable que la teneur en cet acide puisse le combler.

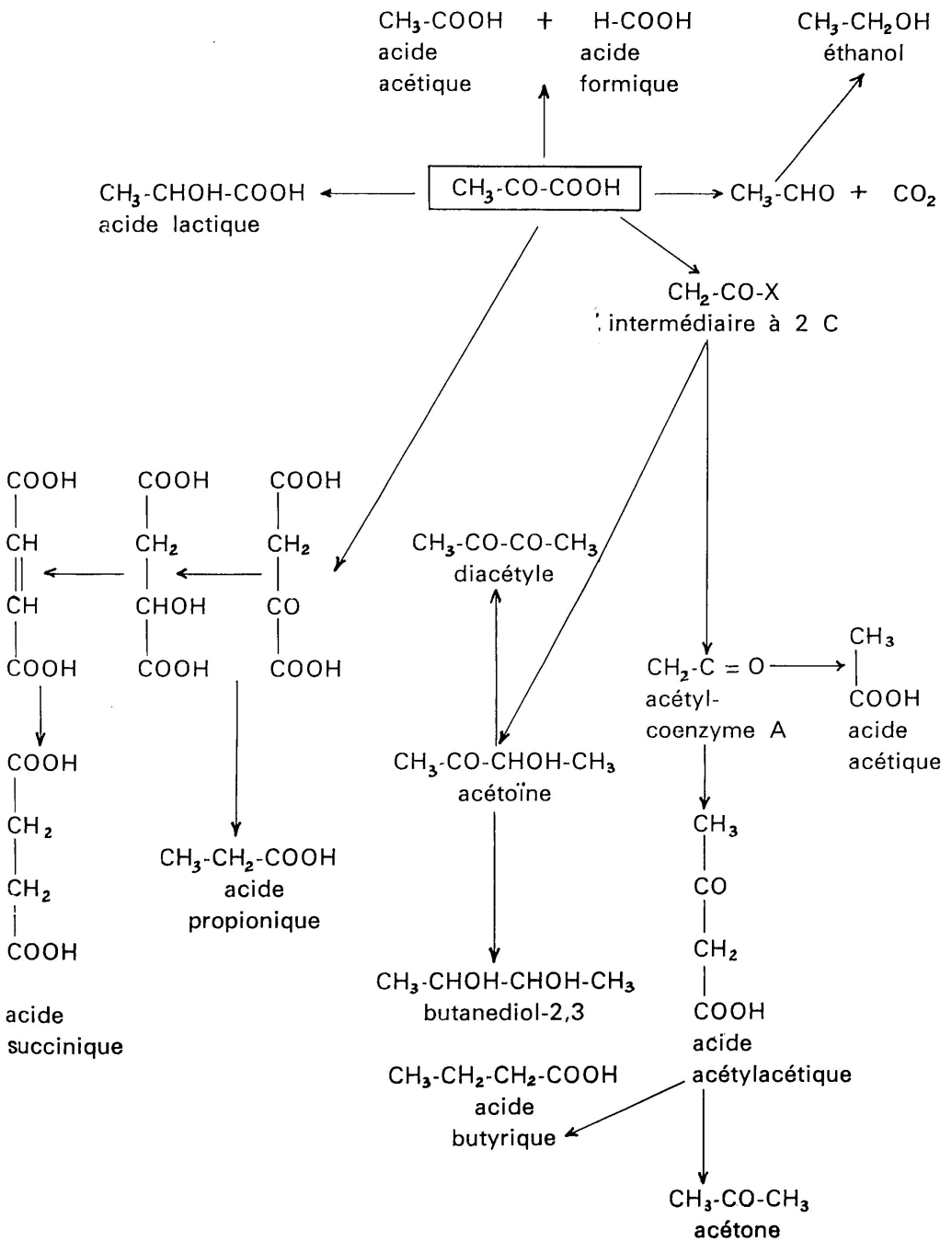
Formation des polyols

Les bacilles à caractère homofermentatif forment, sauf dans un cas, du glycérol à partir des divers glucides, la teneur la plus élevée étant enregistrée à partir de l'arabinose. Ils forment toujours du mannitol à partir du fructose, des quantités faibles dans la majorité des cas, sauf une souche qui en produit autant qu'un bacille hétérolactique ; le mannitol est également formé à partir du glucose, fait encore jamais signalé. De même, ces bacilles homolactiques forment de l'érythritol, surtout à partir du glucose, ainsi que de l'arabitol mais seulement dans un cas. Ils ne forment pratiquement pas de butanediol-2,3.

Les coques et les bacilles hétérolactiques se conduisent de la même façon. Ils forment toujours du glycérol et à partir de n'importe quel glucide, la quantité formée est à peu près semblable pour les deux hexoses ; dans le cas des pentoses, le glycérol formé est deux à trois fois plus élevé que lors de l'attaque des hexoses. La formation du mannitol est très importante à partir du fructose, et à partir du glucose, bien que faible, elle n'en est pas moins toujours positive ; à partir des pentoses, ce n'est que dans deux cas et pour l'arabinose que nous avons mis en évidence le mannitol. L'érythritol est formé en quantité importante à partir des hexoses, plus rarement à partir des pentoses. L'arabitol est le polyol rencontré le moins souvent et celui dont les teneurs sont les plus faibles. La formation du butanediol-2,3 est surtout importante, avec les hexoses et en particulier avec le glucose, les bacilles en forment davantage que les coques.

SCHEMA 1

Transformations de l'acide pyruvique



Il était connu que les bactéries hétérolactiques forment toujours du glycérol et du butanediol-2,3 dans la fermentation lactique du glucose et des pentoses, ainsi que du mannitol dans la fermentation lactique du fructose ; on pensait par contre que les bactéries homolactiques ne forment pas de polyol ou seulement des traces de glycérol. Nous avons montré la présence d'autres polyols, arabitol et érythritol, formés aussi bien à partir des hexoses que des pentoses, ainsi que du mannitol à partir d'autres glucides que le fructose. Les bactéries homolactiques, ou hétérolactiques, forment les mêmes polyols, la formation est simplement quantitativement plus faible pour les homolactiques. La production de polyols ne permet pas de différencier les bactéries suivant leur caractère hétérofermentatif ou homofermentatif ; elle n'est pas en relation avec l'aspect morphologique. Cette formation n'est donc pas un caractère d'espèce, mais est le fait de toute fermentation lactique des glucides. Cette formation de polyols ainsi que celles des acides montrent que la distinction entre le caractère homofermentatif et hétérofermentatif est simplement une question de degré.

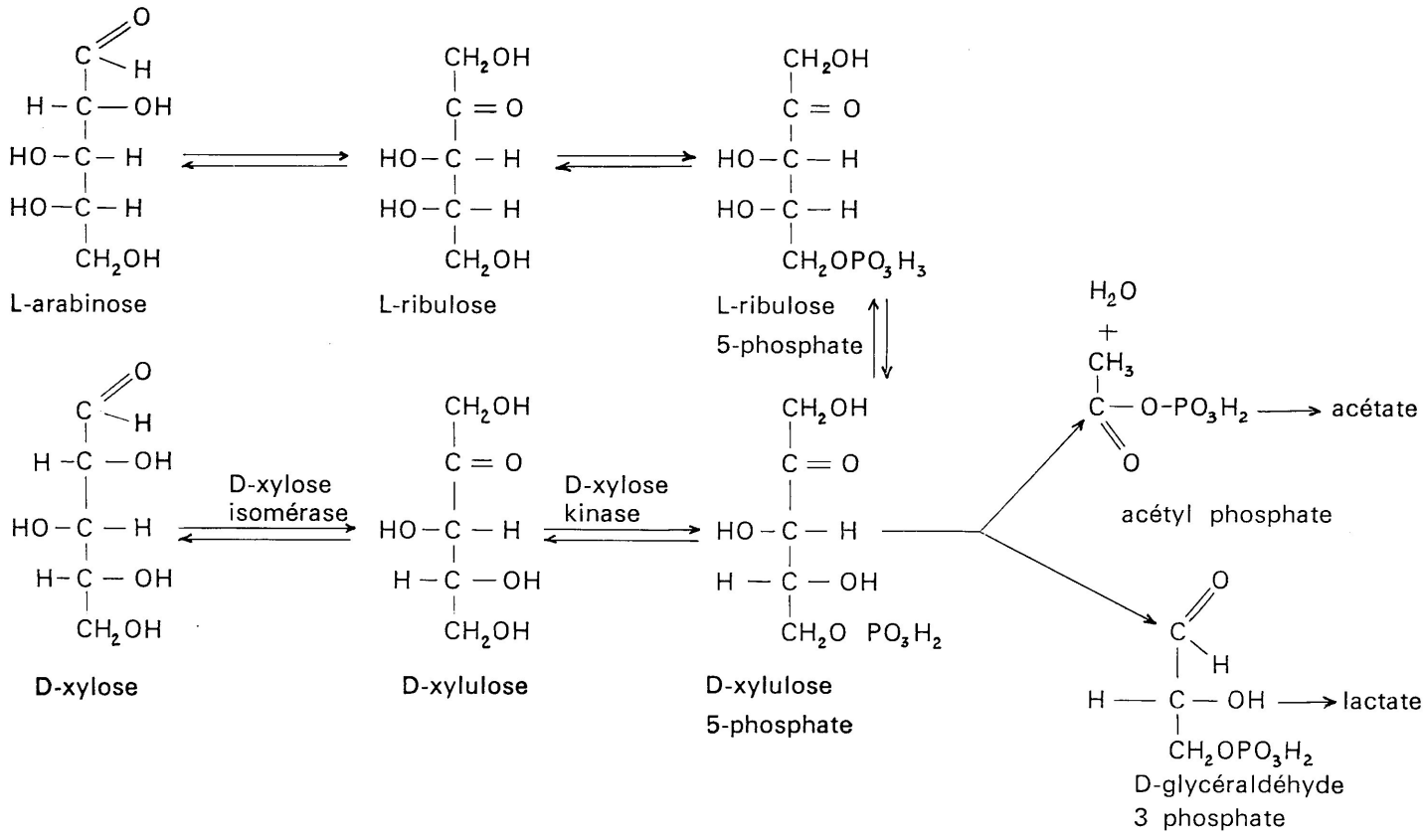
Mécanisme chimique de la formation des polyols.

Les levures et les cellules des êtres supérieurs dégradent les hexoses suivant la voie glycolytique d'EMBDEN-MEYERHOF. Les bactéries lactiques possédant une aldolase suivent la même voie, jusqu'au stade acide pyruvique. Le premier acte de la dégradation est la formation d'une série d'esters phosphoriques du glucose et du fructose qui se transforment successivement les uns dans les autre pour aboutir à la formation du fructofuranose-1-6-phosphorique (ester de HARDEN et YOUNG) ; celui-ci est scindé en deux trioses, dont l'un, le phosphoglycéraldéhyde, conduit à l'acide pyruvique qui devient le pivot des réactions ultérieures. Dans la fermentation alcoolique, l'acide pyruvique subit une décarboxylation qui conduit à l'éthanal qui est alors réduit en éthanol, l'hydrogénation étant couplée avec l'oxydation du glycéraldéhyde. Dans la fermentation lactique, l'hydrogénation porte sur l'acide pyruvique et il y a formation d'acide lactique ; cette transformation est catalysée par la déshydrogénase lactique dont le coenzyme est la codéhydrase I (ou nicotinamide adénine dinucléotide, NAD)

$$CH_3\text{-}CO\text{-}COOH \xrightarrow[\text{déshydrogénase lactique}]{\text{NADH}} CH_3\text{-}CHOH\text{-}COOH$$
$$+ \ 2\,H$$

SCHEMA 2

Fermentation des pentoses par *Lactobacillus plantarum*



Mais, les bactéries lactiques peuvent utiliser d'autres accepteurs d'hydrogène que l'acide pyruvique et c'est ainsi que la réduction du fructose conduit au mannitol :

$$C_6H_{12}O_6 + 2\ H \longrightarrow C_6H_{14}O_6$$

Les bactéries lactiques forment également d'autres produits secondaires qui proviennent de l'acide pyruvique qui est le pivot de nombreuses réactions (schéma 1).

L'utilisation du glucose marqué (^{14} C) a permis à GIBBS et *al.* (15) de montrer que **Lactobacillus casei,** bactérie homofermentative, fait fermenter pour 97 % le glucose suivant le schéma de la glycolyse d'EMBDEN-MEYERHOF, mais que **Leuconostoc mesenteroides,** bactéries hétérofermentative, utilise une autre voie, celle des hexoses monophosphates. Des travaux plus récents confirment ces résultats et ont également permis de montrer les voies de dégradation des pentoses par les bactéries lactiques (16) (schéma 2).

Si la formation d'érythritol et d'arabitol n'avait pas, à notre connaissance, été signalée avant nos travaux pour les bactéries lactiques, il est connu que d'autres microorganismes, les levures osmophiles par exemple, forment ces polyols par la voie des hexoses monophosphates (schéma 3) et que simultanément la formation de glycérol et d'éthanol provenait de la voie glycolytique d'EMBDEN-MEYERHOF (16); la voie de formation de l'érythritol semble pour le moment plus difficile à expliquer.

Les bactéries lactiques peuvent dégrader les glucides d'après la voie « hexose monophosphate » qui conduit à la formation d'arabitol pour d'autres microorganismes. Il n'est donc pas impossible que la formation des polyols que nous avons mis en évidence s'effectue suivant un schéma assez semblable à celui qui a été indiqué pour les levures osmophiles.

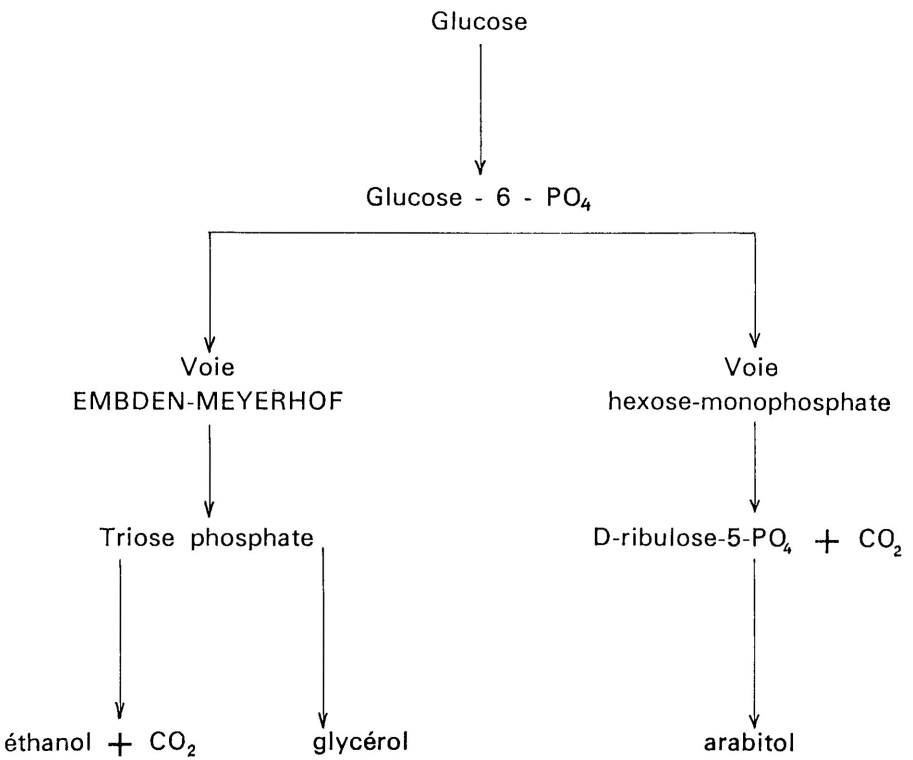
IV. — RESUME

Au cours de la première partie de ce travail, nous avons étudié en détail les possibilités de la chromatographie sur papier dans la séparation de différents glucides et de différents polyols. Nous avons montré à cet effet l'avantage de l'utilisation de papier imprégné au préalable d'acide borique dans la séparation du fructose et du mannitol. Nous avons donné

SCHEMA 3

Fermentation du glucose par les levures osmophiles

(d'après GUNSALUS et STANIER)



une technique très sensible de révélation des cétoses et des polyosides contenant un ose à fonction cétone, et montré qu'après oxydation périodique il est possible par pulvérisation d'une solution de amino-2 diphényle d'obtenir des taches de couleur différente pour les glucides et des polyols. A la suite de ces mises au point, nous indiquons une méthode de caractérisation et d'estimation du mannitol dans les milieux de fermentation lactique.

Cette technique nous ayant permis d'observer la présence dans les milieux de culture d'arabitol et d'érythritol, nous avons dans la deuxième partie étudié la formation de ces divers polyols par différentes bactéries lactiques à partir de divers glucides. Cette étude nous a montré la présence constante de ces polyols, dont la nature et la quantité sont variables suivant l'espèce des bactéries et surtout suivant les glucides fermentés. Cette formation de polyols ne se rattache à aucun autre caractère des bactéries lactiques et ne peut pas servir à la différenciation des espèces. Nous avons ensuite envisagé les mécanismes possibles de la formation de ces divers polyols par les bactéries lactiques.

V. — REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) CHEESEMAN G.C., SILVA M.T. et SHARPE M.E. — The differenciation of bacterial species by paper chromatography. **J. Appl. Bacteriology,** 1959, **22**, 294 et 317.

(2) LAMBION R. et MESKHI A. — Les bactéries de la fermentation malolactique. **Rev. Ferm. Ind. Alim.,** 1957, **12**, 131.

(3) PEYNAUD E., GUIMBERTEAU G. et DOMERCQ S. — Application de la chromatographie des sucres à la caractérisation des bactéries lactiques des vins. **Mitteilungen,** 1962, **12**, 183.

(4) ROSEMAN S., ABELES R.H. et DORFMAN A. — Behavior of carbohydrates towards strongly basic ion-exchange resins. **Arch. Biol. Biophys.,** 1953, **35**, 232.

(5) USSEGLIO-TOMASSET L. et CASTINO M. — La determinazione della glicerina nei vini. **Rivista Vitic. Enol.,** 1961, **14**, 381.

(6) COURTOIS J.E. — Quelques acquisitions récentes dans le domaine de l'analyse des glucides. **Mises au point chim. anal. org. pharm. bromatol.** 4e série, Masson, Paris, 1956.

(7) RIBEREAU-GAYON P. — Evaluation de l'acide malique des vins par chromatographie sur papier. **Ann. Fals Fraudes,** 1954, **47,** 3.

(8) LEDERER E. — **Chromatographie en chimie organique et biologique,** 2 tomes, Masson, Paris, 1960.

(9) REES W.R. et REYNOLDS T. — A solvant for the paper chromatographic separation of glucose and sorbitol. **Nature,** 1958, **181,** 767.

(10) GENEST C. et CHAPMAN D.G. — Extraction and identification of sugar alcohols and other carbohydrates in dietetic foods. **Journ. A.O.A.C.,** 1962, **45**, 422.

(11) BARZOTTI-TOWNSEND A.M. et Mc. CLESKEY C.S. — Quantitative estimation of fructose and mannitol by paper chromatography **Proc. Louisiana Acad. Sci.,** 1962, **25**, 20.

(12) GORDON H.T., THORNBURG W. et WERUM L.N. — Rapid paper chromatography of carbohydrates and related compounds. **Anal. chem.** 1956, **28**, 849.

(13) RIBEREAU-GAYON J. et PEYNAUD E. — **Analyse et contrôle des vins.** 2e édition, Béranger, Paris, 1958.

(14) HAUDUROY P. — **Techniques bactériologiques,** Masson, Paris, 1951.

(15) GIBBS M., DUMROSE R., BENNET F. et BUBECK M.R. — On the mechanism of bacterial fermentation of glucose to lactic acid studied with ^{14}C glucose. **J. Biol. Chem.,** 1950, **184,** 545.

(16) GUNSALUS C. et STANIER R.Y. — **The bacteria,** vol. II, Academic Press, 1961.

(17) ROXBURGH J.M., SPENCER J.F.T. et SALLANS H.R. — Recovery of polyhydric alcohols from yeast fermentations. **Can. Journ. Technol.,** 1956, **34**, 248.