CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE L'ACIDE CITRAMALIQUE DANS LES VINS

I - IDENTIFICATION(*)

G. DUBUS
Station Agronomique et Œnologique de Bordeaux

Nous connaissons actuellement d'une manière assez satisfaisante la composition chimique d'un milieu aussi complexe que le vin.

Au début du siècle, on connaissait déjà les principaux composés du vin, grâce aux méthodes d'analyse chimique encore rudimentaires de l'époque. Grâce à l'avènement de la biochimie, on a pu parvenir à une connaissance de plus en plus précise de ces composés, et mettre en évidence des éléments présents en quantités beaucoup plus faibles.

En ce qui concerne les acides organiques, on a pu assez rapidement identifier et doser ceux qui existent dans le vin à des teneurs importantes.

A côté de l'acide acétique, dont une partie est combinée sous forme d'ester acétique, on a assez vite soupçonné l'existence d'autres acides volatils présents à de faibles teneurs dans les vins normaux, et qui, en quantités plus importantes, indiquent les attaques bactériennes.

Au moyen de techniques analytiques modernes comme la chromatographie en phase gazeuse, on a pu définir la nature et la concentration de ces composés, existant en majeure partie sous forme d'esters.

De même, la chromatographie sur colonne et sur papier, employée conjointement à des méthodes de dosage enzymatique, a permis de mettre en évidence et de doser de nombreux acides ; la plupart, existant en quantités très faibles, appartiennent au groupe des acides carbonyliques : on peut donc les séparer très facilement, par chromatographie, sous forme de dinitrophénylhydrazones ; d'autres sont relativement abondants,

* Cet article constitue la première partie du condensé d'une thèse de doctorat de 3e cycle en chimie, mention biochimie, soutenue à la Faculté des Sciences de l'Université de Bordeaux le 5 Février 1969.

TABLEAU I

Principaux acides organiques du vin

Acides	Concentration (g par litre)
tartrique	2 à 5
malique	0 à 5
citrique	0 à 0,5
succinique	0,5 à 1,5
lactique	1 à 5
acétique	0,5 à 1

TABLEAU II

Acides volatils du vin

Acides	Concentration
formique	50 mg par litre
propionique	traces
butyrique	traces
valérianique	traces
isovalérianique	traces
caproïque	traces
œnanthylique	traces

mais le manque de réactions spécifiques les avaient fait longtemps confondre avec d'autres acides.

Les différents acides organiques jouent un rôle important dans la vinification et la conservation du vin, et pour certains, il est particulièrement intéressant d'en connaître la teneur.

Ainsi, le taux des acides volatils, déterminé par une analyse simple et rapide, donne une indication précise sur l'état de santé du vin, tant au cours de la vinification que lors de la conservation : depuis longtemps cette détermination fait partie de toute analyse de routine d'un vin.

TABLEAU III

Acides organiques fixes récemment découverts dans le vin

Acides	Concentration
citramalique	0 à 300 mg par litre
diméthylglycérique	0 à 600 mg par litre
gluconique	0 à 3 g par litre
glyoxylique	0 à 30 mg par litre
d-glucuronique	0 à 1 g par litre
d-galacturonique	0,5 à 1 g par litre
oxalacétique	0 à 5 mg par litre
α-cétoglutarique	0 à 200 mg par litre
pyruvique	0 à 500 mg par litre
mucique	?

Après la découverte de la fermentation malolactique et la mise en évidence de tout le parti qu'on pouvait tirer d'une telle désacidification biologique, est apparue la nécessité d'une technique simple et courante de dosage simultané de l'acide malique et de l'acide lactique. La chromatographie sur papier est venue une fois de plus apporter une solution élégante à ce délicat problème.

Les acides carbonyliques sont actuellement mieux connus, grâce aux remarquables travaux de BLOUIN (1966) ; cet auteur a mis en évidence leur rôle non négligeable dans la combinaison de l'anhydride sulfureux dans les moûts et les vins ; ils est également parvenu à préciser, par la mise au point de délicates méthodes de dosages enzymatiques, les teneurs en acide pyruvique, α-cétoglutarique, oxalacétique, d-glucuronique et d-galacturonique, et à doser l'acide glyoxylique par une méthode colorimétrique.

Parmi les acides organiques, il en est deux, découverts récemment dans le vin, grâce aux techniques de chromatographie de partage sur colonne, qui ont peu retenu l'attention jusqu'ici : ce sont l'acide α-méthylmalique ou acide citramalique, et l'acide déhydroxy-2, 3 méthyl-2 butyrique ou acide diméthylglycérique. La biosynthèse de ces deux acides semble étroitement liée. Si on ne possède actuellement presque aucune donnée sur la synthèse et le rôle de l'acide diméthylglycérique dans le

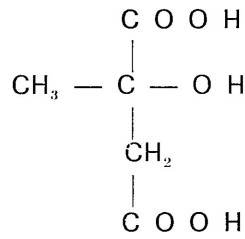
vin, par contre, le peu que l'on sait de l'acide citramalique incite à étudier ce corps de façon plus approfondie.

L'acide citramalique a été tout d'abord identifié comme un composé normal, quoique peu abondant, de la matière végétale. Après avoir montré qu'il participait à de nombreux processus biochimiques dans le règne animal, on a découvert récemment qu'il était formé en quantités appréciables lors de la fermentation alcoolique. Sa biosynthèse, relativement bien connue par ailleurs, a été jusqu'ici fort peu étudiée chez les levures ; il serait donc fort intéressant d'en comparer les mécanismes aux processus de synthèse et de dégradation que l'on connaît déjà chez les végétaux supérieurs et les bactéries. Cette comparaison serait d'autant plus riche en enseignements que les diverses données actuelles relatives à l'acide citramalique tendent à affirmer son universalité en tant qu'intermédiaire du métabolisme général de la cellule vivante.

Pour parvenir à une connaissance satisfaisante des phénomènes dans lesquels l'acide citramalique joue un rôle, il faut disposer d'une technique correcte de séparation et de dosage ; ceci est d'autant plus indispensable que cet acide se rencontre presque toujours dans des milieux fort complexes. Les méthodes existant actuellement présentent encore de nombreuses imperfections ; nous avons choisi une technique chromatographique pratique et relativement précise, qui nous a permis de connaître la répartition de l'acide citramalique dans les vins. Cette méthode nous a également permis d'étudier la formation et la dégradation des acides organiques par diverses souches de levures, dans des conditions expérimentales variées. Nous avons pu ainsi confirmer que le métabolisme de l'acide citramalique est lié à celui d'autres acides organiques présents dans le vin.

I. - METABOLISME DE L'ACIDE CITRAMALIQUE

L'acide citramalique, ou α-méthylmalique, est connu en chimie organique depuis 1892. Sa formule est la suivante :



En tant que composé biochimique, il est découvert pour la première fois dans le péricarpe des pommes (HULME, 1954) ; cet acide peut être séparé par chromatographie, tout d'abord sur colonne d'échangeurs d'ions sur Zeokarb 125, Deacidite E et Dowex 2 successivement puis de gel de silice ou par chromatographie sur papier avec les trois systèmes de solvants suivants :

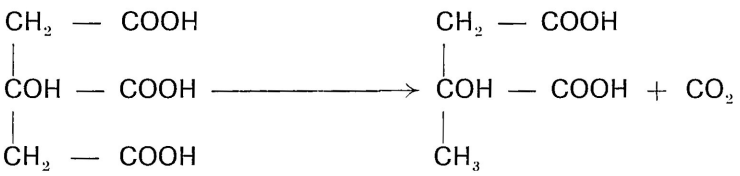
— butanol 4, acide formique 1, eau 5

— alcool benzylique 24, butanol tertiaire 8, isopropanol 8, acide formique 8, eau 1

— propanol 6, ammoniaque 3, eau 1

Il est identifié par spectrophotométrie infrarouge.

A cette époque, le rôle de l'acide citramalique dans le métabolisme végétal est encore très discuté. On suppose cependant qu'il participe au cycle des acides tricarboxyliques. CARLES (1958) est le premier à l'identifier dans le vin par chromatographie sur papier ; cet auteur pense qu'il se forme par décarboxylation de l'acide citrique sous l'influence des bactéries, selon un mécanisme comparable à celui de la fermentation malolactique.



Selon CARLES, une « fermentation citramalique » expliquerait ainsi la disparition de l'acide citrique, qu'on observe au cours de la fermentation malolactique.

DIMOTAKI-KOURAKOU (1962) a séparé les acides organiques du vin par chromatographie sur échangeurs d'anions (Dowex 1 x 2) sous forme acétate ; elle parvient à isoler l'acide citramalique et l'acide citrique et à les doser par oxydation permanganique, puis par titrage iodométrique de l'acétone formée. Cet auteur démontre pour la première fois que l'acide citramalique se forme pendant la fermentation alcoolique, à partir des sucres, conformément à l'hypothèse de GENEVOIS (1949). Elle prouve également que l'acide citrique n'augmente pas au cours de la fermentation systématique de l'acide citrique au cours de la fermentation alcoolique ; il avait pu être établi avec la technique de dosage mise au point

par cet auteur à cette époque, que la teneur en acide citrique augmentait régulièrement de 30 à 40 p. 100. Ayant cependant des doutes sur la véritable nature du phénomène, il réalisa l'expérience suivante :

Un moût de raisin stérilisé est mis à fermenter dans un ballon; après achèvement de la fermentation, l'alcool est chassé par ébullition sous vide ; le milieu filtré, est ensuite additionné de 120 g de saccharose et de sels ammoniacaux ; puis il est à nouveau ensemencé. On réalise de cette façon cinq fermentations successives, dont les dernières sont d'ailleurs très lentes. Les teneurs en acide citrique obtenues après chaque fermentation sont les suivantes :

TABLEAU IV

Formation d'acide citrique au cours de la fermentation

(PEYNAUD, 1946)

	Teneurs en acide citrique (mg par l)	Acide citrique formé (mg par l)
Moût initial	224	—
1re fermentation	306	82
2e fermentation	290	84
3e fermentation	502	112
4e fermentation	600	98
5e fermentation	702	102

Les chiffres du tableau IV montrent que la formation d'acide citrique est sensiblement la même à chaque fermentation ; cet acide s'accumule dans le milieu dont la teneur augmente de 224 à 720 mg par litre. La formation est ici très considérable, puisque la teneur a triplé ; chaque dosage est effectué sur des liquides de composition comparables.

L'expérience montrait donc de façon indiscutable la réalité du phénomène. Cependant, à cette époque, la méthode qui permettait de doser l'acide citrique dosait en même temps l'acide citramalique et la valeur trouvée représentait la somme des deux acides ; ceci explique l'interprétation en réalité inexacte de cette expérience. L'existence de l'acide

citramalique était d'ailleurs déjà soupçonnée ; cependant son identification ne devait être rendue possible que par la mise au point de méthodes analytiques plus sélectives, telles que la chromatographie sur colonne et sur papier. La formation d'acide citramalique par les levures au cours de la fermentation alcoolique a donc été démontrée, bien qu'indirectement, de longue date.

Si on établit la correspondance en acide citramalique des chiffres attribués par PEYNAUD à l'acide citrique, on obtient, pour les cinq fermentations successives : 63, 65, 86, 76 et 79 mg d'acide citramalique par litre. On peut donc dire qu'au cours de la fermentation, **Saccharomyces ellipsoideus** forme en moyenne 75 mg d'acide citramalique à partir de 120 g de saccharose.

Les précisions qu'elle apporte sur la génèse de l'acide citramalique permettent à DIMOTAKI-KOURAKOU (1962 b) de réfuter l'hypothèse de la « fermentation citramalique » de CARLES ; si l'acide citrique disparaît au cours de la fermentation malolactique la méthode de dosage de DIMOTAKI-KOURAKOU permet de démontrer aisément que le taux d'acide citramalique reste inchangé (de 70 à 180 mg par litre en moyenne). CARLES a d'ailleurs reconnu par la suite l'exactitude de ces conclusions.

La chromatographie de partage sur colonne, en particulier la chromatographie sur gel de silice avaient déjà permis la séparation et l'identification de l'acide citramalique, bien avant la mise au point de méthodes sélectives de dosage. HULME (1954) avait déjà utilisé ce procédé en 1954 et 1958, en réalisant l'élution avec de la méthyl-isobutylcétone. L'acidité de chaque fraction était dosée au moyen de soude très diluée. Dans la peau des pommes, il trouvait de 0 à 25 mg d'acide citramalique pour 100 g de poids frais.

Entre temps, d'autres auteurs, afin d'obtenir un meilleur fractionnement, employaient l'élution à augmentation de gradient par l'acide formique. Avant d'effectuer les dosages acidimétriques permettant d'évaluer la teneur de chaque acide, il était indispensable de maintenir les fractions à l'étuve à 100° C pendant au moins 12 heures, afin d'évaporer le plus complètement possible l'acide formique de l'éluat, ce qui représentait un inconvénient.

Une autre méthode, par contre, consistait à utiliser, dans les mêmes conditions, une élution de gradient au moyen du mélange butanol-chloroforme, de concentration croissante en butanol. L'évaluation quantitative ne posait plus aucun problème ; par contre, le gel de silice servant à

confectionner la colonne devait être conservé à l'abri de toute trace d'humidité ; en effet, c'est un corps très hygroscopique, et son taux d'hydratation peut varier en fonction de l'humidité de l'air ; or, pour obtenir des résultats reproductibles, la chromatographie doit être effectuée sur un gel de silice contenant une quantité d'humidité connue et constante. De plus, les temps de séparation pouvaient être très longs, avec des résultats parfois médiocres.

C'est pourquoi CARLES et **al.** (1965) perfectionnent la technique de chromatographie sur colonne des acides organiques. Ils parviennent à séparer complètement l'acide citramalique sur colonne de Célite 535, éluée par élution de gradient au moyen du mélange butanol-chloroforme. Cette méthode est beaucoup plus rapide et sélective que celles utilisant le gel de silice ; elle est très souple et peut s'adapter à des problèmes particuliers de séparation (LOUME, 1967) ; en outre, la Célite 535, qui est une terre d'infusoires, n'est pas hygroscopique et peut se conserver sans risques au contact de l'air. Malgré ces avantages, on ne peut cependant pas prétendre faire une étude rigoureusement quantitative au moyen de cette technique, car le taux de rétention des acides sur la colonne n'est pas constant. De plus, ce taux étant variable suivant la nature des acides, on ne peut guère se fier aux proportions apparentes des différents acides, données par cette méthode. Celle-ci ne peut donc donner qu'un ordre de grandeur. La précision relative de ce genre de mesures a cependant été jugée suffisante par CARLES et d'autres auteurs ; elle leur a effectivement permis d'obtenir des résultats forts intéressants sur le métabolisme des acides organiques au cours de la fermentation alcoolique (CARLES et **al.**, 1967).

Partant de cette méthode, KESNER et MUNTWYLER (1966) réalisent un appareillage permettant l'analyse automatique de mélanges complexes d'acides organiques dans un temps relativement court (1 à 5 heures). Par ce procédé, on peut différencier 13 acides intervenant dans le métabolisme intermédiaire.

L'acide citramalique se retrouve dans diverses boissons fermentées, telles que le saké (TADENUMA et **al.**, 1966). En outre INIGO et BRAVO-ABAD (1962) mettent en évidence un hydroxyacide inconnu, formé par les levures pendant la fermentation alcoolique ; selon PEYNAUD, il s'agirait vraisemblablement de l'acide citramalique.

Tandis que l'acide citramalique est découvert, puis dosé dans le vin, d'autres auteurs s'efforcent de définir son rôle dans le métabolisme intermédiaire. Les résultats obtenus au cours des huit dernières années permettent d'affirmer que cet acide est un constituant universel du métabolisme, tant végétal qu'animal ; on pense également qu'il constitue un pivot essentiel du métabolisme d'un rôle comparable à celui de l'acide oxalacétique dans le cycle des acides tricarboxyliques.

Comme PEYNAUD en 1946, LAFON (1956) constate une formation d'acide citrique au cours de la fermentation alcoolique ; ceci est dû comme précédemment au fait que l'acide citramalique constitue une cause d'erreur par excès dans la méthode KOGAN-PEYNAUD, utilisée à l'époque pour doser l'acide citrique. Expérimentant sur la formation et le rôle des produits secondaires de la fermentation, LAFON en ajoutant de l'éthanol et de l'acide pyruvique au milieu de fermentation constate une augmentation de la formation d'acide citrique ; il s'agit là de toute évidence, d'une formation d'acide citramalique ; il s'en forme également de moindres quantités par addition d'acide acétique. L'acide citramalique appartient donc au métabolisme des produits secondaires de la fermentation alcoolique aux côtés d'un corps tel que l'acide succinique, par exemple.

Possédant une méthode sélective de dosage (méthode DIMOTAKI-KOURAKOU) VITAGLIANO et MURA (1966) constatent une augmentation de la formation d'acide citramalique inversement proportionnelle au pH du moût ; lorsque le pH varie de 4 à 2,85 la formation d'acide citramalique passe de 65 à 280 mg par litre. Il ne s'agit d'ailleurs peut-être que d'une action sélective du pH du milieu sur le développement des différentes espèces de levures.

D'ailleurs comme nous le montrerons plus loin l'action du pH dans ce sens est controversée.

Les recherches les plus fructueuses, utilisées en biochimie végétale et bactérienne, mettent en œuvre toutes les techniques modernes d'analyse ultrafine du métabolisme : utilisation d'éléments marqués, séparation de particules cellulaires par broyage contrôlé et ultracentrifugation différentielle, culture de tissus végétaux, étude de mutants, chromatographie sur colonne et sur papier, etc...

Les travaux de BARKER (1961) sur les dégradations bactériennes ont permis d'identifier l'acide citramalique parmi les produits de dégradation de l'acide glutamique par **Clostridium tetanomorphum.** La chaîne de réactions est la suivante :

glutamate

↓ ↑

β — méthylaspartate

↓ ↑ β — méthylaspartase + Mg^{++}

mésaconate

↓ ↑ mésaconate + Fe^{++}

citramalate

↓ ↑ citramalate + Mg^{++}

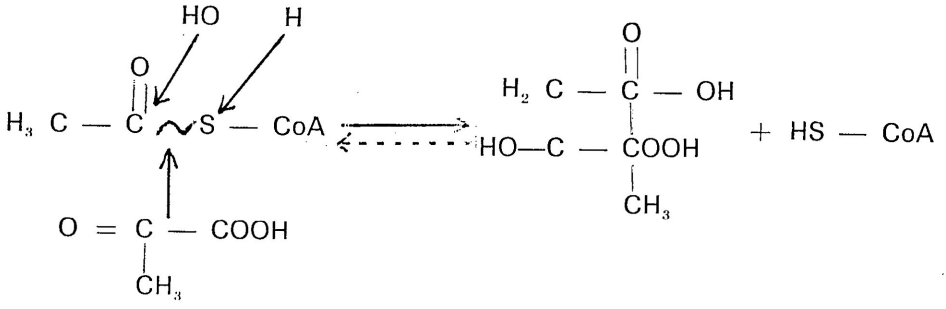
acétate + pyruvate

Le pyruvate donne finalement de l'acide butyrique et de l'hydrogène.

Sans pouvoir en déterminer avec précision les stades intermédiaires, JOLCHINE (1962) met en évidence la possibilité du mécanisme inverse chez les végétaux supérieurs. L'auteur démontre la synthèse de l'acide glutamique à partir de l'acide citramalique, lui-même formé par transacétylation de l'acide pyruvique sous l'influence de la pyruvate-transacétase. L'acide acétique est d'abord activé en acétylcoenzyme—A :

$$CH_3 — COOH + ATP + SH\ Co\text{-}A \rightarrow CH_3 — CO — S — CoA + AMP + P\text{-}P$$

L'acétylcoenzyme A réagirait ensuite avec le groupement carbonyle de l'acide pyruvique :



Cette condensation a probablement lieu dans les chloroplastes, peut-être en relation avec la photosynthèse. Les réactions suivantes, par contre, n'ont pas lieu dans les chloroplastes. Il semble bien que les différents composés formés ne participent pas au cycle des acides tricarboxyliques.

En 1963, à des cultures de tissus de crown-gall de scorsonère, LIORET (1963) incorpore de l'alanine marquée au ^{14}C. Celle-ci, par désamination, donne de l'acide pyruvique marqué sur le carboxyle.

Parmi les composés synthétisés par les tissus végétaux, l'auteur identifie l'acide α-aminobutyrique, marqué sur le carboxyle. Cet acide se forme par décarboxylation de l'acide glutamique, celui-ci étant normalement formé à partir de l'acide citrique.

Dans ce cas, l'acide α-cétoglutarique, qui donne naissance à l'acide glutamique, est lui-même formé par décarboxylation de l'acide isocitrique.

Or, si l'on part de l'acide pyruvique marqué sur le carboxyle, c'est le gaz carbonique provenant de la décarboxylation de l'acide isocitrique qui est marqué, de sorte que l'acide γ-aminobutyrique ne peut l'être. Cela est contraire au fait expérimental.

L'acide glutamique n'est donc pas synthétisé par l'intermédiaire de l'acide citrique, voie normalement connue jusqu'ici. RIBÉREAU-GAYON (1966) aboutit à des conclusions comparables au sujet de la formation d'acide γ-aminobutyrique marqué à partir d'acide acétique marqué ; pour lui, la chaîne de réactions ne semble pas passer par le stade succinate semi-aldéhyde, car l'introduction d'acide succinique marqué n'ammène pas la formation d'acide γ-aminobutyrique marqué.

LIORET reconstitue donc le mécanisme de la biosynthèse de l'acide glutamique dans les cultures de tissus de crown-gall de scorsonère ; on s'aperçoit que c'est exactement la chaîne inverse de celle établie par BARKER (1961) pour la dégradation de ce même acide chez **Clostridium tetanomorphum.**

Cette séquence de réactions peut coexister avec le cycle de l'acide citrique.

RACHAVENDRA RAO et **al.** (1963) découvrent un enzyme (secrété par un **Pseudomonas** vivant dans le sol) capable de réaliser l'hydratation du citraconate en citramalate, en présence d'ions Fe^{++} et de composés sulfhydrilés. Cette hydratation ne passe pas par le stade mésaconate.
SAI et AMAHA (1965) étudient le métabolisme de l'acide citramalique chez des mutants de **Saccharomyces carlsbergensis,** à respiration déficiente ; ces souches respirent très peu, et par conséquence sont hautement fermentatives. Alors que chez les levures « sauvages » il se forme

surtout des acides acétique, succinique et lactique, les mutants produisent surtout de l'acide lactique et de l'acide citramalique. La formation de cet acide est proportionnelle à la concentration en glucose (conformément à ce qui est admis par tous les auteurs) et au pH (contrairement aux résultats de VITAGLIANO et MURA, 1966). Même quand la quantité d'acide citramalique augmente, il constitue toujours 32 à 39 p. 100 des acides organiques totaux. Sa formation serait donc intimement liée à celle de tous les autres acides organiques.

En poursuivant leurs recherches ces mêmes auteurs, étudiant des mutants spontanés ou provoqués (par irradiation ultra-violette ou par traitement à l'acriflavine), constatent qu'un faible quotient respiratoire ne s'accompagne pas forcément d'une synthèse accrue d'acide citramalique. Les auteurs fondent de grands espoirs sur l'étude de mutants haploïdes, dont la composition en cytochromes est connue. Certains accumulent de l'acide citramalique, d'autres ne le font pas. Jusqu'ici on n'a pas pu établir de rapport entre la nature des cytochromes absents et la capacité d'accumulation de l'acide citramalique.

Pour apporter de nouvelles précisions sur la formation des acides organiques, CARLES et **al.** (1967) ont l'idée de faire développer des levures à partir de divers substrats, et de doser les acides organiques au cours de la fermentation.

La technique utilisée est la méthode de chromatographie sur colonne de célite déjà mise au point par CARLES et **al.** (1965). Avec une méthode de recherche aussi simple, les auteurs parviennent à des résultats très intéressants, dont les plus remarquables concernent l'utilisation de diverses sources d'azote et des glucides par les levures.

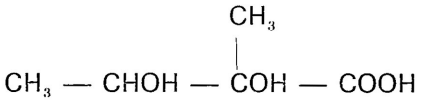
Lorsque la source d'azote de **Saccharomyces ellipsoideus** est constituée par l'acide aspartique et la source d'énergie par le glucose, l'acide succinique et l'acide malique sont très importants(ils représentent à eux deux la moitié du total des acides). L'acide citramalique et l'acide diméthylglycérique sont en quantité égale (7 à 8 p. 100 des acides organiques totaux).

Si on remplace l'acide aspartique par le sulfate d'ammonium l'acide lactique représente 30 p. 100 des acides, et l'acide diméthylglycérique 25 p. 100. L'acide citramalique est devenu 10 fois moins abondant que l'acide diméthylglycérique.

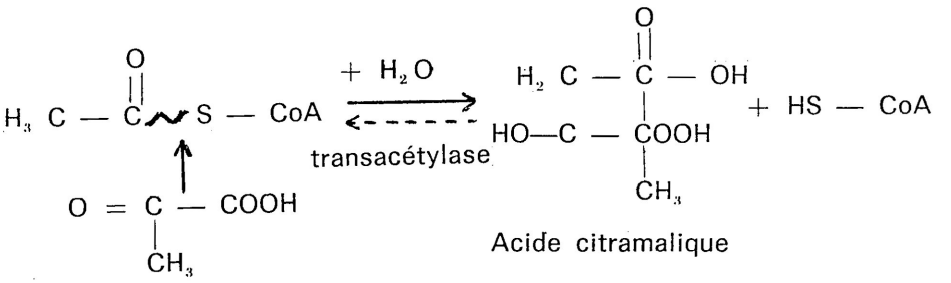
Lorsque le milieu de culture contient à la fois de l'acide aspartique et du galactose (au lieu du glucose) l'acide citramalique représente 20 p. 100 des acides organiques, et l'acide diméthylglycérique disparaît. Ceci tend à prouver que le galactose peut être métabolisé directement sans être transformé en glucose. Les résultats expérimentaux sont comparables lorsque la source d'énergie est le glucose en milieu très aéré.

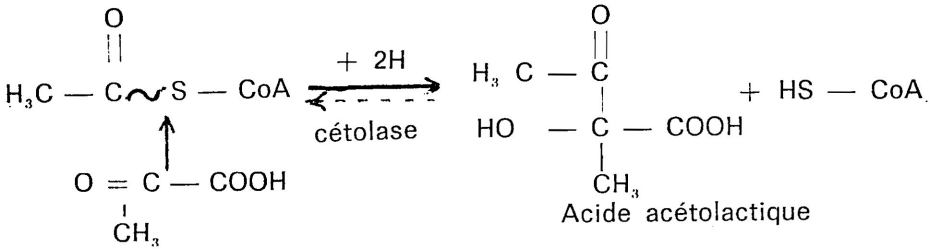
Si on ajoute de l'acide acétique ou de l'acide succinique au milieu, l'acide diméthylglycérique augmente ; si on ajoute de l'acide lactique, c'est l'acide citramalique qui augmente.

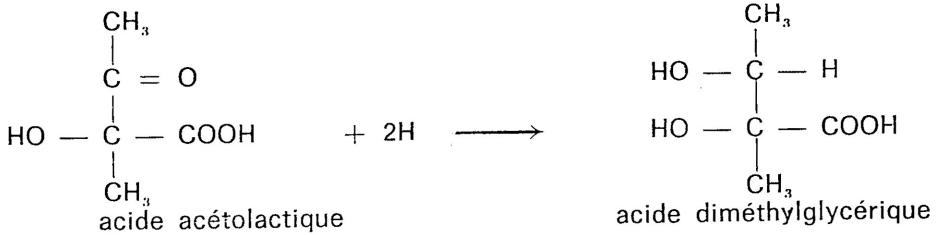
L'acide diméthyl-2, 3 glycérique est un acide découvert récemment dans le vin par CARLES et **al.** (1966), au moyen de la technique de chromatographie sur colonne de célite.



Cet acide est constamment présent dans le vin et les milieux fermentés tels que la bière. Il est relativement abondant et facilement dosable. Son métabolisme semble plus ou moins lié à celui de l'acide citramalique, ce qui augmente à la fois l'intérêt et la complexité du problème.







Selon CARLES ces acides proviennent tous les deux de la condensation d'acétate et d'acide pyruvique. Comme nous l'avons déjà vu, sous l'action d'une transacétylase, l'acétate peut se fixer par sa fonction méthyle sur la fonction cétone de l'acide pyruvique ; on obtient ainsi l'acide citramalique. Si c'est une cétolase qui intervient, l'acétate se fixe par sa fonction carboxyle sur la fonction cétone de l'acide pyruvique, et il se forme de l'acide acétolactique. Celui-ci est instable ; en milieu réducteur il donne de l'acide diméthylglycérique par la même réaction qui transforme l'acide pyruvique en acide lactique.

La thiamine pyrophosphate favorise l'apparition de l'acide diméthylglycérique, car sur cette molécule est fixée l'acétaldéhyde qui va normalement se condenser avec l'acide pyruvique. L'addition de thiamine au milieu augmente la proportion de ces deux molécules.

Selon CARLES, suivant les conditions de la fermentation on aboutit à une prédominance, soit de l'acide citramalique, soit de l'acide diméthylglycérique. On se trouverait donc là en présence d'un équilibre entre deux voies du métabolisme des levures. D'après cet auteur, les deux acides ne sont d'ailleurs pas repris dans le métabolisme et s'accumulent dans les vins vieux. Il serait très intéressant de savoir dans quelles conditions à partir des mêmes éléments, la biosynthèse aboutit à l'acide citramalique plutôt qu'à l'acide diméthylglycérique (ou inversement), pourquoi l'acétate se fixe sur l'acide pyruvique à une extrémité plutôt qu'à une autre, pourquoi entre en jeu une transacétylase plutôt qu'une cétolase.

Il ressort de ces travaux que l'acide citramalique est un composé universel dans le règne végétal. On le rencontre constamment dans divers milieux fermentés tels que le vin, la bière, le cidre, le saké, etc... Sa biosynthèse est effectuée par les levures. On possède également des renseignements assez précis sur son anabolisme et son catabolisme par différentes bactéries. On le retrouve encore dans le sol, dans les végétaux supérieurs. Cette remarquable constance élimine d'emblée l'hypothèse que ce serait un composé particulier à un groupe d'êtres vivants. Au contraire, il s'agit, non seulement d'un composé normal du métabolisme de la matière vivante, mais encore d'un élément clef, d'une plaque tournante, telle que par exemple, l'acide oxalacétique.

Ceci a été confirmé par la découverte de l'acide citramalique dans le règne animal ; l'universalité de ce corps est désormais reconnue. Dès 1957, les travaux de ADLER et **al.** mettaient en lumière, dans des broyats de foie de rat, des mécanismes fort comparables à ceux déjà connus pour le métabolisme « végétal » de l'acide citramalique.

En présence d'ions Mg^{++}, des mitochondries de foie de rat catalysent l'oxydation complète de l'acide itaconique. En présence de succinate-thiokinase, de coenzyme A, d'ions Mg^{++} et d'un nucléoside triphosphate (principalement la guanosine-triphosphate), l'itaconate est d'abord activé en itaconyl-coenzyme A ; celui-ci est ensuite clivé en acétyl-coenzyme A et pyruvate vraisemblablement en passant par le stade intermédiaire de citramalyl-coenzyme A. Le pyruvate est réduit en lactate par le NADH, en présence de lactate-déshydrogénase endogène.

En présence d'itaconate, l'extrait mitochondrial fixe du gaz carbonique; il est probable que le pyruvate issu du clivage de l'itaconyl-coenzyme A fixe le gaz carbonique pour former de l'oxalacétate ; celui-ci pourrait alors se combiner à l'acétylcoenzyme A pour donner naissance à du citrate. En effet, parmi les composés obtenus, on retrouve l'acide citrique, ainsi que l'acide malique (réduction de l'acide oxalacétique). Enfin, le mésaconate peut se transformer en itaconate.

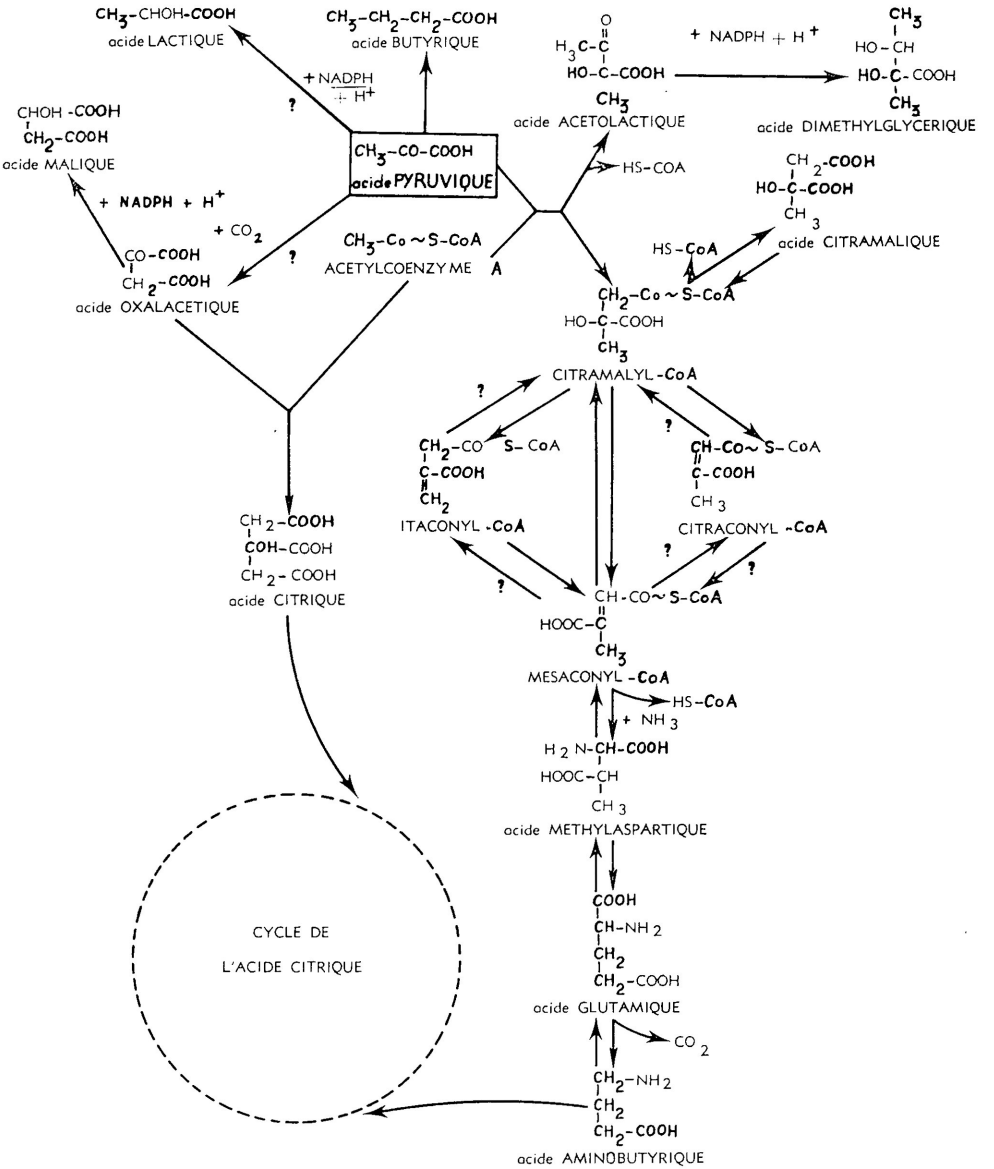
L'acide citramalique étant reconnu comme une étape du métabolisme de la cellule vivante, il importerait d'étudier son rôle et son importance. Les travaux précédemment exposés, montrent que cet acide caractérise une chaîne réactionnelle particulière dans le métabolisme des acides organiques. Cette chaîne qui pourrait être un cycle serait rigoureusement distincte du cycle des acides tricarboxyliques caractérisé par l'acide citrique.

D'après les travaux de SAI et AMAHA (1967) il semblerait que les phénomènes respiratoires n'interviennent que très peu dans le métabolisme de l'acide citramalique. D'autre part, on sait que le cycle de l'acide citrique caractérise essentiellement le catabolisme des glucides. De là à voir dans la prédominance de l'un ou de l'autre acide la manifestation d'un métabolisme faiblement ou fortement aérobie, il y a un pas qu'on est vite tenté de franchir. Tout ce qu'il est possible de dire, c'est qu'on a constaté expérimentalement la coexistence de deux chaînes réactionnelles dans un même organisme vivant : mais il y a toujours prédominance de l'une ou de l'autre vraisemblablement en fonction des conditions de développement. Il y aurait une sorte de balance entre le métabolisme de l'acide citrique et celui de l'acide citramalique.

Ceci étant précisé il importe de ne pas négliger l'acide diméthylglycérique, de découverte récente. Comme on a pu le voir d'après les quelques travaux qui lui ont été consacrés, il semble également exister un équilibre entre le métabolisme de l'acide diméthylglycérique et celui

TABLEAU V

Schéma général des connaissances actuelles sur le métabolisme de l'acide citramalique



de l'acide citramalique, d'autant plus que leur biosynthèse part des mêmes éléments.

On se trouve là en présence d'un carrefour d'interactions extrêmement complexes, et il reste beaucoup à faire pour en préciser les modalités.

Le tableau V rassemble les données actuelles en faisant la synthèse des principaux travaux effectués sur ces problèmes.

II. - SEPARATION ET DOSAGE DE L'ACIDE CITRAMALIQUE

On peut, d'une part, identifier l'acide citramalique en l'isolant par chromatographie sur papier ou sur colonne, et d'autre part le doser par une réaction appropriée ; cette réaction peut-être spécifique ; si elle ne l'est pas, il faut effectuer au préalable un fractionnement plus ou moins poussé. Les méthodes de dosage chimique associées à des séparations sur résines échangeuses d'anions ont fait l'objet d'études détaillées précédentes rassemblées dans une thèse de doctorat (DUBUS, 1969).

Avant d'effectuer une séparation chromatographique de l'acide citramalique du vin, il est souvent utile d'effectuer un fractionnement partiel sur échangeurs d'ions, ce qui permet d'isoler en bloc tous les acides du vin, en éliminant en particulier les sucres et les sels minéraux, les chromatogrammes sont ainsi beaucoup plus faciles à interpréter, leur développement n'étant pas perturbé par diverses impuretés.

A. - ISOLEMENT DES ACIDES ORGANIQUES DU VIN.

Le vin est d'abord passé sur une colonne échangeur cationique (Dowex 50 x 2) sous forme H^+ qui retient tous les cations minéraux et les aminoacides. Pour isoler les acides organiques de l'effluent, on les fixe sur un échangeur d'anions (Dowex 1 x W2) sous forme carbonate ; le liquide contenant les acides étant d'un pH relativement bas après passage sur Dowex 50 x 2, il risquerait de se produire dans l'échangeur anionique un dégagement brutal de gaz carbonique, qui troublerait fortement la bonne marche de l'opération. C'est pourquoi, au sommet de la colonne Dowex 1 x 2, on place une petite quantité d'un échangeur faiblement cationique sous forme H^+ (Amberlite I R C 50), séparé du Dowex 1 x 2 par un tampon de laine de verre.

Ceci permet au liquide d'arriver sur le Dowex 1 x 2 à un pH voisin de la neutralité. Après fixation des acides, on enlève l'Amberlite, et on élue les acides par une solution de carbonate d'ammonium à 10 p. 100. L'éluat, contenant tous les acides organiques de l'échantillon initial, est évaporé à sec au bain-marie pendant quelques heures, ce qui élimine le carbonate d'ammonium transformé en CO_2, NH_3 et H_2O volatils. Le résidu est ensuite conservé à l'exsicateur, en attendant d'être analysé par chromatographie sur colonne.

B. - CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE DES ACIDES ORGANIQUES DU VIN.

La séparation des acides organiques sur colonne de célite est une méthode maintenant tout à fait classique. Le mode opératoire, mis au point par CARLES et **al.** (1965) est le suivant : la célite est d'abord rincée plusieurs fois à l'éther, pour éliminer les impuretés éventuelles. On prend 3 g de célite et on y ajoute goutte à goutte 1,5 ml d'acide sulfurique 0.5 N environ, de manière à humecter uniformément l'ensemble. On ajoute 40 ml de chloroforme en agitant. On fait passer le tout dans une colonne de 20 cm de longueur et de 0,5 cm de diamètre. On tasse la célite de façon homogène à l'aide d'un agitateur en forme de piston.

L'extrait sec contenant les acides est alors mélangé à 0,15 ml d'acide sulfurique 5 N ; on y ajoute 0,3 g de célite, on homogénéise avec une spatule, puis, avec un peu de chloroforme, on introduit le tout au sommet de la colonne. On adapte au sommet de la colonne une ampoule qui recevra les solvants, et on dispose le tout au-dessus d'un collecteur de fractions ; le volume de chaque fraction est compris entre 2 et 3 ml. La vitesse d'écoulement est de 100 gouttes par minute.

Selon la méthode de CARLES, on prépare dans une ampoule à décanter une série de solvants, contenant respectivement 3, 5, 10, 15, 17 et 20 ml de butanol, complétés à 40 ml avec du chloroforme. Dans chaque solvant, on ajoute 4 ml d'acide sulfurique 0,5 N et on agite pendant 2mn ; puis on élimine la phase aqueuse.

La phase organique est versée dans l'ampoule surmontant la colonne, au moyen d'un entonnoir muni d'un filtre plissé, destiné à retenir les dernières traces d'eau.

A chaque fraction, on ajoute 1 à 2 ml d'eau et une goutte de solution de rouge de phénol à 0,04 p. 100. On agite pour faire passer les acides de la phase organique dans la phase aqueuse, et on titre l'acidité à la soude N/200. On établit une courbe d'élution en portant en abscisses les numéros des fractions et en ordonnées les volumes de soude versés.

La durée de l'élution excède rarement 4 à 5 heures. Vers la fin, le débit se ralentit par suite du tassement de la célite, il suffit alors d'appliquer à l'ampoule contenant le solvant la pression d'une bouteille d'air comprimé.

Cette méthode permet d'isoler des acides qui jusqu'ici étaient difficiles à séparer. En doublant le premier solvant, CARLES parvient à séparer partiellement l'acide lactique de l'acide succinique. Il recommande aussi, lorsque les esters sont nombreux, de les éluer avant les acides au moyen d'un solvant contenant seulement 1 ml de butanol pour 39 ml de chloroforme. On voit donc que cette méthode, grâce à diverses modifications auxquelles elle se prête aisément, peut résoudre de nombreux problèmes.

Nous avons apporté diverses améliorations à cette technique. Le choix du rouge de phénol comme indicateur de titration nous semble défectueux ; son virage, surtout en solution diluée, est en effet très progressif, ce qui en rend l'appréciation difficile. Nous avons choisi la phénolphtaléine qui a un virage beaucoup plus rapide et plus net, même en solution très diluée.

En outre, pour mieux séparer l'acide citramalique d'acides encore non identifiés qui l'accompagnent nous avons modifié la séquence des solvants de CARLES.

Lorsque deux pics d'acides sont plus ou moins confondus, on peut, comme le recommande cet auteur, doubler le volume du solvant qui les élue, ou mieux, celui du solvant précédent.

En effet, si un solvant B contenant 10 ml de butanol élue deux pics d'acides plus ou moins confondus, le solvant précédent A contenant 5 ml de butanol éluerait tôt ou tard les mêmes acides, si son volume était très grand. Si l'on double le volume du solvant A les pics du solvant B sortiront un peu plus tôt qu'ils ne l'auraient fait, et généralement de manière différente pour les différents pics. Ainsi, le très léger décalage

qui existait déjà entre deux pics à demi-confondus, pourra s'en trouver accentué.

On obtient un résultat analogue en suivant le même processus et en intercalant entre les solvants A et B un solvant A' contenant par exemple 7 ml de butanol.

On peut ainsi arriver, en modifiant de différentes manières la séquence de solvants proposés par CARLES, à une solution satisfaisante dans l'isolement de tel ou tel acide Naturellement, chaque cas particulier nécessitera une séquence de solvants appropriée.

Nous avons commencé l'élution au moyen d'un solvant contenant 1 ml de butanol et 39 ml de chloroforme, afin de mieux séparer l'acide mésaconique et l'acide itaconique, ces acides occupant en effet, une place importante dans le métabolisme de l'acide citramalique. Par la suite, nous nous sommes efforcés d'obtenir un meilleur isolement de l'acide citramalique dans les vins et les moûts, afin de parvenir à des estimations quantitatives satisfaisantes ; nous avons mis au point la séquence de solvants suivante :

Butanol (ml)	6	10	10	15	17	20
Chloroforme (ml)	154	70	30	25	23	20

A ces deux séquences de solvants correspondent deux séquences d'acides ; les acides sont bien élués dans le même ordre, mais les courbes ne sont pas exactement superposables.

Cependant, le dosage chromatographique ne saurait prétendre à une rigoureuse précision. En effet, une partie des acides reste définitivement fixée sur la célite. Ce taux de rétention n'est pas le même pour les divers acides organiques et diffère même légèrement d'une colonne à l'autre pour un même acide. Ceci est probablement dû à des irrégularités de tassement de la célite d'une colonne à l'autre quel que soit le soin qu'on puisse y apporter. Pour tenir compte de cette cause d'erreurs en apportant un facteur correctif dans le calcul des teneurs en acides organiques, nous avons déterminé, pour chaque acide, une valeur moyenne du taux de rétention. Bien entendu, l'incertitude sur les dosages, due au fait qu'on ne peut tenir compte que de chiffres moyens, demeure comprise entre 5 et 10 p. 100.

TABLEAU VI

Pourcentage de récupération de divers acides du vin après passage sur la colonne de célite.

Acide lactique	75 p. 100	Acide malique	80 p. 100
Acide succinique	70 p. 100	Acide citrique	95 p. 100
Acide citramalique	90 p. 100	Acide tartrique	75 p. 100
Acide diméthylglycérique	35 p. 100		

Grâce à cette méthode de dosage par chromatographie. nous avons tout d'abord déterminé la teneur moyenne en acide citramalique de quelques vins de la région de Bordeaux Un travail analogue avait d'ailleurs déjà été effectué pour des vins grecs par DIMOTAKI-KOURAKOU. A ces données, nous avons à titre indicatif, joint les chiffres obtenus pour les principaux acides du vin.

TABLEAU VII

Analyse de divers vins de la région bordelaise.

(Dosage par chromatographie sur colonne de célite). Teneurs en g par litre

	N°	Acide citrama-lique	Acide citrique	Acide malique	Acide tartri-que	Acide lactique	Acide succi-nique	Acide diméthyl-glycérique
Vins blancs	1	0,16				0,56	0,31	0,07
	2	0,02	0,13	1,71	2,92	0,36	0,49	0,09
	3	0,27	0,13	0,82	2,19	0,71	0,46	0,10
	4	0,15	0,05	0,85	1,78	0,29	0,45	0,07
	5	0,04	0,07	0,79	1,54	0,88	0,44	0,55
Vins rouges	1	0,06	0,13	0,33	2,22	0,23	0,58	0,14
	2	0,03	0,02	0,22	2,87	0,84	0,29	0,13
	3	0,18	0,32	0,43	3,73	1,76	0,76	0,25
	4	0,01	0,02	0,10	2,46	0,88	0,41	0,04
	5	0.09	0,05	0,12	2,58	1,96	0,66	0,11

III. - FORMATION DE L'ACIDE CITRAMALIQUE PENDANT LA FERMENTATION ALCOOLIQUE.

A. - EXPERIMENTATION.

Pour suivre la formation des acides organiques lors de la fermentation alcoolique, nous avons fait fermenter un moût de raisin par différentes souches de levures, soit dans des conditions d'aération normale, soit en semi-anaérobiose.

Comme LAFON (1956), on peut classer les différentes levures connues en trois groupes métaboliques, suivant la prédominance du type fermentaire ou du type respiratoire dans leur métabolisme ; cette prédominance se traduit par une répartition différente des produits secondaires de la fermentation.

— Métabolisme exclusivement fermentaire, quelle que soit l'aération :

- **Saccharomyces ellipsoideus**
- **Zygosaccharomyces polymorphus**
- **Saccharomycodes ludwigii**
- **Saccharomycodes bisporus**
- **Torulaspora rosei**
- **Torulaspora delbruckii**

— Respiration toujours importante, même en cas d'aération très faible :

- **Torulopsis Meissner**
- **Torulaspora lactis**
- **Hansenula nivea**
- **Hansenula anomala**
- **Hansenula fermentans**

— Métabolisme à prédominance respiratoire ou fermentaire, suivant les conditions d'aérations :

- **Kloeckera apiculata**
- **Kloeckera uvarum**
- **Hanseniaspora**

Nous avons donc choisi des levures dans ces trois groupes, afin de vérifier si la production d'acide citramalique est bien en liaison avec la forme de métabolisme adoptée par la levure (SAI et AMAHA).

— 2 levures du premier groupe :

— **Saccharomyces ellipsoideus,** souche 19 C 1

— **Saccharomycodes ludwigii,** souche 60 XVII

— 1 levure du second groupe :

— **Hansenula anomala,** souche 29 h.

— 1 levure du troisième groupe :

— **Kloeckera apiculata,** souche 8a

Nous avons ajouté une autre levure, **Schizosaccharomyces liquefaciens** souche CBS 1042, qui possède la propriété de cataboliser l'acide malique.

Les essais de fermentation sont réalisés en double exemplaire, le premier dans un récipient fermé par un tampon de coton et le second recevant un bouchon muni d'un barboteur à eau. Ces dispositifs réalisent les conditions d'aérobiose et de semi-anaérobiose.

Le milieu de fermentation est constitué par un moût de raisin blanc, dont voici les caractéristiques :

— degré alcoolique en puissance (°GL) : 10°5

— pH : 2,99

— Acidité totale : 128 milliéquivalents par litre

— Teneur en sucres : 196 g par litre

La fermentation complète du milieu de culture par **Saccharomyces ellipsoideus** dure 11 jours à 25° C. Après ce délai, la fermentation des autres échantillons, très ralentie, est arrêtée par stérilisation. On prélève alors 10 ml de chaque échantillon pour en recueillir les acides, qu'on sépare et qu'on dose alors par chromatographie sur colonne.

B. - RESULTATS

Pour bien situer l'acide citramalique dans l'ensemble d'un métabolisme complexe, nous pensons qu'il est nécessaire d'étudier tous les acides ainsi que d'évaluer leur teneur au cours de la fermentation. C'est

pourquoi nous avons accordé, dans le dépouillement des résultats expérimentaux, une place très grande à la comparaison de l'évolution des acides autres que l'acide citramalique ; parmi les acides séparés mais non encore identifiés par la méthode chromatographique, il y en a trois dont l'évolution est en relation directe avec le type de métabolisme adopté par la levure. Nous avons pu identifier deux de ces acides, l'acide α-céto glutarique et l'acide glycérique.

Voici tout d'abord quelques résultats généraux fournis par cette étude expérimentale :

— 1° Consommation de sucre — Elle est plus importante en présence d'air qu'à l'abri de l'air pour **Saccharomyces ellipsoideus, Saccharomycodes ludwigii** et **Schizosaccharomyces liquefaciens.** Au contact de l'air, une respiration intense des levures vient se superposer au métabolisme fermentatif, c'est un fait déjà bien connu. Par contre, chez **Kloeckera apiculata,** levure peu alcoogène, la consommation de sucre est faible, et pratiquement égale dans les deux conditions d'aération. Chez **Hansenula anomala**, elle est pratiquement nulle dans les deux cas.

— 2° Evolution des acides organiques — Dans le cas des acides lactique, diméthylglycérique et citramalique on ne peut établir de relation générale entre la quantité d'acide présente après fermentation d'une part, et les conditions d'aérobiose ou d'anaérobiose d'autre part.

L'acide lactique est formé par les levures, au cours de la fermentation alcoolique. Dans la présente étude de fermentation, il s'en est formé des quantités très variables (de 0 à 13 milliéquivalents par litre).

L'acide succinique est aussi formé au cours de la fermentation nous en avons trouvé également des quantités très variables (0 à 29 milliéquivalents par litre). La moyenne générale est plus élevée que dans le cas de l'acide lactique. Dans l'ensemble, sa teneur est de 2 à 7 fois plus importante en aérobiose qu'en anaérobiose, sauf dans le cas de **Hansenula anomala,** où il n'existe pas de différence significative.

Selon nos observations, l'acide diméthylglycérique existe dans le moût, avant toute fermentation. Selon CARLES et **al.** (1967), l'acide diméthylglycérique apparaît au cours de la fermentation alcoolique, comme l'acide citramalique. Or, nous avons trouvé dans un moût de raisin blanc une quantité importante d'acide diméthylglycérique (3,9 milliéquivalents par litre, soit 520 mg par litre). Dans toutes les expériences réalisées à partir du même moût, nous avons toujours trouvé, après fermentation,

une quantité d'acide nettement inférieure à ce chiffre. Une telle concordance exclue l'idée d'une erreur d'expérience. La variation de la teneur en acide diméthylglycérique au cours des différentes conditions expérimentales de fermentation, ne serait pas imputable à une plus ou moins grande synthèse d'acide diméthylglycérique, comme l'affirment CARLES et **al.** Cette variation nous semble plutôt due, à une utilisation plus ou moins importante de cet acide par le métabolisme des levures, en vue de diverses synthèses. L'acide diméthylglycérique présent dans le moût provient vraisemblablement du métabolisme soit de la vigne, soit de la baie de raisin. Ce point serait certainement intéressant à étudier dans l'avenir, en liaison avec les travaux déjà effectués sur la biosynthèse des acides organiques chez **Vitis vinifera** (RIBÉREAU-GAYON, 1966).

Lors des expériences de fermentation citées plus haut, nous avons trouvé des teneurs très variables en acide diméthylglycérique (de 0 à 3 milliéquivalents par litre). La diminution du taux de cet acide au cours de la fermentation est comprise entre 20 et 70 p. 100 de la quantité initiale présente dans le moût, et atteint même parfois 100 p. 100.

L'acide citramalique, comme CARLES et DIMOTAKI-KOURAKOU l'ont démontré, est synthétisé par les levures à partir des sucres, au cours de la fermentation alcoolique. Les quantités trouvées sont également très variables (0 à 2,6 milliéquivalents par litre).

L'acide malique, l'acide citrique et l'acide tartrique préexistent dans le moût et proviennent du métabolisme de la vigne.

L'acide malique est dégradé par **Schizosaccharomyces liquefaciens,** fait connu depuis quelques années. Nous avons noté que cette dégradation est un peu plus importante en présence d'air (97 p. 100) qu'en l'absence d'air (92 p. 100). Nous avons également constaté que toutes les autres levures manifestaient un phénomène analogue, beaucoup plus faible mais non négligeable. La diminution du taux de l'acide malique est en effet, dans les cas considérés, de l'ordre de 30 p. 100 en moyenne. L'acide malique serait donc toujours repris dans le métabolisme des levures au cours de la fermentation alcoolique, mais ce phénomène n'aurait qu'une ampleur assez limitée.

Dans l'ensemble le taux de l'acide citrique reste inchangé.

Cependant, chez **Saccharomyces ellipsoideus** et **Hansenula anomala** en aérobiose d'une part, et chez **Kloeckera apiculata** en anaérobiose d'autre part, sa teneur est doublée. Il y aurait donc, dans ces cas précis, synthèse

d'acide citrique par les levures. En général le taux de l'acide tartrique ne change pas au cours de la fermentation. Cependant, nous avons noté une diminution de 40 p. 100 du taux de cet acide chez **Saccharomyces ellipsoideus** et **Saccharomycodes ludwigii** en anaérobiose, et au contraire, une augmentation de 52 p. 100 chez **Schizosaccharomyces liquefaciens** en aérobiose.

Trois acides, retrouvés de façon constante nous ont semblé intéressants à divers points de vue ; nous en avons identifié deux : l'acide α-cétoglutarique et l'acide glycérique. L'acide α-cétoglutarique est présent dans le moût, et sa teneur diminue au cours de la fermentation de 18 p. 100 à 90 p. 100. Sur les courbes d'élution, il se trouve immédiatement après l'acide succinique. Un second acide non identifié et appelé l'acide X, est également présent dans le moût, en quantité importante et diminue fortement pendant la fermentation alcoolique (de 46 p. 100 à 100 p. 100) ; il se place immédiatement après l'acide diméthylglycérique. Quant à l'acide glycérique, il n'existe pas dans le moût ; il est synthétisé par les levures au cours de la fermentation, sa teneur varie de 0 à 2,8 milliéquivalents par litre ; sur les chromatogrammes il se trouve entre l'acide citrique et l'acide tartrique. Ces trois acides ont été repérés non seulement au cours des expériences de fermentation, mais également dans les divers vins.

— 3° Relations des acides organiques entre eux — Dans le premier groupe métabolique de LAFON **(Saccharomyces ellipsoideus** et **Saccharomycodes ludwigii),** l'acide succinique, l'acide citramalique et l'acide glycérique sont formés plus abondamment en aérobiose.

L'acide malique, l'acide diméthylglycérique et l'acide α-cétoglutarique sont métabolisés plus fortement en anaérobiose, alors que l'acide X l'est beaucoup plus en aérobiose.

Dans le deuxième groupe **(Hansenula anomala)**, la synthèse de l'acide succinique et la dégradation de l'acide diméthylglycérique sont identiques en aérobiose et en anaérobiose. La synthèse de l'acide citramalique et de l'acide glycérique est plus forte en aérobiose. L'acide malique et l'acide X sont métabolisés plus fortement en anaérobiose, alors que la dégradation de l'acide α-cétoglutarique atteint son maximum en aérobiose.

Dans le troisième groupe **(Kloeckera apiculata),** la synthèse de l'acide citramalique et de l'acide glycérique est plus abondante en anaérobiose, alors que celle de l'acide succinique est plus forte en anérobiose.

TABLEAU VIII

Résultats des expériences de fermentation d'un moût de raisin blanc par diverses levures en aérobiose et semi-anaérobiose.

LEVURE	Conditions d'aération	Sucre fermenté g par litre	Acide lactique meq par litre	Acide succinique meq par litre	Acide α-cétoglutarique meq par litre	Acide diméthylglycérique meq par litre	Acide X meq par litre	Acide citramalique meq par litre	Acide malique meq par litre	Acide citrique meq par litre	Acide glycérique meq par litre	Acide tartrique meq par litre
Témoin		0	0	0	1,7	3,9	3,2	0	99,5	2,4	0	116,0
Saccharomyces ellipsoideus	avec aération	181	13,2	6,4	1,4	3,1	0	1,6	78,5	4,2	1,8	117,0
	sans aération	130	0	0	0,8	0	0,4	0,1	68,1	2,6	0,5	61,0
Saccharomycodes ludwigii	avec aération	162	1,0	29,2	0,3	1,4	0	0,5	61,0	2,7	1,2	107,0
	sans aération	26	3,8	7,6	0,2	0	0	0	57,7	2,0	0,4	79,0
Hansenula anomala	avec aération	1	0,5	4,9	0,2	1,2	1,7	2,6	80,8	4,4	1,0	112,0
	sans aération	2	2,0	5,7	1,2	1,3	0,4	0,8	72,8	3,0	0	113,0
Kloeckera apiculata	avec aération	26	1,6	9,1	1,0	1,1	0	0,7	74,1	3,0	2,0	120,0
	sans aération	26	1,6	5,0	0,5	2,8	0,2	0,9	74,9	4,9	2,8	123,0
Schizosaccharomyces liquefaciens	avec aération	125	2,1	18,2	0,6	0	0	0	2,6	2,3	0,9	175,0
	sans aération	47	4,4	2,7	0,3	2,0	0,1	1,2	7,3	3,1	1,2	113,0

La dégradation de l'acide diméthylglycérique et de l'acide X est bien plus forte en aérobiose, tandis que celle de l'acide α-cétoglutarique est plus importante en anaérobiose. L'acide malique est métabolisé de la même manière dans les deux conditions.

En ce qui concerne les essais de fermentation réalisés avec **Schizosaccharomyces liquefaciens,** l'acide citramalique, et l'acide glycérique sont formés plus abondamment en anaérobiose, tandis que la synthèse de l'acide succinique est plus importante en aérobiose. L'acide malique, l'acide diméthylglycérique et l'acide X sont dégradés plus fortement en aérobiose, alors que la dégradation de l'acide α-cétoglutarique est plus forte en anaérobiose.

Ces résultats tendent à rapprocher **Schizosaccharomyces liquefaciens** des levures du troisième groupe.

Il est difficile de tirer une règle générale de résultats aussi divers Toutefois, on peut remarquer que chez toutes les levures, il semble exister un équilibre entre la dégradation des acides X et α-cétoglutarique ; en effet, pour une donnée, si la dégradation maximale de l'acide α-cétoglutarique se produit en aérobiose, celle de l'acide X a lieu en anaérobiose, et réciproquement. On peut parler d'équilibre, car si pour une même levure, respectivement en aérobiose et en anaérobiose, on fait la somme des acides X et α-cétoglutarique, les différences qu'on peut trouver entre les deux sommes sont de l'ordre des erreurs de mesure. Cet équilibre, déplacé dans un sens ou dans l'autre par l'intensité du métabolisme respiratoire de la levure, peut être rapproché de celui découvert par TALIEU-ROUSSEAU (1967) en relation avec la source d'azote et la source de carbone fournies à **Saccharomyces ellipsoideus.**

A partir des résultats précédents, nous avons pu noter en outre que l'acide citramalique et l'acide glycérique, pour une levure donnée évoluent toujours dans le même sens ; si le maximum de la synthèse de l'acide citramalique se produit en aérobiose, il en va de même pour l'acide glycérique et réciproquement.

CONCLUSION

Avant d'étudier la répartition et la formation de l'acide citramalique dans le vin, nous avons d'abord été amené à faire une mise au point des divers travaux déjà effectués sur cet acide. Cette étude préliminaire a non seulement fourni une idée directrice à nos recherches mais également permis de mettre en évidence l'universalité de l'acide citramalique

en tant qu'intermédiaire normal du métabolisme de la matière vivante. Ce corps se rencontre également couramment dans le règne végétal comme dans le règne animal.

Pour doser l'acide citramalique, nous avons utilisé la chromatographie de partage sur colonne de célite 535. Cette méthode mise au point par CARLES et **al.** (1966) pouvait déjà donner satisfaction dans une étude semi-quantitative. Nous l'avons améliorée, en ce qui concerne la séparation de certains acides, et nous en avons étudié la reproductibilité et la précision ; ceci a permis d'en fixer les possibilités et les limites. En particulier nous avons déterminé le pourcentage moyen de récupération, pour chacun des acides les plus importants du vin ; celui-ci est différent pour chaque acide, et entraîne l'utilisation, pour l'analyse quantitative, d'un facteur correctif qui, appliqué au calcul de la quantité d'un acide d'après la surface du « pic » chromatographie correspondant, permet de connaître sa teneur avec une précision assez satisfaisante. Bien que ne possédant pas, par exemple, la précision des méthodes de dosage enzymatiques, cette technique offre l'avantage de doser en même temps la majeure partie des acides du vin, et de permettre une comparaison de leurs teneurs.

Nous avons déterminé grâce à cette technique les teneurs moyennes en acide citramalique dans divers vins, rouges et blancs. Nous avons ensuite étudié la formation de cet acide par différentes levures, choisies pour leurs caractéristiques métaboliques, dans diverses conditions de fermentation.

Les résultats de cette expérimentation sont complexes ; il est difficile d'en tirer des conclusions générales ; cependant, nous avons noté des corrélations assez étroites entre l'acide citramalique et l'acide glycérique, tous deux synthétisés par les levures. En outre, il a été constaté que l'acide diméthylglycérique, contrairement à certaines affirmations n'est pas synthétisé par les levures, mais préexiste dans le moût. En ce qui concerne l'acide X, il n'a pas pu être identifié, de façon certaine ; il ne s'agit ni de l'acide fumarique, ni de l'acide glyoxylique, ni de l'acide aconitique.

Ce travail constitue une modeste contribution à l'expérimentation qui permettra, un jour prochain, d'expliquer totalement la formation de l'acide citramalique ainsi que le métabolisme des autres acides encore peu connus qui sont présents dans le vin.

BIBLIOGRAPHIE

BARKER H.A., Fermentation of nitrogenous organic compounds, in GUNSALUS J.C. et STANIER R.Y., **The bacteria,** Academic Press, New-York, 1961, **2,** 151-207.

BLOUIN J., Contribution à l'étude des combinaisons de l'anhydride sulfureux dans les moûts et les vins, Thèse docteur-ingénieur, Bordeaux.

CARLES J., LAMAZOU BETBEDER H. et PECH R., Existe-t-il une fermentation citramalique dans le vin ?, **C.R. Acad. Sci.,** 1958, **246,** 2160-2162.

CARLES Y. et ALQUIER BOUFFARD A., De quelques perfectionnements pour la chromatographie sur colonne des acides organiques, **Bull. Soc. Chim. Biol.,** 1965, **47,** 7, 1519-1521.

CARLES J., LAYOLE J. et LATTES A., Un nouvel acide organique du vin, l'acide diméthylgycérique. **C.R. Acad. Sci.,** 1966, **262,** 2788-2790.

CARLES J., TALIEU-ROUSSEAU M. et MONTANT C., Contribution à l'étude des acides organiques de fermentation, **C.R. Acad. Sci.,** 1967, **265,** E, 1183-1186.

DIMOTAKI-KOURAKOU V. (a), Présence de l'acide α-méthylmalique dans les vins, **C.R. Acad. Sci.,** 1962, **254,** 4030-4031.

DIMOTAKI-KOURAKOU V. (b), La présence de l'acide α-méthylmalique dans les vins, **Ann. Fraudes Exp. Chim.,** 1962, **55,** 149-158.

DUBUS G., Contribution à l'étude de l'acide citramalique dans les vins, **Thèse 3^e^ cycle**, Bordeaux 1969.

GENEVOIS L., Les équations de la fermentation alcoolique, **Ind. Agr. Alim.,** 1949, **66,** 329-335.

HULME A.C., The isolation of citramalic acid from the peel of the apple fruit, **Bioch. Bioph. Acta,** 1954, **14,** 36-43.

HULME A.C. et WOOLTORTON L.S.C., Determination and isolation of the non-volatile acids, and a study of acid changes in apples during storage, **J. Sci. Food. Agr.,** 1958, **9,** 150-158.

INIGO B. et BRAVO ABAD F., Nueva susbtancia de caracter acido en fermentados de mosto por distintas levaduras, **Rev. Esp. Fisiol.**

JOLCHINE G., Le métabolisme de l'acide acétique dans les feuilles des **Bryophyllum daigremontianum** Berger, **Bull. Soc. Chim. Biol.,** 1962, **44,** 337-364.

KESNER L. et MUNTWYLER E., Automatic determination of weak organic acids by partition column chromatography and indicator titration, **Anal. Chem.,** 1966, 38, **9,** 1164-1168.

LAFON M., Contribution à l'étude de la formation des produits secondaires de la fermentation alcoolique, **Thèse Doct. Sci.,** Bordeaux 1956.

LIORET C., Quelques aspects du métabolisme des acides aminés chez les tissus de crown-gall de scorsonère, cultivés in vitro, **Bull. Soc. Fr. Physiol. Véb.,** 1963, **9,** 3, 113-121.

LOUME C., Etude chromatographique des acides polycarboxyliques produits par les levures du genre **Saccharomyces, DES,** Bordeaux 1967.

PEYNAUD E., Contribution à l'étude de la maturation du raisin et de la composition des vins, **Thèse docteur-ingénieur,** Bordeaux 1946.

RACHAVENDRA RAO M.R., SUBRAMANIAN S.A., RAHATEKAR H.I., et PARUJAPE S.V., Enzymatic hydration of citraconate to (—) citramalate, **Bioch. Bioph. Res. Conn.,** 1963, **12,** 1, 78-82.

RIBÉREAU-GAYON G., Etude du métabolisme des glucides, des acides organiques et des acides aminés chez **Vitis vinifera L.,** Thèse **Doct. Sci.,** Bordeaux 1966.

SAI T. et AMAHA M., Studies on (—) citramalic acid formation by respiration-deficient yeasts mutants II : citramalic acid formation and a variety of respiration-deficient strains of brewer's, baker's, and wine yeasts, **J. Gen. Appl. Microb., Tokyo,** 1967, **13,** 15-23.

TADENUMA M., KATO Y. et MUTO H., Studies on the organic acids in saké I : on the existence of α-hydroxyglutaric acid, citramalic acid and adipic acid in saké, **Y. Soc. Brew., Japan,** 1966, **61,** 75-80.

TALLIEU-ROUSSEAU M., **Thèse 3e cycle,** Toulouse 1967.

VITAGLIANO M. et MURA G., L'influenza di alcuni fattori tecnologici sul tenore di acido metilmalico nel vino, **Ital. Vin. Agr.,** 1966, **6,** 195-200.