

Zeitschrift: Bulletin de la Société botanique de Genève
Herausgeber: Société botanique de Genève
Band: 35 (1943)

Artikel: Le sort de l'acide sulfureux dans les liquides fermentescibles et l'intoxication sulfureuse
Autor: Hutter, Suzanne
DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-1099461>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. [Mehr erfahren](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. [En savoir plus](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. [Find out more](#)

Download PDF: 18.04.2026

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

Le sort
de l'acide sulfureux dans les liquides fermentescibles
et l'intoxication sulfureuse

par
Suzanne HUTTER

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Le problème de l'acide sulfureux, si souvent discuté depuis que la pratique du bisulfitage a été introduite en œnologie, présente cependant quelques points bien obscurs.

Nous avons été frappé du peu de renseignements précis qu'offre la littérature, pourtant abondante, à propos de l'action de cet antiseptique sur la levure et sur son métabolisme fermentaire. Ceci vient probablement du fait que l'on n'est pas encore au clair quant au mode de disparition de l'acide sulfureux dans un milieu. Nous avons tenté d'éclaircir ces deux points par les deux parties de notre travail.

A notre connaissance, aucune étude à ce sujet n'a été entreprise depuis l'établissement des théories et techniques nouvelles de la fermentation alcoolique. La littérature, riche surtout entre 1900 et 1920, au moment des campagnes pour l'introduction de la pratique de l'acide sulfureux en œnologie, se borne à mentionner les effets de l'acide sulfureux sur la marche de la fermentation telle que l'observe tout bon viticulteur.

Le contrôle de l'acide sulfureux nécessité par les décrets réglementant son usage, a cependant précisé son évolution

dans le milieu fermenté : sa disparition, sa combinaison, sans expliquer le mécanisme de ces phénomènes d'une manière très précise et très satisfaisante.

Nous avons réuni dans ce travail les diverses données de la littérature et nos propres observations et résultats. Nous avons divisé le problème en deux parties : le sort de l'acide sulfureux dans les liquides fermentescibles, sans nous soucier de son action sur la levure et la fermentation, et l'intoxication sulfureuse, considérant ici la levure et la fermentation.

Nous avons joint à cette introduction un aperçu des pratiques techniques de l'acide sulfureux, un résumé des propriétés physico-chimiques de cet acide sulfureux, les méthodes analytiques que nous avons utilisées au cours de nos recherches et la terminologie employée qui nous a aidé à différencier les problèmes.

I. — APERÇU DES USAGES DE L'ACIDE SULFUREUX EN ŒNOLOGIE

On fait remonter à la plus haute antiquité l'emploi de l'acide sulfureux, produit par la combustion du soufre, pour muter les vins et aseptiser les futailles. Mais on n'a réellement commencé à l'utiliser rationnellement que depuis 1900. A cette époque, les vigneron et les négociants qui se contentaient de mèche leurs fûts pour souffrir ou muter leur vin, se sont mis à employer l'acide sulfureux liquide et les bisulfites. La question de l'acide sulfureux et de ses usages en œnologie est devenue une des questions qui ont le plus provoqué de recherches, de réglementations et même de difficultés dans les transactions commerciales, depuis l'application des lois de répression des fraudes des vins en France. En effet, pour enrayer un abus fâcheux de cet acide sulfureux, il a été nécessaire de publier des décrets :

En France, le décret du 3 septembre 1907, modifié par celui du 6 novembre 1913, a fixé la teneur maxima comme suit :

vins	}	Ac. sulfureux libre	par litre	100 mgr.	}	avec une tolérance de 10%.	
		»	combiné	»			350 mgr.
		»	total	»			450 mgr.
cidres	}	»	total	»	}	de 10%.	
bières		»	total	»			100 mgr.

En Suisse art. 345 :

« Les vins soufrés (brantés) ne doivent pas contenir plus de 400 mg. d'acide sulfureux total, ni plus de 40 mg. d'acide sulfureux libre /l. Pour les vins fins doux naturels, la teneur en acide sulfureux peut atteindre 450 mg./l. dont 100 mg. au plus d'acide sulfureux libre ».

Dans la vinification, l'anhydride sulfureux pur réalise par son action antiseptique une véritable sélection, un assainissement complet des ferments en supprimant les levures sauvages, les bactéries et les moisissures : le moût ainsi épuré donne un vin plus fin, d'un degré alcoolique plus élevé, de meilleure tenue. Son rôle se rapproche de celui que joue pour des résultats analogues la filtration, la réfrigération, la pasteurisation :

Assainissement des vendanges pourries, mildiousées, cochylisées,

Amélioration des levures et des fermentations,

Débourbage, mutage et stérilisation des moûts,

Préservation contre les casses oxydasiques, la maderisation, le jaunissement, les mauvais goûts, les altérations microbiennes,

Suppression de l'ascendance et des fermentations anormales,

Augmentation effective du degré alcoolique des vins,

Enrichissement et fixation de la couleur des vins rouges,

Régularisation des fermentations dans les pays chauds (d'après Pictet).

En dehors de son action stérilisante de la vaisselle de vendange (méchage des fûts), l'acide sulfureux est surtout utilisé pour faciliter le débouillage. Lorsqu'on abandonne du moût à lui-même, il se défèque rapidement. Les matières inertes, la terre, tombent au fond du récipient, suivies bientôt

des débris de pellicules, de rafles. Il est facile alors de soutirer ou de siphoner le jus clair que l'on sépare des grosses lies. Le temps nécessaire à ce dépotage est de 6 à 24 heures suivant la température et les moûts, cependant il faut beaucoup plus de temps si la vendange est avariée. On retarde dans ce cas le départ de la fermentation par un soufrage ou bisulfitage léger. (2 gr. de soufre brûlé ou 8-10 gr. de bisulfite par hl.)

Lors d'un transport de moût, le mutage par une grande dose de SO₂ est nécessaire. Le mutage est surtout important pour la vinification dans les pays chauds, afin d'éviter une augmentation de température qui nécessiterait des refroidissements plus difficilement réalisables. On procède alors à plusieurs soufrages et soutirages successifs.

Le collage, autre pratique très ancienne, est surtout employé pour clarifier les vins, c'est-à-dire pour leur donner la limpidité et le brillant recherchés des consommateurs. Plusieurs causes gênent le collage naturel : les différentes races de levures qui travaillent ont un pouvoir clarifiant très différent : les unes tombent rapidement, d'autres restent en suspension dans le liquide et le laissent laiteux. Les bacilles des maladies des vins : graisse, tourne (petits bâtonnets), restent quelquefois en suspension, se dérobent au collage même artificiel (gélatine, fibrine du sang, caséine, etc.), se multiplient et, producteurs de CO₂, gênent la clarification. Un fort méchage est ici nécessaire pour arrêter leur développement et permet au collage naturel de se poursuivre en les entraînant dans les lies. Il suffit de faire un soutirage pour les séparer du vin avant que l'action du SO₂ ait cessé et leur ait permis de se développer à nouveau.

L'acide sulfureux est également utilisé dans la fabrication de vins spéciaux : vins liquoreux de raisins botrytisés « Sauternes », « Vins du Rhin » dont la fermentation doit se dérouler pendant des années. La clarification très longue est assurée par des soutirages fréquents dans des fûts légèrement méchés. La mise en bouteilles se fait en chargeant ces dernières de gaz SO₂ que chasse le vin en les remplissant, car ces vins

chargés d'oxydases brunissent à l'air sans cette précaution.

Pour la fabrication des vins fermentant en bouteilles « Mousseux de Saumur », de « Die », de « Limoux », d'« Asti », on combine des méchages légers et des soutirages pour ralentir la fermentation de ces vins clarifiés par la gélatine. Plusieurs tentatives de fermentation épuisent ainsi le vin en ses éléments propres au développement des levures, et la mise en bouteilles peut être opérée.

On utilise encore l'acide sulfureux pour la décoloration des vins. Cependant l'action du SO_2 étant très temporaire en raison de sa disparition, ce procédé n'est pas très apprécié. Il faudrait alors réintroduire constamment des doses nouvelles de SO_2 et les limites légales seraient trop rapidement dépassées.

Pour cette même raison on a plutôt abandonné l'utilisation du SO_2 pour lutter contre l'action de la diastase oxydante, déterminant la casse brune des vins.

II. — PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES DU SO_2

Nous nous proposons de rassembler sous ce paragraphe les principales propriétés de l'acide et de l'anhydride sulfureux, en ne retenant cependant que celles qui pourraient avoir un intérêt et un rapport avec nos recherches d'ordre biologique. Nous nous excusons donc d'énumérer brièvement et même de passer sous silence les réactions purement chimiques qui ne sauraient avoir une signification pour notre travail.

L'anhydride sulfureux est un gaz qu'on trouve dans les émanations gazeuses des volcans et l'acide sulfureux se trouve dans les eaux de source qui coulent à leur voisinage. L'odeur de l'anhydride montre qu'il se forme par combustion du soufre.

Libatius l'a décrit le premier. Priestley le recueillit à l'état pur sur du mercure. Lavoisier dès 1775 en détermine la composition.

1. Propriétés physiques de l'anhydride sulfureux

a) **Gaz.**

Dans les conditions normales, c'est un gaz incolore à odeur caractéristique et suffocante.

<i>Densité</i>	à 0° sous 760	mm. de 2,9266 à 2,92675
	» 570	mm. 2,1789
	» 518,2	mm. 1,9802
	» 370	mm. 1,4456
	» 311,3	mm. 1,1820

(d'après Jacquerot et Pintza Baume, Scheuer, Guye).

Coefficient de compressibilité

à 0° entre 0 et 1 atm. : 0,02379 (Guye)

à 0° 0,004233 à 200° 0,003695

à 100° 0,003757 à 250° 0,003685

(Amagat et Roth)

Poids moléculaire d'après Wourtzzel en tenant compte de toutes les corrections : 64,059.

Aspect : liquide incolore, se solidifie vers —75° en donnant des cristaux fondant à —72,7°.

Constantes critiques d'après Pickering :

$t_c = 157,2^\circ$; $p_c = 77,7$ atm. ; $d_c = 0,52$

d'après Cardoso et ses élèves :

$t_c = 157,5 \pm 0,05^\circ$; $p_c = 77,79 \pm 0,05$ atm.

$d_c = 0,5240 \pm 0,0005$

Chaleur spécifique mesurée par Regnault et Thibaut sous pression constante entre 16° et 200° et sous volume constant par Pier.

Détermination récente de Partington en Cant à 13,2° :

$$\begin{array}{l} C_p = 9,47 \\ C_v = 7,34 \end{array} \quad \frac{C_p}{C_v} = 1,290$$

Conductibilité calorifique (C.G.S.) $195 \cdot 10^{-7}$ (Encken).

Solubilité dans l'eau : L'anhydride sulfureux est soluble dans l'eau avec formation de combinaisons dissociables en acide et hydrate.

En conséquence, cette solubilité ne suit pas à froid la loi de Henry, mais au-dessus de 50° la proportion combinée semblant diminuer, on peut (chose contestée) admettre pratiquement que cette loi est satisfaite. (Fulda)

Eau à pression normale : tables de Carius (C)

» de Schœnfeld (S)

» de Roozeboom (R)

Temp. °C.	Solubilité en volume		Solubilité en poids	
	C.	S.	S.	R.
0°	68,861	79,79	0,2283	0,236
2°	65,169	77,69	0,2197	0,218
4°	61,576	69,78	0,1998	0,201
10°	51,383	56,65	0,1621	0,154
12°	48,182	52,723	0,1511	0,154
15°	43,564	47,28	0,1354	0,125
18°	39,165	43,29	0,1214	0,125
20°	36,206	39,37	0,1129	0,104
25°	30,766	32,76	0,0941	»
30°	26,788	27,18	0,0787	»
35°	21,234	22,49	0,0646	»
40°	17,03	18,79	0,0541	»

Densité de la solution aqueuse :

Bunsen et Schœnfeld : valeurs trop faibles.

Valeurs de Roozeboom :

Temp.	SO ₂ pr. 1 gr. H ₂ O	Densité
0°	0,236	1,099
5°	0,193	1,076
10°	0,154	1,065
15°	0,125	1,057
20°	0,104	1,041
0°	0,104 (non saturée)	1,046

Chaleur de dissolution : Thomsen, Stiles, Felsing : Chaleur totale moléculaire à 25° en calories :

$$-\Delta H = 4911,6 + 1105,2 \log_{10} N$$

Solubilité dans les solutions salines ou acides : Mesurée dans des solutions salines, en particulier pour le sulfate de Na (Fox ; Hudson).

Passé par un maximum net pour une concentration d'autant plus grande du sel que la température est plus élevée. Soluble dans l'acide sulfurique. (Miles ; Fenton.)

Solubilité dans les composés organiques : Soluble dans un grand nombre de composés organiques. Le camphre se liquéfie au contact de l'anhydride et en absorbe 308 volumes ; l'acide acétique 318 volumes et le chlorure de sulfuryle 187 volumes.

Par litre, le benzène dissout 127,5 gr. à 30°, 34 gr. à 60° ; le nitrobenzène dissout 311,4 gr. à 15°, 78,6 gr. à 60° ; le toluène dissout 217,5 gr. à 20°, 54,1 gr. à 60° ; l'anhydride acétique dissout 196 gr. à 5°, 90 gr. à 30°.

Pour l'alcool, détermination de Carius et Bunsen :

Temp. °C.	Volume (SO ₂) par volume d'alcool	
	C.	B.
0°	216,4	328,6
2°	199,3	295,9
4°	183,3	265,8
10°	142,2	190,3
15°	115,8	144,5
18°	103,3	124,6
20°	96,44	114,5
25°	84,20	98,81

La solubilité de l'anhydride sulfureux est également grande dans les corps gras, les carbures non saturés ou aromatiques.

(On a remarqué que la solution dans l'acétone constitue un dissolvant comparable à l'anhydride sulfureux liquide.)

Adsorption : L'anhydride sulfureux est fortement adsorbé par un charbon plus ou moins activé : un gramme peut en retenir jusqu'à 288 cm³. Entre 80° et 100°, il y a également adsorption par la silice gélatineuse un peu humide (7% eau), elle est réversible si l'air est exclu.

Action de la lumière : Le gaz et la solution sulfureuse ont sensiblement le même spectre d'adsorption ultra-violet caractérisé par une bande vers $\lambda = 276\mu\mu$ (Stubbs).

Les solutions de sulfites ont un spectre différent ; bande vers $\lambda = 257\mu\mu$ pour les sels acides.

On admet que la bande vers $276\mu\mu$ est due à un hydrate sulfureux très absorbant comme le complexe alcoolique alors que l'acide sulfureux et ses ions absorbent peu. La bande $257\mu\mu =$ métabisulfite en vieillissant à l'air $= 276\mu\mu$: oxydation donnant naissance à SO_4H_2 en libérant SO_2 .

Sous l'influence des radiations violettes, on a la réaction suivante :



probablement avec formation préliminaire de S et d'O actif (Berthelot-Gaudechon).

La lumière la plus active $= 313\mu\mu$. (elle correspond à une bande d'absorption de l'anhydride).

L'acide oxalique en solution favorise la dissolution par la lumière. La solution aqueuse se décompose en donnant du soufre.

b) Anhydride sulfureux liquide.

Propriétés thermiques :

<i>Densité</i>	<i>Fluidité</i>	<i>Temp.</i>
1,4613	233,4	$-10,5^\circ$
1,4350	254,1	$0,1^\circ$

(Fitzgerald)

Tension de vapeur

étudiée entre -25° et 65° : 3,2 atm. à 20°
20 atm. à 65°

Il est donc facile de conserver le gaz sulfureux liquide en vase clos à la température ordinaire (d'après Regnault).

Poids spécifiques des phases vapeurs et liquides : elles ont été déterminées jusqu'au point critique.

Coefficient de dilatation cubique :

0,00170 entre —50° et 0°

0,00215 » 0° et 50°

0,00335 » 50° et 100°

(Lange-Cardoso).

Chaleur latente moléculaire de vaporisation :

5880 c. à 0° (Chappuis)

6110 c. à —11,16° (Estreicher et Schnerr).

Coefficient de compressibilité :

0,0000314 à —14° et 606 atm. (Cailletat).

Chaleur spécifique entre 20° et 155,5° :

$$m = 0,31712 + 0,0003507 t - 0,000006762 t^2 \quad (t = ^\circ\text{C})$$

(Mathias).

Pouvoir solvant du liquide : C'est un solvant d'intérêt industriel. Il dissout peu l'eau et moins à chaud qu'à froid (0,2 à 0,45%). Il est miscible avec H₂SO₄, les solvants organiques des graisses (sulfure de C, chloroforme, éther). Il dissout également les composés minéraux surtout du type halogène : ac. bromhydrique, halogènes (Br.) et les sels d'halogènes : chlorure de C, de Si, de Sb, de St, les métaux alcalino-terreux et le mercure.

Conductibilité : L'anhydride sulfureux liquide est légèrement conducteur de l'électricité : à 0° le coeff. de conduct. = 0,9.10⁻⁷. Certains sels peuvent fonctionner comme électrolytes dans ce milieu (Walden et Centnerzwer).

2. Propriétés chimiques de l'anhydride sulfureux

a) Gaz.

Le SO₂ sec ne rougit pas le tournesol. A plus haute température il se décompose en S et H₂SO₄. (Deville).

Le degré de dissociation n'est pas grand et semble inférieur à celui de l'eau et du CO₂. L'étincelle carbonique produit la même dissociation (Berthelot).

SO₂ est oxydant et sulfurant vis-à-vis des métaux alcalins, de Pb, de Cu, de Zn, de Fe (en métallurgie : naissance

de sulfures et des oxydes au contact des fumées sulfureuses des fours).

L'oxygène en présence de catalyseurs transforme réversiblement le gaz sulfureux en anhydride sulfurique.

b) **Solution sulfureuse.**

Acidité : SO_3H_2 possède deux hydrogènes acides et donne des sels acides : SO_3MH ; des sels neutres : SO_3M_2 . Les deux acidités sont différentes et leurs constantes d'équilibre K_1 et K_2 sont, d'après les équations :



$$K_1 = 0,0174 \text{ à } 25^\circ \text{ (Kerp- Baur)}$$

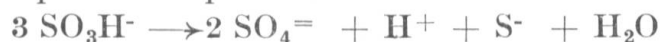
$$K_2 = 1.10^{-7} \text{ à } 15^\circ \text{ (Kolthoff).}$$

Par cryoscopie, Drucker détermine :

$$K_1 = 0,0164.$$

Dans une solution de sulfite acide de Na, la concentration des ions $\text{H}^+ = 3,3. 10^{-5}$, d'où le $\text{pH} = 5$, c'est donc un acide faible.

Stabilité : La décomposition des solutions aqueuses de SO_3H_2 et des sulfites a été étudiée par Yungfleisch et Brunel, puis plus complètement par Fœrster et ses élèves :



Bennet écrit :



L'étude cinétique montre que les ions H^+ gênent la réaction, tandis que le soufre et surtout le sélénium seraient catalyseurs ; il en résulte une décomposition plus rapide dans une solution de sulfites acides de pH plus élevé que dans une solution d'acide sulfureux.

Le mécanisme de la réaction se fait probablement par deux condensations sur les oxydrylès de l'acide sulfureux OS(OH)_2 , par l'intermédiaire du trithionate $\text{S(SO}_3\text{M)}_2$ qui se décompose dans ce milieu à pH bas (par formation parallèle de sulfates acides), en donnant :



la réaction est auto-catalytique. Le soufre et le sélénium tendent à donner avec le sulfite du thiosulfate et du séléniothiosulfate qui accélèrent la réaction. Le ion H⁺ qui provoque la décomposition du thiosulfate, la ralentit. Hagglund a remarqué que 2% de glucose (ou aldose) accélèrent la transformation à 135° d'une solution de sulfite acide.

En milieu très acide et très chaud (H₂SO₄ à 60-70%), le sulfite acide se décompose en donnant le sous-oxyde SO ou ses dérivés (Bennett).

Actions réductrices : Les solutions de l'acide et de ses sels s'oxydent directement par l'oxygène en donnant des composés sulfuriques.

Il existe des catalyseurs positifs ou négatifs pour cette réaction.

Les catalyseurs positifs sont :
 le chlore activé par la lumière visible (Weigert),
 l'hydrate ferrique,
 le carbonate, le sulfate et sulfite de Ca (Lonza),
 l'oxalate d'Al, et surtout
 les sels de Cu, de Co, de Ni et de cérium (Milbauer et Pazourek)
 La catalyse positive des ions métalliques Cu, Fe, Ni, Co a été étudiée par Reinders et Vles. Le pH dans la solution aurait beaucoup d'importance : à un pH plus petit que 3, la vitesse d'oxydation est lente. La catalyse par Cu et Fe se fait aux pH 4 et 12 avec un maximum, celle par Ni et Co en pH alcalin.

Les catalyseurs négatifs sont le chlorure stanneux (Berl), le sucre ± interverti, l'oxalate d'ammonium, la glycérine (Haller), l'acide glutamique, le lactate de K, (Saillard), les constituants des mélasses (Saillard), l'alcool, le lactose, le camphre, le menthol, les acides benzoïques, oxaliques et salicilique et leurs sels de Na (Dhar), et la plupart des révélateurs photographiques.

L'oxygène naissant peut transformer les produits sulfureux en composés sulfuriques ou en dérivés dithioniques (peu stables en milieu acide). Il faut tenir compte de ce fait lors des

procédés analytiques basés sur l'oxydation des composés sulfureux (v. dosage de l'acide sulfureux). De même les sels ferriques doivent être utilisés avec précaution ainsi que KMnO_4 , et surtout les peroxydes de Mn, de Fe, de Ni et de Co et leurs dérivés qui donnent des acides dithioniques, alors que les bioxydes de Pb et de Ba laissent uniquement des ions sulfuriques.

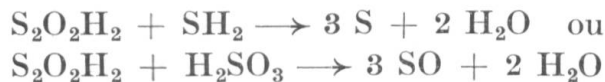
Action sur l'acide nitreux : Les trois oxhydrides de l'acide nitreux $\text{N}(\text{OH})_3$ sont condensables à la manière des oxhydrides des cétones. La réaction sur SO_3H_2 et ses sels se fait en pH moyen, tel que le fournit la solution de sulfite acide ; on obtient la formation successive de $\text{ON}(\text{SO}_3\text{M})$, $\text{HON}(\text{SO}_3\text{M})_2$, $\text{N}(\text{SO}_3\text{M})_3$. Ces corps peuvent être hydrolysés en milieu acide avec formation de H_2SO_4 et de radicaux et composés : $\text{HNO} \rightarrow \text{HNO}_2$; NH_2OH ; NH_3 . Finalement, en milieu plus acide, on obtient l'oxyde nitreux et l'oxyde nitrique.

Propriétés oxydantes : Le gaz sulfureux humide amené sans air sur du noir de palladium se transforme en soufre et acide sulfurique (Wieland).

L'hydrogène naissant en milieu acide réduit la solution sulfureuse jusqu'à la formation d'hydrogène sulfuré (Berthelot). On obtient alors les produits d'action de ce dernier sur le gaz sulfureux, c'est-à-dire : le soufre et les acides thioniques. Les intermédiaires les plus invraisemblables résultent de cette réaction :



puis, suivant l'excès relatif des corps réagissant, on peut avoir :



(voir la remarque du Prof. E. Cherbuliez dans la thèse de E. W. Loos, p. 54).

Beaucoup de métaux : Fe, Zn, Cd, Cu, Sb, Ag (Ag en milieu HCl) attaquent et réduisent l'acide sulfureux, probablement à la suite d'une électrolyse (préparation des hydro-sulfites).

L'électrolyse fournit au pôle positif l'acide sulfurique et dithionique et au pôle négatif les dérivés du sous-oxyde : SO et surtout les produits hydrosulfureux (Gueroult).

Formule de l'acide : Les formules OS(OH)₂ et O₂S< $\begin{matrix} \text{H} \\ \text{OH} \end{matrix}$ qui dérivent des deux sortes d'éthers sulfureux, devraient avoir pour conséquence l'existence de deux sels mixtes ; or il semble qu'on n'ait pu obtenir ces deux sels isomères avec certitude (Godby Abersow). Cependant l'étude cinétique de l'action des iodures alcooliques sur le sulfite de sodium semble montrer l'existence de deux formes tautomères dans le sel courant : le type dissymétrique NaSO₂ONa formerait 88% de l'ensemble et réagirait directement, tandis que la forme symétrique OS(ONa)₂ ne réagirait pas directement (transformation en son tautomère).

L'étude de l'absorption de l'ultra-violet par les solutions de l'acide et de ses sels conduit à des conclusions analogues (Wright, Garrett, Schœffer). Ce qui complique la question, c'est la possibilité de migration des groupes : on a facilement, surtout en milieu basique, R.O.SO.OH → R.SO₂OH.

Formule de l'anhydride : On lui attribue généralement la forme quinonique S<< $\begin{matrix} \text{O} \\ \text{O} \end{matrix}$ mais il semble qu'on doive envisager aussi la forme S< $\begin{matrix} \text{O} \\ \text{O} \end{matrix}$ pour expliquer des propriétés physiques. Dans les deux cas, ce serait un produit de condensation de S< $\begin{matrix} \text{O(OH)} \\ \text{OH} \end{matrix}$ (Rankine, Smith).

Etude générale des sels : L'acide sulfureux donne trois types de sels :

1. Les sulfites neutres de formule générale SO₃M₂.
2. Les sulfites acides ou bisulfites : SO₃MH.
3. Les métabisulfites ou pyrosulfites : S₂O₅M₂.

1. *Les sulfites neutres* : Par leur forme cristalline, leur teneur en eau, leur solubilité, ils offrent une certaine analogie avec les carbonates.

Les sulfites neutres alcalins sont solubles dans l'eau et comme leur acide est faible, on obtient une solution notablement hydrolysée.

Les autres sulfites neutres sont peu ou pas solubles dans l'eau.

La chaleur n'a pas d'action sur les sulfites neutres : les alcalins se décomposent vers 600°, celui de Ca vers 500°.

D'après Neuberg et Färber, les sulfites neutres, contrairement aux sulfites acides ou à l'acide sulfureux libre, ne présentent pratiquement aucune toxicité vis-à-vis des levures ; ces organismes fonctionnent très bien dans un milieu renfermant un sulfite neutre.

2. *Sulfites acides* : Ils sont dissociables à l'air en dégageant du gaz sulfureux. Les sels alcalins, alcalino-terreux et magnésiens sont solubles.

3. *Métabisulfites* : Les métabisulfites alcalins sont bien cristallisés, assez stables à l'air et solubles, mais ils se dissocient plus ou moins en bisulfites (Unsprath). Leur formule développée est la suivante : $OS \begin{matrix} \text{OM} \\ \text{SO}_3(\text{M}) \end{matrix}$.

Par oxydation à l'air, les sulfites se transforment en sulfates. De même avec le soufre, ils donnent des thiosulfates et des polythionates.

L'action sur les dérivés organiques halogénés conduit à un composé d'addition transposable en acide sulfoné ; le soufre devient alors hexavalent :



3. Le rôle des composés sulfureux en chimie organique

a) *Action sur les aldéhydes et cétones* : L'acide sulfureux est susceptible de s'ajouter aux aldéhydes, aux cétones et à certains de leurs dérivés.

Les produits obtenus sont hydrolysés par les acides forts et par SO_3H_2 lui-même. En pratique, on prépare les composés d'addition au départ d'un bisulfite dont l'acidité est insuffisante pour provoquer une hydrolyse sérieuse.

La formule de ces composés sulfureux est encore douteuse et il semble que comme pour l'acide sulfureux lui-même, on puisse envisager des tautomères correspondant à des migrations de radicaux. Deux formules en particulier ont été indiquées pour le dérivé de l'aldéhyde RCHO :



La formule (1) est la plus probable, le soufre y resterait tétravalent.

La préparation des dérivés sulfitiques représente une des principales applications des composés sulfureux : ils offrent le moyen de séparer sous forme soluble les composés de nature cétonique ou aldéhydique (dans la fabrication du papier à partir de fibres de bois).

Cl. Fromageot mentionne dans son article sur la fermentation alcoolique¹ l'affinité spécifique du groupe sulfite vis-à-vis de l'aldéhyde acétique, affinité qui provoque la formation du complexe CH₃ — CHOH — O — SO₂M, que l'on peut isoler facilement. L'aldéhyde acétique étant ainsi « bloqué », l'hydrogène devant s'y fixer pour la formation de l'alcool se porte alors sur l'aldéhyde glycérique pour former de la glycérine ou glycérol. Ceci est le principe de la fermentation glycérique de Neuberg (2^{me} formule de fermentation C₆H₁₂O₆ = CH₃ — CHO + CH₂OH — CHOH — CH₂OH + CO₂). Lorsqu'on introduit un bisulfite alcalin dans le milieu, ce sel peut agir évidemment sur tous les corps à fonction aldéhydique ou cétonique, notamment sur l'acide pyruvique et sur le glucose lui-même.

Neuberg et Reinfurth ont montré que la combinaison de l'acide pyruvique est parfaitement capable de subir l'action de la carboxylase et plus tard Neuberg a montré que le glucose, en présence de bisulfite, est encore parfaitement apte à fermenter. Le bisulfite apparaît donc comme agent spécifique pour capter l'aldéhyde.

Le bisulfite qui prend naissance à partir du sulfite au sein du milieu de fermentation, s'unit d'abord au glucose

¹ Grignard, p. 801, Traité de Chimie organique.

(ou au fructose) pour former un complexe suffisamment peu stable pour que d'autres substances, comme l'aldéhyde acétique par exemple, qui possèdent pour ce même bisulfite une affinité plus grande, s'en emparent et donnent finalement un complexe stable (Cl. Fromageot).

Le bicarbonate formé par réaction de l'anhydride carbonique sur le sulfite neutre, favorise la dissociation du complexe bisulfitique du sucre, alors qu'il n'a pratiquement pas d'action sur la combinaison bisulfitique de l'aldéhyde acétique.

Exemple du rendement en aldéhyde acétique et glycérol pour 100 gr. de saccharose :

Sulfite de Na	Aldéhyde acétique	Glycérol
gr.	gr.	gr.
33	11,90	23,37
50	12,52	24,86
75	13,89	27,61
150	18,65	36,90

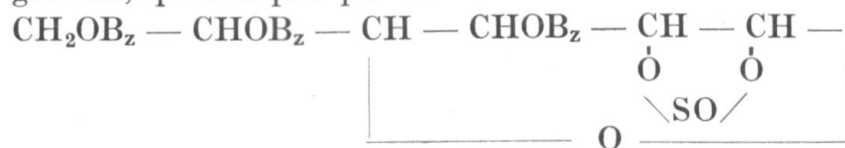
(Neuberg-Reinfurth, Ber. 1918,92.234.)

b) *Autres combinaisons organiques* : On a obtenu deux sortes d'éthers à partir de l'acide sulfureux : les sulfites symétriques qui dérivent du chlorure de thionyle et les éthers dissymétriques dérivés des sulfites et qui sont des sulfonates. On conçoit l'existence de deux acides correspondants :

OS(OH)_2 où S est tétravalent

et $\text{O}=\text{S} \begin{matrix} < \text{H} \\ \parallel \\ \text{O} \\ \text{OH} \end{matrix}$ où S est hexavalent.

On a pu préparer le dérivé tribenzoylé du sulfite 1.2.d-glucose, qui n'a pas pu être isolé et dont voici la formule :



$\text{B}_z = \text{CO}-\text{C}_6\text{H}_5$

Ce dérivé s'obtient en faisant agir le chlorure de thionyle sur une solution de tribenzoyl - 3 - 5 - 6-d- glucose dans le tétrachlorure de carbone. C'est un corps cristallisé (P. F. 139°, 140°).

D'autres complexes organiques ont été indiqués : Baume et Pamfil indiquent des complexes alcooliques de forme SO₂, CH₃OH et 2 SO₂, CH₃OH.

Briner et Cardoso ont signalé une combinaison avec l'oxyde de méthyle SO₂, (CH₃)₂O.

D'ailleurs Lewis, en montrant l'existence d'un maximum de viscosité des solutions sulfureuses dans l'éther, l'acétone ou l'alcool méthylique, prouve qu'il existe des combinaisons en solution.

D'autres combinaisons sont connues avec des acides aromatiques ainsi qu'avec des amines et des alcaloïdes (Polonowski).

III. — MÉTHODES ANALYTIQUES

1. Dosages d'acide sulfureux.

Nous avons utilisé la méthode officielle du Manuel Suisse des Denrées Alimentaires qui est une adaptation de la méthode de Rippert. Cette méthode est la suivante :

Pour le SO₂ libre : 10 cc. de la liqueur sont acidifiés par 1 cc. H₂SO₄ 25%. On titre par une solution d'iode N/100 à l'aide d'une burette en présence d'amidon.

Pour le SO₂ total : 10 cc. de la liqueur à titrer sont alcalinisés par 5 cc. KOH N/1 pendant 15 minutes ; on acidifie par 2 cc. H₂SO₄ 25% et on titre par iode N/100 en présence d'amidon.

Le dosage est basé sur la réaction :



La réaction doit avoir lieu en milieu acide en présence du ion I⁻, car l'oxygène naissant peut transformer les produits sulfureux en composés sulfuriques et dérivés dithioniques qui sont peu stables en milieu acide.

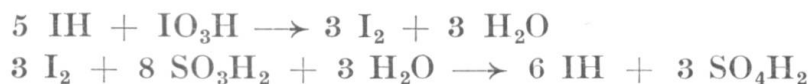
La réaction de SO₃H₂ sur l'acide iodique dite de Landolt est autocatalytique.

A côté de la transformation directe :



relativement lente, on peut envisager avec l'acide iodhy-

drique qui se forme, deux réactions dont la dernière est très rapide :



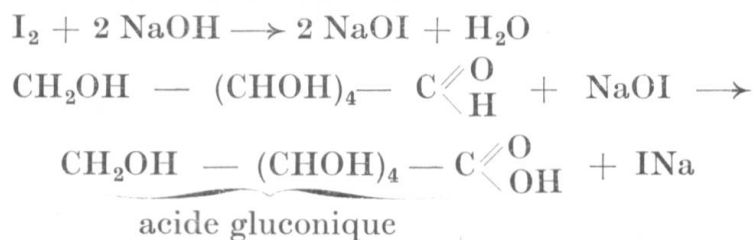
2. Dosages du glucose.

Nous avons employé la technique par iodométrie de Kolthoff (Die Massanalyse II, 485 — 1931) :

On ajoute à 10 cc. de solution ne contenant pas plus de 11 mg. de glucose, 25 cc. de solution d'iode N/100 fraîchement diluée et 5 cc. de solution NaOH N/10. On laisse à l'obscurité pendant 10 minutes à la température du laboratoire (décoloration).

On ajoute 10 cc. HCl N/10 (libération de I) et on titre par une solution fraîchement diluée de thiosulfate N/100 en présence d'amidon.

La réaction est la suivante :



2 I = 1 glucose.

Pour notre pratique, nous avons pris 1 cc. du milieu étudié (S.P.U. 10% glucose) que nous avons dilué à 100 cc. Nous avons fait le dosage sur 10 cc. de cette solution.

Pour les dosages en milieu bisulfité, nous avons pris la précaution de porter à l'ébullition la prise de 1 cc. diluée avant la jauge, afin d'éliminer l'acide sulfureux qui pourrait gêner le dosage iodométrique.

3. Dosages d'acétaldéhyde.

Nous avons utilisé la méthode de Crift et Crook (Biochemical Journal 1932, t. 26, p. 1788-99).

En présence de bisulfite de soude, les aldéhydes réagissent à la même température pour former des composés bisulfités.

Le principe de la méthode consiste à déplacer l'excès de bisulfite de la solution par addition de la quantité requise d'iode. Les composés bisulfités sont ensuite hydrolysés par saturation de la solution avec le bicarbonate de Na et le bisulfite libéré est titré par une solution standard diluée d'iode.

1 cc. d'iode N/1 est équivalent à la moitié du poids moléculaire de l'aldéhyde exprimé en mg.

A cause de la pénurie actuelle d'iode, nous avons dû modifier cette méthode en saturant l'excès de bisulfite par le mélange bromate-bromure en prenant soin d'acidifier la liqueur (HCl) et d'attendre que le brome se libère.

Nous avons procédé comme suit :

Pour chaque essai nous avons fait deux prises de la liqueur à étudier : 10 cc. et 20 cc.

On ajoute à la prise 1 cc. de solution approximativement moléculaire de bisulfite de Na.

On laisse reposer 15 minutes.

On ajoute quelques gouttes de HCl dilué.

L'excès de bisulfite est ensuite déplacé par l'écoulement d'une solution de bromate-bromure ($\text{BrO}_3\text{K} + 5\text{KBr}$) N/10 en présence de solution iodo-amidonée jusqu'à ce que la couleur bleue indique un léger excès.

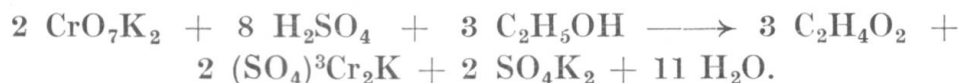
On fait disparaître la couleur bleue par quelques gouttes de solution thiosulfate fraîchement diluée N/100. Le point final (léger bleu) est ensuite atteint par une solution d'iode N/100 fraîchement diluée par eau désoxygénée.

On ajoute ensuite 5 cc. d'une suspension aqueuse de bicarbonate dans laquelle on a pris soin de faire passer un courant de CO₂ immédiatement avant l'emploi. On titre par la solution iode N/100.

4. Dosages d'alcool.

Nous avons utilisé la méthode Martin — Technique de M. A. Boidin : « Dosage de petites quantités d'alcool par voie chimique ».

La méthode repose sur la transformation intégrale de l'alcool en acide acétique par oxydation, en milieu sulfurique, à l'aide du bichromate de K :



L'excès de bichromate peut être titré par le sel de Mohr (sulfate double de fer et d'ammoniaque) ou par le thiosulfate. Nous avons préféré la deuxième technique.

Nous avons procédé comme suit :

10 cc. de la liqueur dilués de manière à ramener la teneur en alcool aux environs de 0,1-0,2%, sont soumis à la distillation.

On distille directement en réfrigérant dans un petit ballon à fond rond muni d'un tube de dégagement coudé dont la branche libre, d'une longueur de 30 cm. environ, plonge dans un tube à essai dans lequel on a soufflé plusieurs renflements successifs.

Dans ce tube on a introduit 20 cc. de la solution de bichromate N/10 et 10 cc. d'acide sulfurique concentré. Le mélange qui s'échauffe est fait directement avant l'emploi.

Après la distillation on recueille quantitativement dans un grand verre à pied (eaux de rinçage : 300-400 cc.). On ajoute 10 cc. de KI à 5% ou un cristal de KI. L'iode mis en liberté est dosé par une solution thiosulfate N/10 en présence d'amidon.

Si on a finalement pour les 10 cc. de la prise n cc. de thiosulfate, la quantité R d'alcool sera :

$$(20 - n \frac{t_{th}}{t_B}) t_B. 11,51 \text{ mg.} = R ; t = \text{titre}$$

$$R. 0,0126 \text{ cc.} = \text{alcool en volume dans les 10 cc. employés.}$$

5. Dosages des sulfates.

Nous avons opéré comme suit :

La prise (10 cc.) est portée à l'ébullition et précipitée par excès de BaCl₂ titré en solution neutre. L'excès de

BaCl₂ est à son tour précipité par une solution de chromate de K correspondante (couleur jaune).

$$\frac{\text{K}_2\text{SO}_4}{\text{BaCl}_2} = \frac{x}{nt} \quad \begin{array}{l} t = \text{titre BaCl}_2 \\ n = \text{cc. K}_2\text{CrO}_4 \\ x = \text{p. K}_2\text{SO}_4 \text{ dans la prise.} \end{array}$$

IV. — TERMINOLOGIE EMPLOYÉE

Disparition : diminution du SO₂ libre initial. (Ce terme peut englober les deux suivants.)

Fixation : Portion disparue du SO₂ mais *recupérable* par l'alcalinisation (SO₂ combiné).

Destruction : Portion disparue du SO₂ *non recupérable* par alcalinisation et pouvant être retrouvée sous forme de sulfates.

« Cette convention terminologique n'est pas seulement destinée à la clarté du texte mais doit encore servir de critique appliquée aux travaux antérieurs.

LE SORT DU SO₂ DANS LES LIQUIDES FERMENTESCIBLES

A. — CAUSES ABILOGIQUES DES TRANSFORMATIONS DU SO₂

1. Partie bibliographique

Introduction : Il nous a été assez difficile de rassembler les données concernant le sort de l'acide sulfureux dans les milieux de culture, éparses dans diverses revues locales. Il n'existe pas de vue d'ensemble suffisante sur les quarante dernières années et chaque auteur a plus ou moins cherché à donner une explication générale, sans toujours ajouter un fait précis. La difficulté première de cette bibliographie vient du fait qu'elle est adressée généralement au praticien, c'est-à-dire au viticulteur. En effet, pour ne pas perdre de vue ce but, les auteurs ont presque toujours travaillé dans des conditions analogues à celles de la pratique mais qui deviennent

complexes quand il s'agit de les interpréter scientifiquement. C'est pourquoi, pour nous faciliter la tâche, nous avons nettement séparé dans notre travail les causes abiologiques des causes biologiques des transformations de l'acide sulfureux.

Nous entendons par les premières, l'étude des éléments du milieu de culture responsables du sort de l'acide sulfureux avant l'introduction de la levure, et par les dernières, les causes dues à la présence de la levure et transformant le milieu par la fermentation qu'elle déclenche. Cette séparation, très nette dans notre travail, l'est moins quand on l'applique à la bibliographie car, comme nous le disons plus haut, certains auteurs, pour être proches des conditions de la pratique, n'ont pas toujours stérilisé leur milieu et leurs observations sont difficilement attribuables au milieu seul.

Le terme même « causes abiologiques » est relatif puisque nous comprenons également les éléments apportés au moût avant la fermentation par d'autres organismes que la levure (oxydases, Botrytis). Il nous a paru cependant nécessaire d'adopter cette séparation pour le regroupement de ces données diverses, afin de mieux comprendre le problème du sort de l'acide sulfureux.

Dans un milieu de culture, l'acide sulfureux « disparaît », c'est-à-dire qu'il échappe au dosage : une partie peut être retrouvée par alcalinisation sous forme combinée, c'est la « fixation », et l'autre n'est pas retrouvée, c'est la « destruction » (voir Terminologie). Nous avons tenté de regrouper les données bibliographiques selon ces termes pour éviter toute confusion.

1. Problème de l'équilibre de l'acide sulfureux libre et combiné. — Nous savons qu'une partie de l'acide sulfureux « disparu » se retrouve après traitement par l'alcalinisation. C'est l'acide sulfureux dit combiné ou « fixé ».

Ce fait, remarqué depuis longtemps, a été l'objet de nombreuses hypothèses et interprétations. Nous verrons plus loin à quels éléments du milieu, l'acide sulfureux est ainsi susceptible de se combiner.

Laborde (1916) le premier, a remarqué qu'il existait un état d'équilibre entre l'acide sulfureux libre et combiné :

« Les combinaisons sont réglées par des états d'équilibre « et par conséquent varient avec la composition du milieu. »

Il donne les chiffres du rapport de l'acide sulfureux combiné sur le total et constate que l'acide sulfureux combiné diminue en même temps que l'acide sulfureux libre. Celui-ci disparaît un peu plus facilement au début, mais à mesure que la dose de SO₂ total décroît le rapport $\frac{\text{SO}_2 \text{ combiné}}{\text{SO}_2 \text{ total}}$ ne conserve pas sa valeur primitive. Il augmente, au contraire, et jusqu'à 100%.

« De sorte que les variations sont en sens inverse de celles « que nous avons vues se produire quand on ajoute à un moût « des quantités croissantes d'acide sulfureux. Cette réversi- « bilité de la réaction prouve bien qu'elle est liée à l'établis- « sement d'un état d'équilibre entre l'acide sulfureux libre « et combiné qui dépend de la dose d'acide sulfureux total « et aussi de la constitution du milieu. »

Musso remarque que si on admet la réaction de combinaison comme étant principalement aldéhydo-sulfitique entre l'acide sulfureux et le sucre, il ne devrait pas y avoir de SO₂ libre dans le milieu.

« Or, la réaction se produit en laissant toujours une notable proportion d'acide sulfureux libre... »

Si on ajoute du SO₂ à un milieu arrivé à son état d'équilibre, la réaction se poursuit et l'SO₂ combiné augmente à nouveau jusqu'à un nouvel état d'équilibre. Au contraire, si dans un milieu, on supprime d'un coup la partie libre par un procédé artificiel (H₂O₂ par ex.), une réaction inverse se produit et l'SO₂ libre prend peu à peu naissance aux dépens du combiné.

« Ce n'est pas à vrai dire un phénomène de combinaison « donnant naissance à des produits stables. C'est principa- « lement un phénomène comparable à la dissociation et qui « tend vers un état d'équilibre variable selon les conditions « du milieu. »

Ribereau-Gayon étudient l'effet de la température sur l'établissement de cet équilibre :

« Il y a donc pour un vin donné, entre la teneur en SO_2 libre et SO_2 combiné, un équilibre dont l'état, régi par la loi d'action des masses est bien défini pour une teneur donnée en SO_2 total. Dans ces conditions, on conçoit bien que cet équilibre dépende de la température et qu'une élévation de température augmente la dissociation des combinaisons du SO_2 . »

C'est en se basant sur l'établissement de cet équilibre que Moreau et Vinet ont cherché à déterminer une « constante de combinaison » et ont établi des règles pour la détermination de la capacité de combinaison de chaque moût.

« On peut estimer dans tous les cas, qu'au bout de quatre jours de contact, la combinaison est achevée. » (Moreau et Vinet.)

Ils établissent leur constante de combinaison :

« Le même moût et le même vin, dans des conditions d'expérience identiques, combinent toujours les mêmes proportions de SO_2 . »

Ils remarquent qu'il existe une limite aux combinaisons totales et établissent « l'indice T » correspondant à la dose de SO_2 nécessaire à cette combinaison totale. Au delà de cette dose, le milieu ne combine plus que partiellement l'acide sulfureux offert. Cette combinaison partielle n'a pas de limite définie ; cependant Moreau et Vinet ont tenté de la déterminer en calculant les doses de SO_2 restant libre qui sont en progression arithmétique lorsqu'on augmente de 100 en 100 mg. les quantités supplémentaires à « l'indice T ». Ils appellent la raison de cette progression « indice R » qui peut être déterminée lorsque la combinaison est achevée, c'est-à-dire après quatre jours de contact¹. Ces règles sont applicables lorsque les conditions sont constantes (éléments du milieu, température de stérilisation et de pasteurisation), et quand les chances de perte par évaporation et par oxydation sont faibles.

¹ On trouvera le détail expérimental de ces règles de Moreau et Vinet dans la thèse de Loos, p. 37 et suiv.

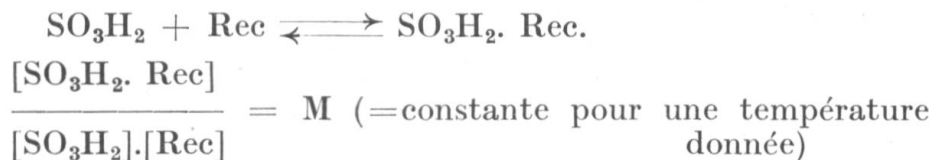
Moreau et Vinet ne tiennent pas assez compte de la « destruction » du SO₂ par oxydation qui « sauf exception, est lente à se produire ».

Nous verrons par nos dosages quotidiens qu'il est difficile d'établir une constante de combinaison pour les raisons suivantes :

1. Les combinaisons sont dissociables.
2. L'oxydation et l'évaporation se poursuivent et pour maintenir l'état d'équilibre, font varier les doses de combiné et de libre.
3. Si, dans le milieu, on observe un phénomène d'oxydation violente dû à la présence d'une substance la déterminant, la combinaison est pour ainsi dire inexistante car le premier phénomène est plus rapide que le second et l'équilibre entre le « combiné » et le « libre » ne peut s'établir.

D'ailleurs Moreau et Vinet eux-mêmes déclarent en 1937 que les « propriétés de combinaisons d'un moût ou d'un vin « sont dissociables à la température ordinaire. Elles sont en « équilibre avec l'acide sulfureux libre ».

Ils donnent la formule de cet équilibre en exprimant par le terme « récepteur » (Rec.) les corps organiques qui combinent l'acide sulfureux sous cette forme dissociable :



2. Documents sur la fixation. — Comme nous le constaterons également dans nos expériences, le moût de raisin non fermenté fixe une part importante de l'acide sulfureux total. Ce fait reconnu par tous les auteurs a été le point de départ de nombreuses théories sur les combinaisons bisulfuriques des éléments de ce moût.

Rappelons sommairement la composition du moût de raisin¹.

¹ D'après Pacottet. Vinification. 1904, p. 4 et suiv.

C'est un liquide sirupeux de densité supérieure à celle de l'eau. Elle varie de 1060 à 1120 et est surtout fonction de la richesse saccharine du moût. La proportion d'eau est considérable : 75 à 80% de son poids. Le sucre de raisin (15-20%) est le principal de ses éléments. Il est surtout formé de glucose (dextrose et lévulose en quantités à peu près égales à maturité) et d'une faible proportion de saccharose. L'acidité est donnée par l'acide tartrique et malique (0,4%), le bitartrate de K (0,5%) et un faible pourcentage d'acides volatils (0,040% acide acétique). Normalement le tanin n'existe pas dans le moût de raisin, cependant on en trouve des traces (0,020%) provenant des pépins, pellicules et rafles. La pulpe du raisin renferme les matières azotées (0,25%) :

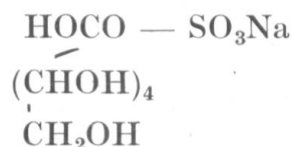
1. à l'état d'albuminoïdes peu solubles et de matières albuminoïdes solubles (peptones) ;
2. à l'état d'amides voisins des peptones ou plus dégradés encore, se rapprochant de l'ammoniaque.

Les substances salines minérales dans le moût sont des sulfates, des phosphates, des chlorures combinés aux alcalis, potasse, soude et chaux. Le fer et le manganèse existent aussi en faibles proportions très solubles sous forme de tartrates et de malates.

Il existe encore 3-5% de matières solubles ou en suspension sur la nature desquels on est fort mal renseigné. Il faut citer les gommés, mucilages et matières pectiques. En outre le moût contient des diastases nombreuses ; la matière colorante provient de la pulpe et les substances sapides qui constituent la saveur spéciale des moûts, de la couche interne de la pellicule du raisin.

Prenons le premier de ces éléments du moût : le sucre qui en constitue les 15-25%. A première vue, il semble qu'il n'y ait point de combinaison bisulfite possible, car elle devrait se faire par le groupe aldéhydique du glucose que l'on sait non fonctionnel par la présence d'un pont oxydique entre les carbones 1 et 5 (pyrane) ou 1 et 4 (furane). D'autre part, si le groupe aldéhydique était fonctionnel, il ne serait pas possible de conserver une part aussi importante d'acide

sulfureux libre, même en admettant la combinaison glucose-acide sulfureux très dissociable en raison de la grande disproportion des quantités de glucose et d'acide sulfureux mis en présence. Cependant Kerp, déjà en 1904, a réussi à obtenir une combinaison glucose-bisulfite. Il a isolé des cristaux en aiguilles épaisses, enchevêtrées, solubles dans l'eau qu'il précipite par l'alcool. Il établit la formule de ce complexe :



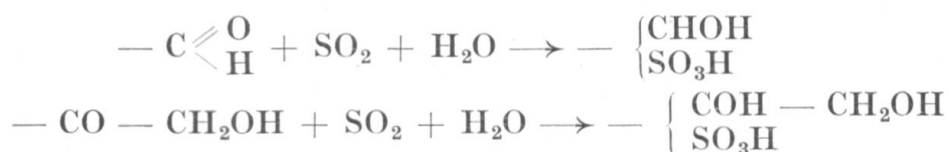
Il faut noter que cette combinaison n'est apparue qu'après des semaines de contact dans une solution de 100 gr. de sucre de raisin et 26,7 gr. de Na₂CO₃, dans 200 cc. d'eau.

L'auteur donne dans une autre communication les constantes de dissociation des différents composés aldéhydo-sulfureux et constate que l'acide glucose-sulfureux a des constantes de dissociation de 311.10⁻³ en solution normale ; 220.10⁻³ en N/10 ; 124.10⁻³ en N/30 alors que l'acide acétaldéhyde-sulfureux a des constantes de 2,84.10⁻⁶ ; 2,26.10⁻⁶ et 2,06.10⁻⁶ pour les mêmes solutions. L'acide glucose-sulfureux serait donc 10⁴ fois plus dissocié que l'acide acétaldéhyde-sulfureux.

En 1907, Kerp et Baur étudient la cinétique de la formation et de la précipitation du complexe par iodométrie et par polarimétrie car ils ont remarqué que la formation de ce complexe correspond à un changement de pouvoir rotatoire du glucose (2 complexes stéréoisomériques optiquement actifs résultant de la fixation de NaHSO₃ sur le glucose qui ne sont pas entre eux inverses optiques).

Ils constatent également qu'en présence simultanée d'acétaldéhyde et de glucose, le SO₂ agit d'abord sur l'acétaldéhyde et après complètes transformations sur le glucose. L'acide glucose-sulfureux d'autre part mis en présence d'acétaldéhyde est transformé en acide aldéhydo-sulfureux et glucose. Fait qui s'explique théoriquement par les constantes de dissociation.

Cette combinaison très dissociable, lente à se former et dans des conditions de concentration particulières, ne jouerait donc pas un rôle primordial dans la fixation de l'acide sulfureux dans le moût. Toutefois, un grand nombre d'auteurs et jusqu'à nos jours, l'ont considérée comme essentielle et même comme seule combinaison importante de l'acide sulfureux dans le moût. (Sabrazès-Mercandier, Dupont, Gaillard, Rocques, Musso, Benvegnin-Capt). Martinand fait le bilan : une partie se dissocie : c'est l'acide libre, l'autre est combinée aux sucres à chaîne aldéhydique libre. Laborde considère le lévulose comme inactif et base sur le rapport glucose-lévulose les différentes capacités de fixation des moûts. Bertin, en rapportant les expériences du Prof. Musso sur des moûts frais constate que la richesse saccharine du moût est un grand facteur du rapport $\frac{\text{SO}_2 \text{ libre.}}{\text{SO}_2 \text{ comb.}}$. Ventre donne même les formules de combinaisons aldéhydiques et cétoniques des sucres avec l'acide sulfureux.



Les groupements aldéhydiques et cétoniques étant transformés en alcools secondaires et tertiaires.

Moreau et Vinet écrivent en 1937 :

« L' SO_2 libre s'unit d'abord et rapidement aux sucres puis se dissocie peu à peu sous l'action de la levure, prend une nouvelle forme de combinaison stable (acide paraldéhyde-sulfureux) qui ne gêne pas la fonction du ferment. »

Warcollier-Le Moal, ainsi que Müller-Thurgau et Osterwalder puis Widmer-Braun-Kalberer ont tenu compte du peu d'importance de cette combinaison de Kerp en soulignant que les sucres par un procédé d'attaque chimique (W. Le M. : mélange oxydant : sulfate ferreux ammoniacal et H_2O_2) ou biologique (action des diastases) peuvent être rendus susceptibles de se combiner à l'acide sulfureux par leur transformation en forme aldéhydique fonctionnelle.

Neuberg avance que le bisulfite qui prend naissance à partir du sulfite au sein du milieu de fermentation s'unit d'abord au glucose (ou au fructose) pour former un complexe suffisamment peu stable pour que d'autres substances comme l'aldéhyde acétique, qui possèdent pour ce même bisulfite une affinité plus grande, s'en emparent et donnent finalement un complexe stable.

Il est donc sage de tenir compte de la possibilité de la combinaison de Kerp, en prenant soin de ne pas la considérer comme essentielle, mais accessoire. Il faut tenir compte de cette combinaison lorsque dans un milieu synthétique l'on augmente la teneur en glucose : ainsi dans le milieu S.P.U. à 15% de glucose, nos courbes montrent une fixation de SO₂ plus accentuée. Cette augmentation de fixation de l'acide sulfureux est fonction de la teneur en glucose.

Des essais de combinaison de glucose avec SO₂ à froid et après stérilisation ont montré que cette combinaison s'effectuait de façon négligeable par rapport à la masse du glucose, mais visible par rapport à l'ac. sulfureux offert. D'autre part la courbe A de la fig. 4 (milieu SO₂ sans glucose) ne montre aucun phénomène de fixation : les courbes de SO₂ total et SO₂ libre se confondent.

A quels autres éléments du moût faut-il alors impliquer cette capacité de combiner l'acide sulfureux ?

Müller-Thurgau et Osterwalder pensent aux tanins car ils remarquent une plus forte combinaison dans des jus provenant de poires à teneur plus élevée en tanins.

Widmer, Braun et Kalberer écrivent en 1932 :

« On ne fera pas d'erreur si on comprend également les « tanins frais dans les combinaisons bisulfitiques. En fait, « les jus à grande teneur en tanin montrent une très grande « capacité de combinaison, abstraction faite de l'acide aldé- « hyde-sulfureux formé. »

Moreau et Vinet en 1937 citent encore cette éventuelle combinaison avec les tanins. Rappelons cependant la faible teneur en tanin des moûts de raisin.

Warcollier et Le Moal constatent que les jus de pommes pourries qui combinent plus d'acide sulfureux que les jus normaux sont plus riches en matières pectiques et mucilages. Sur ces premières, ils essaient leur mélange oxydant qu'ils supposent analogue à l'action des diastases oxydantes, et arrivent ainsi à une combinaison de 50% d'acide sulfureux. Ces matières pectiques, comme les sucres, subiraient une transformation en corps à fonction aldéhydique, aptes à fixer de plus grandes quantités d'acide sulfureux.

Laborde, en remarquant une grande différence dans la capacité de combinaison de l'eau de levure faite à froid ou à chaud (23 mg. contre 93 mg. à chaud), dit que « les matières albuminoïdes, l'albumine de l'œuf ou la gélatine absorbent « très peu d'acide sulfureux mais que la peptone qui en dérive « en absorbe beaucoup ».

Martinand signale une combinaison entre les matières colorantes et le bisulfite de K :

« Le bisulfite de K dissout la matière colorante des raisins rouges. Cette dissolution croît avec la dose de métabisulfite mais à partir de 300 mg. la quantité de matière colorante dissoute croît très peu. »

Cela donne une combinaison incolore à l'état neutre, rouge en présence des acides et bleue en présence des alcalis.

Évidemment, beaucoup d'auteurs s'accordent à parler de la liaison bisulfitique des aldéhydes des vins et des moûts en fermentation, qui est l'essentielle combinaison de l'acide sulfureux ; mais dans le moût non fermenté, il est reconnu qu'il ne s'en trouve pas.

Laborde écrit à ce propos :

« La recherche de l'aldéhyde dans les moûts avant toute fermentation, n'a donné que des résultats négatifs à Seifert d'abord, et Martinand ensuite n'en a obtenu que des traces en soumettant des raisins à une fermentation intracellulaire de 48 heures. »

C'est en se basant sur ces préfermentations intracellulaires, que, Müller, Thurgau, Osterwalder et plus tard Widmer, Braun et Kalberer ont expliqué leurs constatations de com-

binaisons plus intenses dans des jus provenant de fruits très mûrs ou blets. De même, Warcollier et Le Moal expliquent l'action des diastases oxydantes dans ces jus, action analogue à celle de son mélange oxydant.

Nous voyons par l'ensemble de ces indications que la question de la combinaison de l'acide sulfureux est loin d'être résolue. Il ne semble pas permis d'attribuer à un seul élément la responsabilité de ces fixations. Il faut plutôt songer à une action d'ensemble, une action synergétique de tous ces facteurs, dont chacun à lui seul paraît insuffisant. Ne perdons en outre pas de vue, que ces combinaisons ne sont pas stables, mais réglées par des états d'équilibre.

3. Documents sur la « destruction ». — Comme nous venons de le voir, les auteurs se sont beaucoup préoccupés du sort de l'acide sulfureux et se sont surtout attachés à la question de la « fixation ». Cependant une part importante de l'acide sulfureux disparu ne se retrouve plus sous la forme combinée. C'est ce que nous avons appelé la « destruction » (voir Terminologie). Que devient dans le milieu l'acide sulfureux qu'on ne retrouve plus après l'alcalinisation ?

Une part est évaporée : faible pourcentage. (Moreau et Vinet : « Très faible et très négligeable »). Une autre part importante est oxydée en sulfates. Nous avons peu de renseignements quant au mécanisme de cette oxydation. Sabrazès et Mercandier en 1907 la signalent déjà : « ... une part s'oxyde, « forme des sulfates, enrichit le vin en sulfates de K... ».

Martinand en 1909, en constatant une différence dans la disparition de l'acide sulfureux entre des moûts bisulfités immédiatement ou après 24 heures de repos, suppose « qu'il « existe donc dans le moût des corps fixant l'oxygène de l'air « et si l'on vient à ajouter de l'acide sulfureux, une fois l'oxygène fixé, il est transformé en partie par l'oxygène fixé sur « ce moût ». Et plus loin encore : « ... en stérilisant le moût, « les agents provoquant la transformation de l'acide sulfureux disparaissent et au bout de peu de temps la teneur « d'acide sulfureux libre devient invariable ».

Nous reviendrons sur cette question de l'effet de la température de stérilisation en relatant nos propres expériences.

Martinand remarque également que les composés solides du moût favoriseraient la disparition de l'acide sulfureux (moût trouble).

Gaillard en 1911 cite aussi cette oxydation sous forme de sulfates alcalino-terreux. Saillard fait une étude des catalyseurs qui retardent l'oxydation des sulfites alcalins : « L'oxydation des sulfites alcalins dissous est ralentie par la « présence de saccharose, de sucre inverti, de non-sucre en « bloc, de l'oxalate d'ammoniaque, de la glycérine, des alcalis « libres ou carbonés, de l'asparagine, de l'acide glutamique, « du lactate de K ». (Voir propriétés physico-chimiques.)

Haller donne une indication sur le mécanisme des catalyseurs négatifs. Ceux-ci agiraient non pas sur l'acide sulfureux, mais indirectement sur les catalyseurs positifs (surtout les sels de Cu et de Fe) avec lesquels ils formeraient des composés non ionisables.

Saillard donne également les limites de température optimale pour cette oxydation : 15°-90° C. et affirme que l'oxydation marche plus vite si la température s'élève, et plus lentement si la teneur en sucre augmente.

Laborde écrit que si l'on ne prend pas les précautions pour la conservation du moût à l'abri de l'air, quand la quantité d'acide sulfureux est faible, celui-ci finit par disparaître complètement par oxydation.

Müller, Thurgau et Osterwalder remarquent déjà que si un moût part en fermentation plus tôt qu'un autre, l'oxydation de l'acide sulfureux en sulfates est moins rapide et, par conséquent, le moût sera finalement plus chargé en acide sulfureux, mais sous forme combinée. Nous reviendrons plus loin sur ce paradoxe que nous avons mis en évidence au cours de nos recherches.

Widmer, Braun et Kalberer retrouvent l'acide sulfureux oxydé en faisant le bilan des sulfates après la fermentation. Dans les faibles quantités, ils en retrouvent plus même qu'ils ne le prévoyaient et attribuent le surplus à une formation

d'acide sulfurique, lors de l'attaque des albumines par la levure. Mais dans les grandes quantités, ils constatent une perte due probablement à l'entraînement de l'acide sulfureux par le CO_2 au cours de la fermentation.

Cette oxydation de l'acide sulfureux dans les moûts peut-elle être attribuée uniquement à la circulation d'air, inévitable certes mais que l'on peut modérer par des précautions, ou est-elle activée par certains catalyseurs ignorés dans le moût ? (Voir propriétés physico-chimiques.) Cette seconde hypothèse nous paraît plus probable en raison de la « destruction » considérable de l'acide sulfureux. La littérature ne nous donne que peu de renseignements à ce propos.

Nous avons trouvé une référence d'une note de Zay, en 1924, selon laquelle l'acide sulfureux serait simplement oxydé en sulfates par les tanins. Ce fait serait en contradiction avec les suppositions de Rocques, Warcollier, Le Moal, Müller, Thurgau et Osterwalder, Widmer, Braun et Kalberer et Moreau et Vinet sur la combinaison éventuelle de ces tanins à l'acide sulfureux. Nous n'avons pu malheureusement consulter l'article de Zay en raison des circonstances actuelles et nous avons dû nous contenter de cette unique indication.

2. Partie expérimentale

1. Mode opératoire et formules des milieux employés. — Pour cette étude du sort de l'acide sulfureux dans les milieux de culture nonensemencés, nous avons choisi des flacons cylindriques à surface d'évaporation comparable, contenant 1 litre du liquide à étudier. Nous avons stérilisé ces flacons pleins, bouchés au coton, 20 minutes à 110°C . à l'autoclave. Nous les avons bisulfités ensuite à l'aide d'une solution concentrée et titrée de KHSO_3 ou NaHSO_3 à raison de 0,100 à 0,150 gr./l. de SO_2 . Une titration de contrôle a toujours été faite immédiatement après le bisulfitage. Les flacons ont été portés à l'étuve à 25°C . et nous avons fait les dosages d'acide sulfureux libre et total (voir Méthodes analytiques) sur des prélèvements stériles quotidiens.

Nous avons obtenu ainsi un contrôle de la progression de la « fixation » et de la « destruction » de l'acide sulfureux.

Nous avons d'abord étudié le moût de raisin. Nous avons utilisé le moût de raisin pasteurisé en 1941 à notre laboratoire. Pour l'étude de l'effet de la température sur les capacités de « combinaison » et de « destruction », nous avons pressé des raisins de l'automne 1942 fraîchement cueillis de la vigne.

Nous avons ensuite composé un milieu synthétique fermentescible par la levure afin d'être certains des éléments de notre milieu. Nous l'avons nommé milieu S.P. Nous avons dû le modifier par la suite en milieu S.P.U.

Voici les formules de ces deux milieux :

Milieu S.P. : Il se compose de deux liquides qui doivent être stérilisés séparément, afin d'éviter des cristallisations de sels, et mélangés stérilement après refroidissement.

Solution S : Nitrate d'ammonium	2 gr.
Asparagine	2 gr.
Glucose	100 gr.
Sulfate de Mg. crist.	1 gr.
Sulfate de Fe. crist.	0,050 gr.
Sulfate de Zn. crist.	0,050 gr.
Sulfate de Mn. crist.	0,050 gr.
Eau distillée q.s.	1000 cc.

Solution P : Phosphate monopotassique	1 gr.
Biomalt	0,5 gr.
Eau distillée q.s.	1000 cc.

Milieu S.P.U : Ce milieu est de même composition que le milieu S.P. sauf que l'on a remplacé l'asparagine (2 gr.) par de l'urée (2 gr.). Nous avons préféré joindre cette urée à la solution P. afin d'éviter une caramélisation du glucose pendant la stérilisation.

En outre, pour l'étude du comportement de l'acide sulfureux, nous avons repris chacun des éléments de ce milieu séparément, en solution dans de l'eau distillée, dans les mêmes concentrations que dans le milieu complet.

2. Comportement de l'acide sulfureux dans le moût de raisins. — Les dosages quotidiens d'acide sulfureux libre et total dans du moût de raisin pasteurisé de 1941 puis stérilisé 20 min. à 110° C., nous ont montré que le moût « fixe » une part importante d'acide sulfureux ($\frac{1}{3}$ environ de la dose initiale) et qu'une part non moins grande ($\frac{1}{2}$ environ de la dose initiale) est « détruite ».

L'équilibre s'établit au bout de deux jours. La fixation est presque instantanée puisqu'à la titration de contrôle immédiatement après le bisulfitage, on n'a que 0,037 gr./l. d'acide sulfureux libre. En suivant la courbe de SO₂ total on peut suivre la marche de la destruction (voir fig. 1). En effet, nous partons d'une dose de 0,153 gr./l., au bout de 24 heures, elle est de 0,126 gr./l. et dès 48 heures, elle se maintient autour de 0,070 gr./l. acide sulfureux total, tandis que l'acide sulfureux libre reste constant entre 0,01 et 0,02 gr./l.

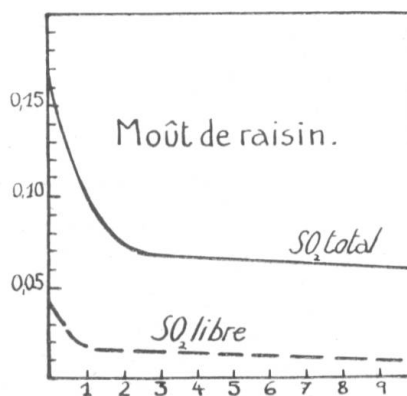


FIGURE 1

Axe des abscisses : nombre des jours

Axe des ordonnées : SO₂ gr./l.

Nous avons ensuite étudié l'influence de la température sur les capacités de « fixation » et de « destruction » du moût de raisin.

Nous avons utilisé un moût pressé au laboratoire, de raisins fraîchement cueillis à la vigne (pour éviter tout contact étranger). Nous avons séparé ce jus en quatre parties que nous avons toutes stérilisées à froid :

Partie A : filtrée à la bougie Chamberland, liquide clair.

Partie B : filtrée à la bougie Chamberland, chauffée à 80° C. pendant ½ h. (bain-marie), liquide légèrement trouble.

Partie C : filtrée à la bougie Chamberland, chauffée à 100° C. pendant ½ h. (autoclave), liquide très trouble.

Partie D : filtrée à la bougie Chamberland, chauffée à 120° C. pendant ½ h. (autoclave), liquide clair mais avec de gros dépôts coagulés.

Détruirait-on les diastases oxydantes de Warcollier-Le Moal ? Si c'était le cas, la température devrait diminuer la « fixation », puisque les diastases détruites par la chaleur ne pourraient plus transformer les sucres et matières pectiques en substances à fonction aldéhydique.

D'après Martinand, nous pourrions nous attendre plutôt à une diminution de la « destruction », puisque les agents provoquant la transformation de l'acide sulfureux en l'oxydant disparaissent, selon lui, par la stérilisation.

Le bisulfite (2 gr./l. SO₂) de ces quatre liqueurs nous ont donné les quatre courbes de la fig. 2.

Nous voyons que les moûts A, B, C ont la même capacité de « fixation ». L'hypothèse de Warcollier et Le Moal ne semble pas vérifiée. Le traitement à 120° augmente fortement la « fixation ». Le chauffage à 120° aurait contribué à la création de substances fixatrices.

La « destruction » grandit jusqu'à 100°. Le facteur de destruction n'est donc en aucun cas de nature enzymatique ou biologique. Le seul fait observé parallèle à cette destruction progressive jusqu'à 100° C. est une accentuation du trouble dans le milieu. A 120° la destruction est même moindre que dans le moût non chauffé (A)¹. Le liquide D est clair et contient de gros coagulums sédimentés. On peut expliquer ce phénomène par deux hypothèses :

¹ Les dosages des sulfates effectués dans les flacons A, B, C, D après 15 jours, nous ont donné : A : 0,2875 gr./l. ; B : 0,3587 gr./l. ; C : 0,3998 gr./l. ; et D : 0,2875 gr./l. K₂SO₄.

1. La forte combinaison constatée soustrait le SO_2 libre à l'oxydation. La stérilisation à 120°C . aurait un effet analogue à celui observé plus loin dans un moût inoculé (paradoxe de conservation de l'acide sulfureux).

2. La coagulation a supprimé l'effet colloïdal propice peut-être à l'oxydation.

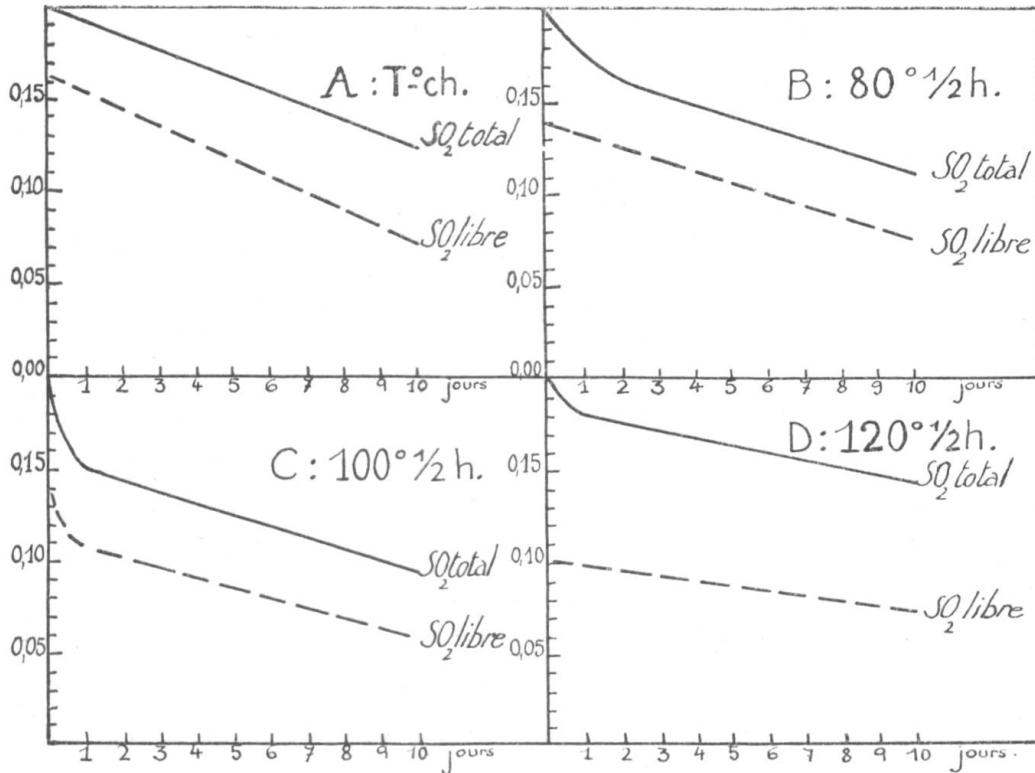


FIGURE 2

Axes des abscisses : nombre des jours
 Axes des ordonnées : SO_2 en gr./l.

Martinand ne nous donne aucune indication sur la nature des « agents provoquant la transformation de l'acide sulfureux qui disparaissent en stérilisant le moût ».

Sont-ils de nature biologique ? Dans ce cas, nous aurions dû observer dans les flacons A, B et C un ralentissement progressif de la « destruction ». Nos résultats nous prouvent le contraire. Sont-ils alors de nature physique, colloïdale ? Le trouble que nous avons observé agirait-il par augmentation de surface et contribuerait-il à la destruction progres-

sive observée ? Nous avons essayé de créer un état colloïdal artificiel dans le moût frais non chauffé. Nous avons constitué deux flacons : l'un témoin contenant du moût frais filtré à la bougie Chamberland, l'autre également filtré mais additionné de 0,1 % de Terre à infusoires.

Les deux flacons bisulfités à 2 gr./l. n'ont pas montré de différence. La suspension colloïdale à l'aide de Terre à infusoires peut-elle cependant être comparée à celle produite par le chauffage ?

Pour le moment, faute de preuves suffisantes pour admettre notre deuxième hypothèse, nous nous tenons à la première dont nous avons eu une confirmation en quelque sorte par nos expériences biologiques, de même que Müller, Thurgau et Osterwalder en 1914. Il faut retenir également cette capacité nouvelle de « fixation » qu'acquiert un moût par la température de stérilisation.

3. Comportement de l'acide sulfureux dans le milieu synthétique S.P. — En soumettant le milieu S.P., bisulfité à

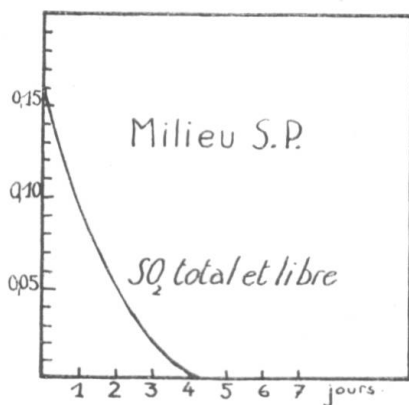


FIGURE 3

Axe des abscisses : nombre des jours
Axe des ordonnées : SO₂ en gr./l.

raison de 0,150 gr./l. SO₂, aux dosages quotidiens de SO₂ total et SO₂ libre, nous avons constaté avec surprise une « destruction » rapide et considérable (voir fig. 3). Au bout de cinq jours, il ne restait plus trace d'acide sulfureux dans le milieu, ni libre, ni combiné. D'ailleurs les chiffres obtenus avant et après l'alcalinisation ont toujours coïncidé pendant cette « destruction ». Nous n'avons donc pas eu de « fixation ».

A quel élément de notre milieu synthétique S.P. fallait-il attribuer cette « destruction » ? On ne pouvait songer à une perte par évaporation seulement. D'ailleurs un flacon témoin

d'eau distillée bisulfitée a été étudié dans des conditions identiques (étuve 25°C .) et nous n'avons décelé qu'une perte de $0,020 \text{ gr. / l. SO}_2$ en 6 jours.

Nous avons repris ces dosages d'acide sulfureux dans le milieu S.P. en supprimant un à un divers éléments le constituant que nous pouvions supposer responsables. C'est ainsi que nous avons étudié les quatre liqueurs suivantes :

- A : milieu S.P. sans glucose
- B : » S.P. » sulfate de Fe
- C : » S.P. » asparagine
- D : » S.P. » biomalt.

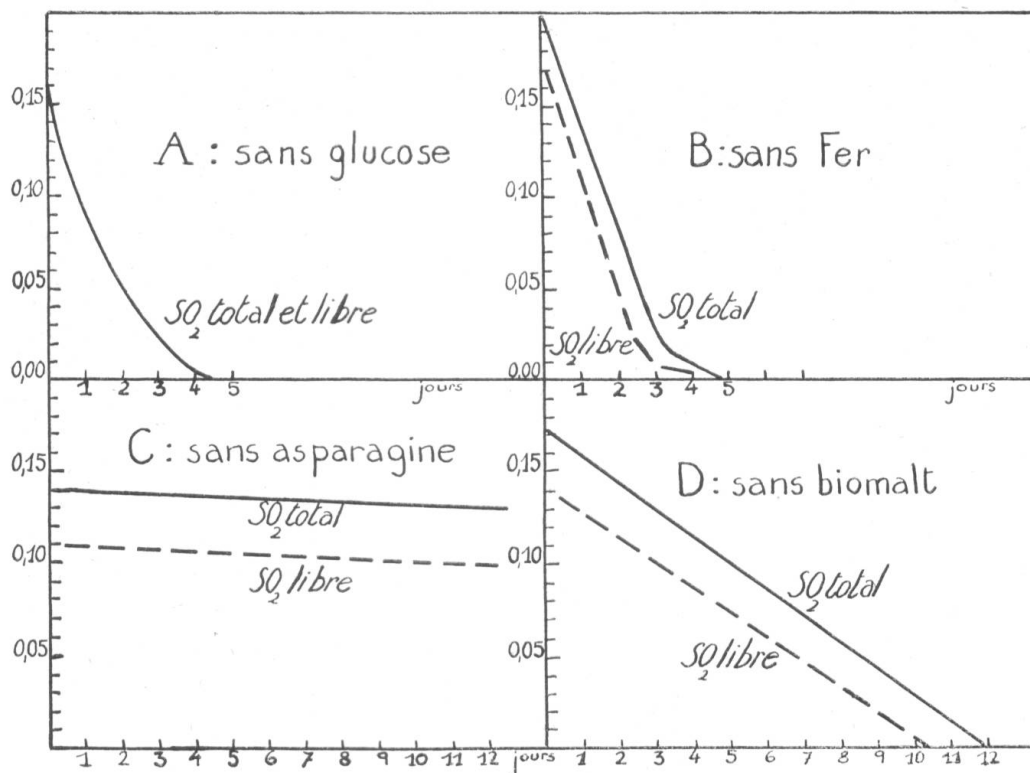


FIGURE 4

Axes des abscisses : nombre des jours
 Axes des ordonnées : SO_2 en gr. /l.

Ces quatre milieux bisulfités à $0,150 \text{ gr. / l. SO}_2$ et portés à 25°C . ont été soumis aux dosages quotidiens de SO_2 libre et total. Les résultats sont consignés dans la figure 4.

On voit de suite que la « destruction » persiste dans les flacons A et B malgré l'absence du glucose et du fer. Donc, ni le glucose, élément de base, ni le fer, catalyseur d'oxydation reconnu (voir prop. physico-chimiques), n'influencent cette « destruction » rapide. Par extension, il ne s'agirait pas non plus d'une action catalysée par les métaux lourds.

La suppression du biomalt ralentit la « destruction ». Elle ne s'achève qu'au bout de 12 jours. Le biomalt étant une substance de composition mal définie, nous ne nous attarderons pas sur ce facteur pour l'instant.

Mais arrêtons-nous surtout à l'examen de la courbe du milieu C. La « destruction » est quasi nulle et nous observons même une faible « fixation ». Nous pouvons en déduire que l'asparagine serait l'élément responsable de cette « destruction » si rapide. Ce qui est surprenant, c'est la constance des valeurs de SO_2 total que nous avons suivies pendant 15 jours. Ces résultats nous ont entraînés à l'étude d'un nouveau problème :

Comment expliquer cette action de l'asparagine sur le bisulfite ?

Nous avons réuni les renseignements que nous avons pu déduire de nos essais dans le paragraphe suivant.

4. Etude de l'action de l'asparagine et des acides aminés sur l'acide sulfureux. — Pour avoir une confirmation de cette action de l'asparagine sur la « destruction » de l'acide sulfureux, nous l'avons étudiée en solution dans de l'eau distillée et bisulfitée dans les mêmes concentrations que dans le milieu complet (1 gr./l. asparagine).

La courbe que nous a donnée cette solution (voir fig. 5 A) nous a montré une « destruction » encore plus intense que dans le milieu complet (un peu plus d'un jour). Nous avons étendu cet essai à des acides aminés : le glycolle et l'acide aspartique, ce dernier différent de l'asparagine par un second carboxyle. Ces deux solutions, préparées et suivies toujours dans les mêmes conditions, nous ont donné les courbes B pour le glycolle et C pour l'acide aspartique de la figure 5.

Le glycolle a une action analogue à celle de l'asparagine quoique un peu plus lente.

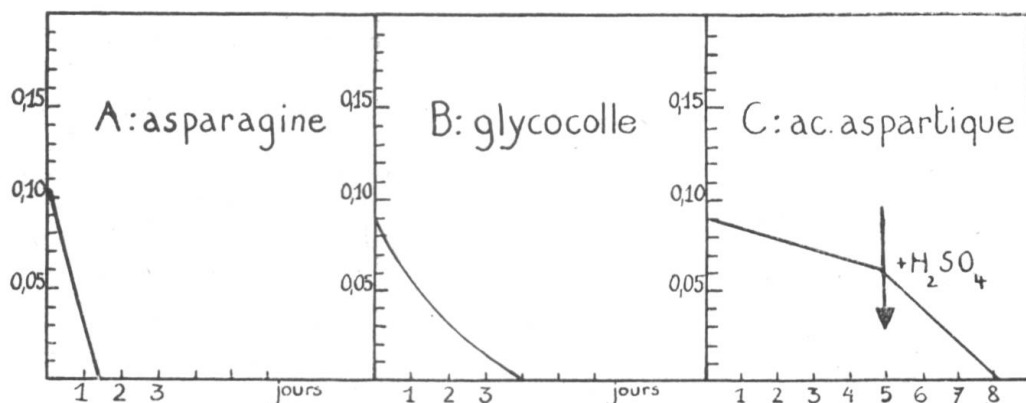


FIGURE 5

Axes des abscisses : nombre des jours
 Axes des ordonnées : SO₂ en gr./l.

L'acide aspartique au contraire ne semble pas avoir d'action. Cependant un nouveau milieu complet, dans lequel l'acide aspartique remplaçait l'asparagine, a été essayé et ne s'est pas montré plus stable qu'avec l'asparagine (« destruction » totale en moins de 4 jours). Pourquoi cette différence entre la solution d'acide aspartique et le milieu ? Nous avons alors songé que l'acide aspartique diffère de l'asparagine et du glycolle par un second carboxyle et, par conséquent, a un point isoélectrique beaucoup plus bas. En effet nous avons trouvé les valeurs de

$$\begin{aligned} \text{pHi} &= 2,9 \text{ pour l'acide aspartique} \\ \text{pHi} &= 6,6 \text{ pour le glycolle.} \end{aligned}$$

Quant à l'asparagine nous n'avons qu'une indication de M. D. Bach selon laquelle

$$\text{pHi} = 4,3 - 4,4 \pm 0,1 \text{ pour l'asparagine.}$$

Ces valeurs nous paraissent faibles ; d'ailleurs le même auteur donne la valeur

$$\text{pHi} = 5,9 \pm 0,2 \text{ pour le glycolle.}$$

Or les pH des solutions A, B et C étaient respectivement de 5 — 5,5 ; 5,5 — 6 ; et 3 — 3,5. Nous étions nettement

à un pH inférieur à pHi pour le glyco-colle et supérieur à pHi pour l'acide aspartique. Le pH du milieu à l'acide aspartique aurait baissé au cours de la réaction de 4,0 à 2,6.

Nous avons donc supposé que l'action de ces acides aminés sur l'acide sulfureux ne pouvait avoir lieu qu'à un pH inférieur à celui de leur point isoélectrique. Nous aurions une action par la fonction amine.

Forts de cette supposition, nous avons acidifié le flacon C (acide aspartique) par H_2SO_4 de façon à obtenir un pH inférieur à 1, donc inférieur au pHi de l'acide aspartique. En poursuivant les dosages, nous avons en effet obtenu une « destruction » rapide, analogue à celle des autres acides aminés (voir fig. 5 C). Inversement, nous avons alcalinisé une solution d'asparagine bisulfitée (pH = 8). Si nous n'avons pas supprimé la « destruction », nous l'avons ralentie ; elle s'est effectuée en 8 jours au lieu de moins de deux jours.

Ces essais nous ont donc confirmé l'action des acides aminés à un pH inférieur à leur pHi. Nous avons alors tenté d'expliquer la courbe D du paragraphe 3 obtenue dans le milieu S.P. sans biomalt. Pourquoi, en effet, en présence d'asparagine, ce milieu ne réagit-il pas comme en A, sachant le comportement d'une solution d'asparagine ? Une autre solution d'asparagine et de biomalt n'a donné aucune « destruction », alors que le biomalt seul, et surtout l'asparagine seule, détruit le SO_2 . Le biomalt agit probablement comme substance tampon ; agit sur le pH en l'abaissant ou en l'élevant suivant les conditions.

Il reste dès lors au chimiste à déceler de quelle sorte d'action nous sommes témoins. Est-ce une action d'ordre catalytique ? Nous ne le pensons pas en raison de la disproportion entre l'acide aminé responsable (1 gr.) et l'acide sulfureux détruit (0.150 gr.). Nous avons d'ailleurs établi une solution équimoléculaire d'asparagine et d'acide sulfureux à un pH nettement inférieur à celui du point isoélectrique de l'asparagine et nous n'avons observé aucun phénomène de « destruction ».

L'acide sulfureux s'est maintenu dix jours dans ce milieu sans subir aucune action de l'asparagine.

Dans tous les flacons où nous avons constaté cette « destruction », nous avons toujours obtenu en fin de réaction par l'essai qualitatif au BaCl_2 un gros précipité de sulfate de Baryum. Il s'agirait donc d'une oxydation de SO_2 en SO_3 . Un essai NH_4Cl bisulfité n'a donné aucune réaction. Nous n'avons en tous cas pas d'addition sur le groupe NH_2 . D'autre part l'hydrolyse, effectuée sur le flacon où la « destruction » avait été constatée, ne libère pas de SO_2 .

Nous n'avons pu aller plus loin dans cette recherche car cela dépassait les limites de notre travail et nous laissons aux chimistes le soin d'élucider cette question.

La littérature ne nous a donné aucun renseignement si ce n'est une phrase de Saillard (voir partie bibliographique 2) citant l'asparagine parmi les catalyseurs négatifs de l'oxydation des sulfites alcalins en sulfates.

Le « Beilstein » et le « Chemisches Zentralblatt », consultés, ne nous ont rien apporté à ce propos.

5. Comportement de l'acide sulfureux dans le milieu S.P.U. et adaptation de ce dernier aux expériences biologiques.

— Il découlait des faits que nous venons de relater que nous ne pouvions utiliser le milieu S.P. pour une étude biologique de l'influence de l'acide sulfureux. Nous devions constituer un milieu synthétique fermentescible pour la levure qui maintienne avec constance l'acide sulfureux libre.

Nous avons tenté de remplacer l'asparagine par l'urée en même quantité, comme source d'azote organique pour la levure.

Un essai du comportement de l'acide sulfureux dans une solution d'urée s'est montré assez satisfaisant : l'acide sulfureux est légèrement « détruit », mais au bout de dix jours, le milieu contient encore une notable dose d'acide sulfureux libre. De plus, l'urée ne fixe pas l'acide sulfureux.

Nous avons alors étudié le milieu complet S.P.U. pour différentes concentrations d'acide sulfureux (voir fig. 6).

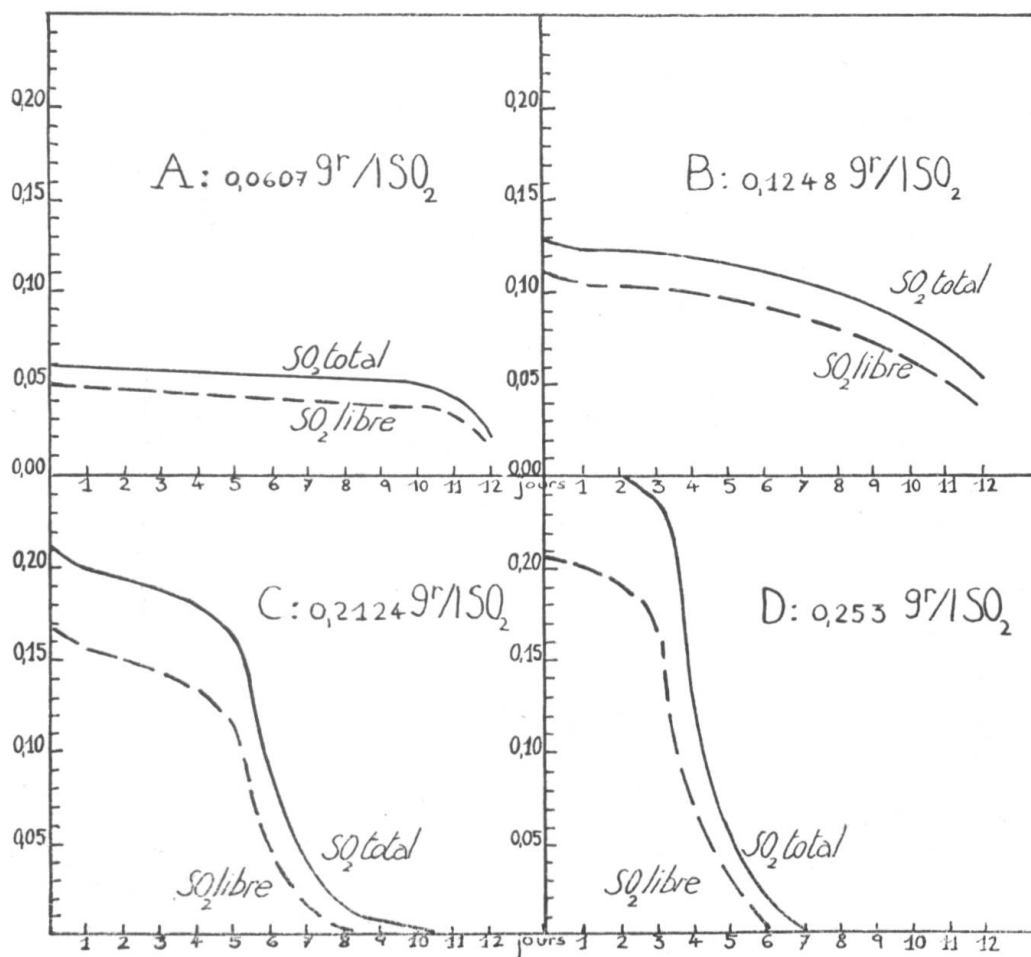


FIGURE 6

Axes des abscisses : nombre des jours
 Axes des ordonnées : SO_2 en gr./l.

Nous voyons que plus les concentrations augmentent, plus la « destruction » commence tôt. Il semble qu'il y ait un facteur déclenchant cette « destruction » et que ce facteur s'installe d'autant plus vite que la concentration en SO_2 est élevée.

Nous constatons également que le milieu S.P.U. fixe une petite dose de SO_2 qui augmente avec la concentration en SO_2 . Ces courbes nous montrent que le milieu S.P.U. peut

être utilisé dans les doses inférieures à 0,150 gr./l. et qu'à condition de rester dans ces limites, nous pouvons utiliser ce milieu pour les expériences biologiques. Au cours de ces recherches, nous avons dû augmenter les doses de glucose et de biomalt. Le milieu a donc été étudié pour ces nouvelles concentrations en glucose et biomalt, et a donné la courbe de la fig. 7. En la comparant à celle de la fig. 6 C (conc. analogue de SO_2), nous voyons que ce nouveau milieu S.P.U. est plus stable. Il « fixe » plus d'acide sulfureux cependant.

Nous pouvons donc également utiliser ce milieu S.P.U. 10% glucose et 1 gr./l. biomalt.

Ce nouveau milieu s'est montré d'une fermentescibilité supérieure.

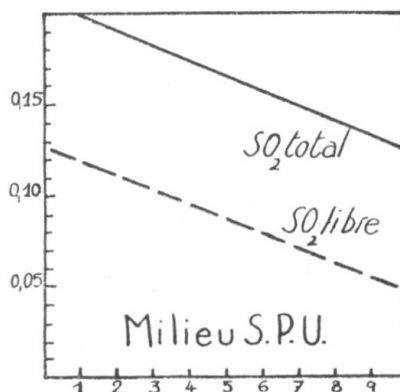


FIGURE 7

Axe des abscisses : nombre des jours
Axe des ordonnées : SO_2 en gr./l.

B. — CAUSES BIOLOGIQUES DES TRANSFORMATIONS DU SO_2

1. Partie bibliographique

Les milieux de culture dont nous venons d'étudier les capacités de « fixation » et de « destruction » resteront-ils aussi stables en présence de la levure qui provoquera la fermentation de ce milieu ?

Certes non, la fermentation entraînera la formation de composés qui seront susceptibles de former des combinaisons nouvelles avec l'acide sulfureux. D'emblée nous songeons à l'acétaldéhyde, produit intermédiaire de la fermentation dont on sait la faculté de se lier à l'acide sulfureux (voir prop. physico-chimiques).

Les auteurs s'accordent d'ailleurs à reconnaître cette « fixation » dans un milieu fermenté, certains l'ont même poussée en ses extrêmes limites afin de voir les possibilités d'adaptation de la levure à un milieu bisulfité, mais c'est toucher à un autre problème que nous considérerons ensuite. Pour l'instant, nous resterons sur le plan de l'acide sulfureux sans nous soucier des répercussions sur la levure et la fermentation.

Le comportement de celui-ci est-il modifié par la levure elle-même, ou seulement par les produits du milieu, nés au cours du processus fermentaire qu'elle déclenche ?

Martinand en 1909 parle d'une transformation de l'acide sulfureux en acide sulfurique par la levure vivante, ce qui permettrait à celle-ci de commencer la fermentation après la « destruction » de l'acide sulfureux. Il avance cependant cette conclusion avec réticence car un essai de 1% de levure sur l'acide sulfureux ne lui a fait constater qu'une perte très faible en SO_2 après 18 heures de contact.

Müller, Thurgau et Osterwalder citent l'influence des diastases sur l'oxydation en sulfates de l'acide sulfureux et ailleurs, ils reconnaissent la disparition de l'acide sulfureux entraîné par le courant d'acide carbonique pendant la fermentation.

Mlle Porchet, en 1931, usa d'un procédé très simple pour s'assurer de l'influence de la levure elle-même ou du milieu fermenté, sur la disparition de l'acide sulfureux : elle constate une fixation plus intense, si l'on remplace le moût sulfité en fermentation par du moût non sulfité en plein travail. Elle refit l'opération en filtrant le moût non sulfité sur filtre Seitz E.K., afin de retenir les levures, et obtint ainsi un résultat pareil. Elle conclut : « Ce sont les substances nées au cours de la fermentation (aldéhydes) qui possèdent un pouvoir de fixation remarquable. »

D'ailleurs Laborde, Gaillard, Hubert et Bailly remarquent cette combinaison de l'acide sulfureux avec l'aldéhyde produite dans le milieu ; Hubert et Bailly écrivent : « Sitôt que les premiers éléments aldéhydiques dégagés par la ferment-

« tation qu'il provoque se seront combinés à l'acide sulfureux, le liquide sera prêt à supporter l'addition de levures normales qui achèveront le phénomène. »

Moreau et Vinet écrivent en 1937 que l'acide sulfureux est combiné dans le vin aux aldéhydes.

En 1914 déjà, Müller, Thurgau et Osterwalder remarquent, en observant le comportement de l'acide sulfureux dans des jus de fruits en fermentation à des dates différentes : « Par suite du changement de l'acidité et de la formation de l'acétaldéhyde, l'oxydation de l'acide sulfureux est suspendue et empêche un plus grand départ de l'acide sulfureux total ; d'autre part la présence d'acétaldéhyde largement combinée a influencé le sort de l'acide sulfureux, de sorte que malgré la grande part d'acide sulfureux combiné, il ne s'en trouve que peu à l'état libre, moins que dans les moûts non fermentés au même moment, quoique ces derniers contiennent moins d'acide sulfureux total ».

Les essais que nous relatons ensuite concordent avec ces différentes observations.

2. Partie expérimentale

Comme Mlle Porchet, nous nous sommes premièrement assurés de la responsabilité des levures ou de la liqueur de fermentation en face d'une disparition de l'acide sulfureux.

Pour ces essais nous avons choisi deux levures de la collection de l'Institut de Botanique :

L 21 : Levure du Fendant du Valais.

Saccharomyces.

Fermentant très bien.

L 87 : Asporomyces Loos, isolé de la caroube et dont Loos a étudié le pouvoir fermentaire (alcool = 3,5% ; sucres restants = 6,8%).

Levure à très fortes propriétés respiratoires.

Nous avons préparé des suspensions égales de ces deux levures dans de l'eau distillée, contrôlées par dénombrement à la cellule compte-globules Thomas-Zeiss.

Les suspensions étaient préparées à partir de 1 cc. de culture de 48 heures sur moût de raisin dans 10 cc. d'eau distillée. Nous avons pris 1 cc. de ces suspensions pour les joindre à 10 cc. d'une solution titrée de KHSO_3 pendant 1 heure à 25° C.

Le titre de la solution de KHSO_3 avant le passage des levures était de 0,0532 gr. /l. SO_2 libre.

Après le passage d'une heure ce titre avait baissé à 0,0383 gr. /l. pour L 21 et était de 0,0512 gr. /l. pour L 87.

Un second essai identique mais à partir d'une culture de 4 jours sur la même solution KHSO_3 nous a donné :

0,035 gr. /l. SO_2 libre pour L 21

0,0521 gr. /l. SO_2 libre pour L 87

Nous voyons que le passage des levures à haut pouvoir fermentaire (L 21) a abaissé en 1 heure seulement le titre de la solution d'acide sulfureux, tandis que le passage de l'*Asporomyces* (L 87) ne semble pas l'avoir influencé.

Nous avons ensuite préparé les suspensions suivantes pour ces mêmes levures :

1 cc. de la culture dans 10 cc. d'eau distillée sont centrifugés. Le culot est repris dans 10 cc. d'eau distillée et 1 cc. de cette suspension est ajouté à la solution de KHSO_3 (titre : 0,04558 gr. /l. SO_2).

Nous avons obtenu après un passage de 3 heures à 25° C. :

0,0424 gr. /l. SO_2 libre pour L 21

0,0424 gr. /l. SO_2 libre pour L 87

Le passage des levures lavées ne semble pas avoir influencé le titre de la solution d'une façon considérable (30 mg.).

En confirmation, nous avons repris ces essais en ajoutant 1 cc. dans l'eau de lavage après la séparation des levures par centrifugation.

Le titre de la solution KHSO_3 étant au départ de 0,04858 gr. /l. SO_2 libre a baissé à :

0,043 gr. /l. par le passage de 3 heures des cellules de levure, pour L 21.

0,039 gr. /l. par le passage de 1 cc. de l'eau de lavage pour L 21.

0,050 gr. /l. pour le passage des cellules de levure pour L 87.

0,042 gr./l. pour le passage de l'eau de lavage pour L 87.

Un essai témoin : 1 cc. d'eau distillée dans 10 cc. KHSO₃ a été constitué et le titre a baissé de 0,04858 à 0,044 gr./l. SO₂ libre par évaporation (3 heures à 25° C.).

Nous voyons nettement que la liqueur de fermentation est responsable de cette baisse du titre en SO₂ libre. Les levures, débarrassées du milieu dans lequel elles ont fermenté, ne semblent pas influencer la disparition de l'acide sulfureux. Les essais concordent avec ceux de Martinand et de Mlle Porchet.

Nous avons ensuite procédé comme dans nos expériences abiologiques, et suivi le comportement de l'acide sulfureux dans un milieu en fermentation. Nous avons choisi la levure L 21 pour tous nos essais de fermentation.

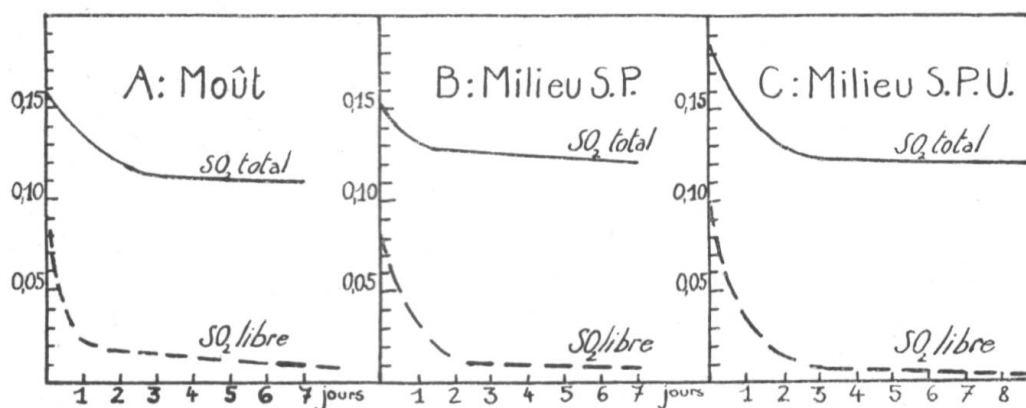


FIGURE 8

Axes des abscisses : nombre des jours
Axes des ordonnées : SO₂ en gr. /l.

Le moût d'abord nous a montré cette « fixation » rapide et considérable que signalent Müller, Thurgau et Osterwaller, ne laissant que des traces d'acide sulfureux libre (voir fig. 8 A).

Nous avons ensuite ensemencé le milieu S.P. bisulfité où nous avons constaté la même combinaison (voir fig. 8 B). En comparant cette courbe avec celle du même milieu S.P. non ensemencé, dans lequel l'acide sulfureux était complètement « détruit » au bout de 5 jours (voir fig. 3), nous pouvons mettre en évidence ce paradoxe : le milieu inoculé conserve plus d'acide sulfureux que le milieu non inoculé. La « fixation » aux aldéhydes produites au cours de la fermentation est plus rapide que la « destruction » qui se serait accomplie sans inoculation.

La présence des levures dans le milieu deviendrait ainsi un agent de conservation de l'acide sulfureux. Ce fait, paradoxal puisque l'acide sulfureux est toxique pour la levure, a déjà été remarqué, comme nous l'avons dit plus haut, par Müller, Thurgau et Osterwalder.

Le milieu S.P.U. ensemencé nous a donné une courbe analogue (voir fig. 8 C).

ÉTUDE DE L'INTOXICATION SULFUREUSE

A. — ACTION DU SO₂ SUR LA LEVURE

1 Partie bibliographique

Tous les auteurs s'accordent pour attribuer une action antiseptique à l'acide sulfureux libre.

Hailer en 1884 déjà écrit que les concentrations en acide sulfureux nécessaires pour la destruction des bactéries, des levures et des moisissures sont dans le rapport 1 : 4 : 5. L'addition du glucose diminuerait cet effet inhibiteur de la croissance.

Sabrazes, Mercandier et Gaillard en étudiant les propriétés antiseptiques, déclarent qu'il serait logique d'attribuer à l'acide sulfureux une légère augmentation des propriétés bactéricides du vin (b. d'Eberth).

Cependant Monteiro en 1929 obtint des résultats peu favorables et même négatifs dans l'emploi de l'acide sulfureux pour une désinfection sérieuse (staphylocoques, bacille

pyocyanique, bactérie charbonneuse, B. de Shiga, B. entériditis, B. coli).

Il est reconnu que seul l'acide sulfureux libre aurait cette action antiseptique sur les microorganismes. (Klein, Benvegnin-Capt, Ventre, Bertin, Martinand, Musso, Porchet, etc.). Cependant il faut préciser, car seuls les sels acides (bisulfites) seraient actifs, alors que les sels neutres sont titrés également comme acide sulfureux libre.

Ainsi Moreau et Vinet, en désacidifiant le moût, diminuent le pouvoir antiseptique de l'acide sulfureux libre en modifiant la forme chimique sous laquelle le corps entre dans le milieu. Suivant l'acidité du milieu, on aura prédominance de bisulfites (acide) ou de sulfites (neutre). Ils ont même poussé expérimentalement cette désacidification jusqu'à l'extrême neutralité (sulfites), avant d'atteindre l'alcalinité qui aurait dissocié alors les combinaisons aldéhydiques.

Les essais de Collier sur la détermination de la durée T de préfermentation montrent que l'acidité augmente cette durée, alors que l'emploi d'un désacidifiant (CO₃Ca) le diminue. Ces essais confirment cette action seule du bisulfite acide.

Loos dans sa thèse nomme « SO₂ biologiquement actif » le seul SO₂ antiseptique.

Il est très difficile de déterminer la dose minimale nécessaire à la destruction d'un microorganisme et spécialement de la levure. Différents facteurs interviennent.

Plusieurs auteurs ont réussi à adapter des levures à des doses élevées : Bertin cite le chiffre de 3 gr. /l. SO₂. Laborde et Musso également y parviennent. Mlle Porchet a démontré que ce n'est pas réellement une adaptation mais que le SO₂ libre est progressivement combiné aux aldéhydes produites par la fermentation et ne gêne pas ainsi le développement de la levure.

Il est reconnu que la masse d'ensemencement joue un grand rôle dans cette résistance (Martinand, Dupont, Porchet, Ventre).

Ventre : « Les retards de la fermentation sont en raison « inverse de la quantité de germes introduits dans le milieu ».

Martinand en reprenant les données de Linossier et Hayduk conclut que les levures riches en azote sont plus résistantes que les autres. Ainsi la levure de bière serait moins sensible à cette action que la levure de vin. Martinand prépare même celle-ci comme la levure de bière en la cultivant sur du malt provenant d'orge apte à donner pendant la germination de fortes quantités de N soluble. Ces levures de vin deviennent aussi résistantes que la levure de bière.

Certaines races de levures seraient plus résistantes que d'autres. Ventre sélectionne ainsi la levure elliptique : « Lorsque les quantités d'antiseptique sont trop fortes, sans toutefois être suffisantes pour tuer la levure elliptique, celle-ci tend à gagner la surface du liquide, elle se développe un certain temps au contact de l'air en formant des anneaux sur les parois du récipient ou des voiles. Morphologiquement, elle change alors d'aspect et de ronde ou elliptique qu'elle était au moment de l'ensemencement, elle devient longue, ce qui pourrait la faire confondre avec les mycodermes de la fleur. Lorsque la dose d'acide sulfureux libre a diminué jusqu'à 50 ou 60 mg./l., si on noie ces mycodermes, elles reprennent leurs formes antérieures et leur pouvoir ferment. »

Il écrit également, que l'action de l'antiseptique sera différente, selon que les microorganismes qui y seront soumis se trouveront dans un milieu aqueux ou dans un milieu renfermant des sucres fermentescibles. Dans l'eau, en effet, les cellules se trouvent rapidement en état de dénutrition hydrocarbonée, c'est-à-dire de moindre résistance à l'antiseptique qui agit sur un organisme affaibli. Par contre dans le moût, les cellules turgescentes sont gonflées de sucre.

La résistance, d'autre part, est loin d'être la même à tous les stades de développement de la levure. Elle est plus grande lorsqu'elle atteint son complet développement.

Gimel écrit en 1906 que l'adaptation de la levure à l'acide sulfureux développerait l'activité protoplasmique des cellules en vue de la sécrétion d'une substance oxydante qui, selon Malvezin, déterminerait la casse du vin. Mais cette interprétation a été contredite par Gimel lui-même ensuite.

Certaines levures ont été signalées comme particulièrement résistantes :

Le Schizosaccharomyces liquefaciens Osterwalder.

Kröemer signale une levure du genre Saccharomyces, de même que Mensio.

Loos a distingué des ferments de la caroube isolés par Minkoff, une catégorie de levures ayant un pouvoir marqué de réduction vis-à-vis du bisulfite de Na (Torulopsis).

2. Partie expérimentale : Croissance et production d'alcool d'une levure *préalablement* intoxiquée

Pour se rendre compte exactement de l'action du SO₂ sur le pouvoir alcoologène et la vitesse de croissance de la levure, il est utile de supprimer l'effet exercé par le milieu initial sur le toxique étudié. Cette interférence préjudiciable se complique encore par celle des produits du métabolisme qui, à leur tour, réagissent avec l'acide sulfureux. En conséquence, nous avons renoncé dans les expériences suivantes à la technique habituelle qui consiste à ajouter du SO₂ au milieu de culture où végète l'organisme. Nous avons alors adopté le procédé suivant : Nous avons préparé des éprouvettes contenant 10 cc. de solutions aqueuses titrées de KHSO₃ de concentrations croissantes. Nous avons préparé d'autre part des éprouvettes contenant 10 cc. du milieu S.P.U. Nous avons inoculé toutes les éprouvettes de KHSO₃ par 25 gouttes de culture de levure (3^{me} repiquage sur milieu S.P.U.). Toutes les 15 minutes nous avons repris 25 gouttes de ces éprouvettes KHSO₃ pour les joindre aux éprouvettes contenant le milieu S.P.U. Les levures après un séjour plus ou moins long dans la solution sulfureuse étaient donc transportées dans un milieu sain (S.P.U.), ne contenant pas trace d'acide sulfureux.

Nous avons obtenu ainsi de vastes échelles d'échantillons de culture, nous permettant de contrôler l'effet de la durée de l'intoxication (temps différents pour la même concentration) et l'effet de l'intensité de l'intoxication (concentrations différentes en SO₂ pour les mêmes temps).

Au bout de 15 jours de culture, nous avons contrôlé l'intoxication par des mesures de la croissance et des dosages d'alcool (voir méthodes analytiques) : un témoin étant constitué (passage de levures dans de l'eau distillée) pour chaque temps de contact avec les solutions de SO_2 . Cette technique est comparable à celle employée pour la détermination du coefficient phénol d'un antiseptique.

Un premier essai a été fait pour les 10 concentrations suivantes de SO_2 :

1 : 0,1089 gr. /l.	6 : 0,5968 gr. /l.
2 : 0,2023 »	7 : 0,7014 »
3 : 0,3135 »	8 : 0,7553 »
4 : 0,3979 »	9 : 0,8161 »
5 : 0,4957 »	10 : 0,9006 »

et pour les temps : A : 15 minutes
B : 30 »
C : 45 »

à ensemencement égal : 25 gouttes de pipette Pasteur pour chaque passage.

Les dosages d'alcool ont donné :

A1 2,03	A2 0,922	A3 0,1159	% en volume
B1 2,196	B2 0,7114	B3 0,0756	% en volume
C1 0,8114	C2 0,6818	C3 0,3176	% en volume

Pour la croissance, dans ce premier essai, nous nous étions contentés d'un examen à l'œil nu : évaluation du trouble. Cet examen approximatif a donné :

Au 3 ^{me} jour : trouble	en A1 B1 C1
» 5 ^{me} » : trouble net	en A1 B1 C1
» » » : trouble léger	en A2 A3 A4 A5 A6 A7 A8
» » » : » »	en B2 B3 B4 B5 B6 B7
» » » : » »	en C2 C3 C4 C5 C6
» 6 ^{me} » : fort trouble	en A1 A2
» » » : » »	en B1 B2
» » » : » »	en C1 C2
» 10 ^{me} » : dégagement CO_2	en A1 A2
» » » : » »	en B1 B2

Au 11^{me} jour : dégagement CO₂ en A1 A2

» » » : » » en B1 B2

De ces résultats, on pouvait déduire qu'entre 0,200 et 0,300 gr./l., il existait une dose de SO₂ qui inhibait la fermentation pour une levure de 48 heures dans milieu S.P.U. Déjà la concentration 0,200 gr./l. serait inhibitrice de la fermentation après 45 min. de contact.

Dans un deuxième essai, nous avons ensuite préparé les cinq concentrations suivantes de SO₂ :

1 : 0,1036 gr. /l.	A : 15 minutes
2 : 0,1980 »	B : 30 »
3 : 0,3047 »	pour les temps C : 45 »
4 : 0,3933 »	D : 60 »
5 : 0,4913 »	E : 75 »

Les dosages d'alcool ont été faits après 15 jours et nous avons procédé au comptage des cellules par la cellule Thomas-Zeiss.

Voici les résultats obtenus :

	Alcool en vol. %	Croissance cell. au mm ³		Alcool en vol. %	Croissance cell. au mm ³
AT	1,954	58.700	BT	2,016	38.500
A1	1,7665	60.800	B1	1,3622	36.000
A2	1,8346	46.000	B2	1,9202	36.400
A3	1,8346	58.100	B3	1,948	38.500
A4	1,943	36.000	B4	1,9442	45.500
A5	2,216	22.000	B5	2,282	17.600
CT	1,8598	41.000	DT	1,943	39.500
C1	1,8724	31.000	D1	2,054	53.900
C2	2,172	40.800	D2	1,9132	35.200
C3	2,136	26.500	D3	2,084	35.200
C4	2,136	57.100	D4	1,650	54.900
C5	1,742	11.000	D5	1,3104	4.000
ET	2,006	65.800			
E1	2,20	40.000			
E2	2,012	51.000			
E3	2,058	29.500			
E4	2,132	28.400			
E5	0,9652	5.200			

On constate ici, à la 5^{me} concentration seulement (0,4913 gr./l.), une altération du pouvoir alcoologène et au bout de 45 minutes de contact seulement (temps C.D.E.). Tandis que la croissance serait déjà sérieusement attaquée à la 4^{me} concentration (0,3923 gr./l.) et faiblement à la 1^{re} concentration, mais toujours au bout de 45 minutes.

Les chiffres obtenus par le comptage à la cellule Thomas-Zeiss sont trop irréguliers, car à chaque comptage l'erreur peut être reproduite, et les comparaisons ne sont guère valables ; c'est pourquoi, pour les essais postérieurs, nous avons utilisé une autre méthode pour cette mesure.

On ne peut, d'après ces deux essais, fixer le chiffre absolu de la teneur en SO₂ antiauxique et antifermentaire. Elle dépend des conditions d'ensemencement, de l'état de la culture de départ qui, malgré nos précautions ne peut être absolument identique.

La durée de contact semble avoir une influence plus marquée sur la toxicité du SO₂ que la concentration en SO₂, à condition de ne pas trop élever cette dernière.

Nous avons fait un troisième essai, pour nous assurer s'il y avait parallélisme entre la réduction de la croissance et la réduction du pouvoir fermentaire.

Toujours selon la même technique, nous avons préparé 4 solutions de KHSO₃ :

1 : 0,2628 gr./l.	A : 15 minutes
2 : 0,5141 »	B : 30 »
	pour les temps C : 45 »
3 : 0,7464 »	D : 60 »
4 : 0,9329 »	E : 75 »

Nous avons fait les dosages d'alcool après 15 jours et les mesures de croissance par néphélométrie à l'aide de l'électrophotomètre Meunier, pour lequel nous avons établi un abaque sur une suspension évaluée par la cellule Thomas-Zeiss. Nous avons toujours fait des mesures en suspension dans de l'eau distillée, après lavage par centrifugation, pour que les éléments du milieu fermenté ne viennent pas gêner la lecture du photomètre.

Cette méthode nous donnait des résultats comparables les uns aux autres.

Nous avons obtenu les résultats suivants :

	Alcool en vol. %	Croissance cell. au mm ³		Alcool en vol. %	Croissance cell. au mm ³
AT	2,096	22.000	BT	2,48	32.000
A1	1,84	8.100	B1	1,84	10.500
A2	0,515	5.600	B2	0,798	8.300
A3	0,4272	6.200	B3	0,3528	5.000
A4	0,6128	7.700	B4	0,3008	4.600
CT	2,356	30.800	DT	—	18.800
C1	1,128	11.500	D1	1,268	26.700
C2	0,448	3.400	D2	0,339	7.300
C3	0,3104	5.600	D3	0,1696	3.800
C4	0,188	8.100	D4	0,000	2.600
ET	2,56	37.000			
E1	1,024	29.600			
E2	0,4176	9.300			
E3	0,1936	600			
E4	0,000	400			

Pour mieux nous rendre compte de l'effet sur les fonctions de croissance et de fermentation, nous avons exprimé ces résultats en les rapportant à une moyenne des témoins :

$$2,4\% \text{ en vol. d'alcool} = 100\%$$

$$30.000 \text{ cellules au mm}_3 = 100\%$$

et nous avons établi pour chaque temps les courbes des chiffres ainsi obtenus pour les différentes concentrations (voir figure 9).

D'après ces croquis, on voit immédiatement que la concentration 1 est intéressante (0,262 gr./l.), car à cette concentration la croissance et la fermentation sont atteintes différemment suivant la durée de contact.

Nous avons alors établi la courbe de l'effet de la durée de contact pour la concentration 0,262 gr./l., que nous avons nommée « courbe en croix » (voir fig. 10).

Nous mettons ainsi nettement en évidence ce phénomène : la croissance semble retrouver le 100% à mesure que la fonction alcoologène est atteinte. Ce phénomène est très régulier puisqu'il se confirme par les 5 points obtenus aux différents temps.

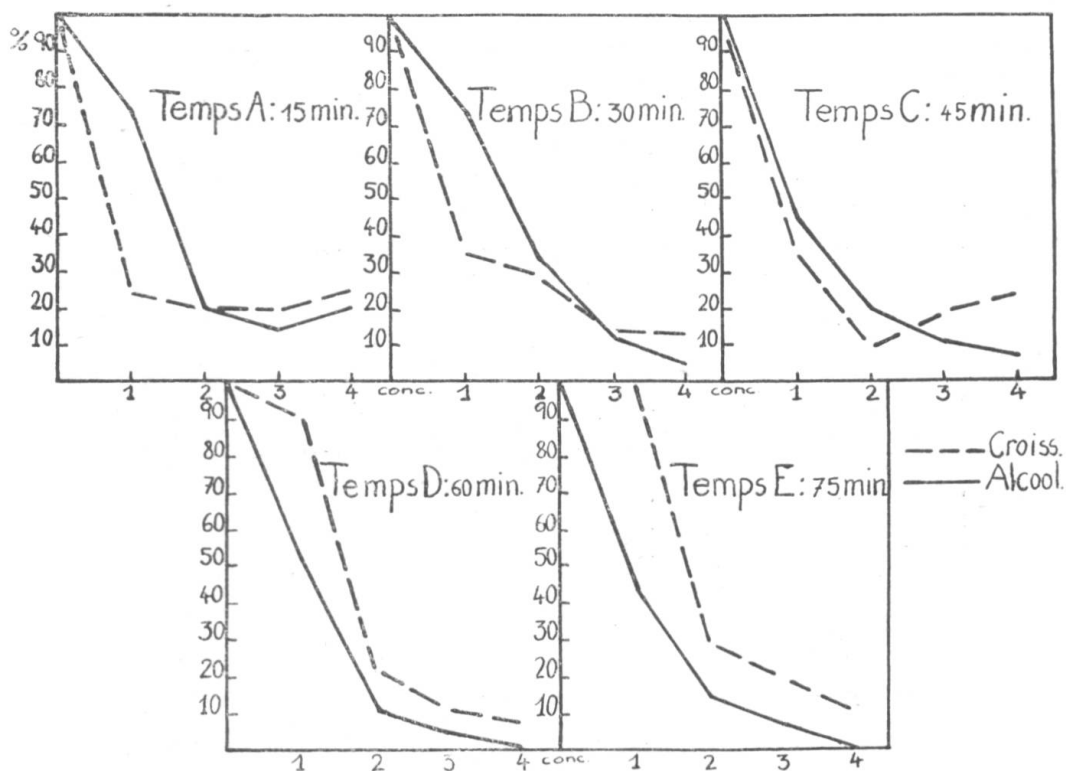


FIGURE 9

Axes des abscisses : concentrations de SO_2
 Axes des ordonnées : pourcentage des valeurs des fonctions croissance et alcool.

Serions-nous en présence d'un phénomène de défense de l'organisme qui, pour se protéger de l'intoxication sulfureuse, intensifie sa fonction croissance ? La levure atteinte dans sa fonction alcoolique réagirait en utilisant le sucre offert à d'autres fins (accumulation de réserves) dont la conséquence serait une croissance plus intense ? Nous aurions là un effet comparable au phénomène de resynthèse de Pasteur-Meyerhof produit par une aération du milieu, ce facteur étant remplacé par une altération de la zymase.

On pourrait rapprocher ces observations de celles de Ventre sur le changement d'aspect des cultures de la levure elliptique en présence d'acide sulfureux, celles-ci tendant à venir à la surface et à former des voiles et des anneaux sur les parois du récipient.

L'examen de nos cultures au microscope a révélé de plus grosses plages de glycogène, mises en évidence par le lugol, que dans les milieux témoins.

Nous avons tenté de retrouver cette « courbe en croix » par d'autres essais, mais nous n'avons jamais pu retrouver ni la concentration, ni surtout les conditions absolument identiques car en effet, cette résistance dépend de la masse d'ensemencement, des conditions d'âge, d'état des cultures au départ.

Malgré nos précautions nous n'avons pu retrouver ce point qui est probablement très passager.

Dans un essai aux concentrations et aux temps suivants

1 : 0,1573 gr. /l.	A : 15 minutes
2 : 0,2242 »	B : 30 »
3 : 0,259 »	C : 45 »
4 : 0,3474 »	D : 60 »
5 : 0,4011 »	E : 75 »
	F : 90 »
	G : 105 »

nous avons pu souligner deux points pour lesquels la croissance était plus résistante que le pouvoir fermentaire.

Dans un autre essai, nous avons encore étendu les temps de contact jusqu'à 7 heures 30 min. :

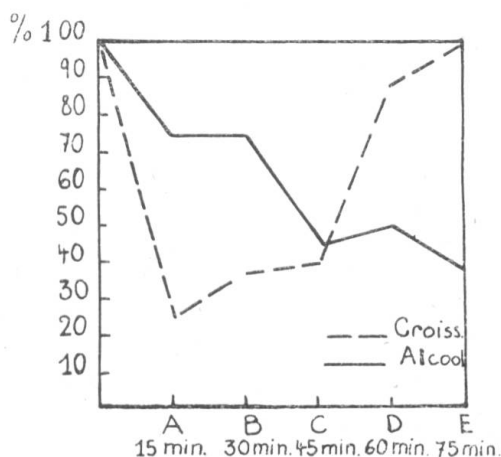


FIGURE 10

Axe des abscisses : temps de contact.
Axe des ordonnées : pourcentage des valeurs des fonctions croissance et alcool.

<i>Concentrations</i>	<i>Temps</i>	
1 : 0,09887 gr. /l.	A : 30 min.	E : 4 h. 30
2 : 0,2263 »	B : 1 heure	F : 5 h. 30
3 : 0,3412 »	C : 1 h. 30	G : 6 h. 30
4 : 0,4561 »	D : 3 h. 30	H : 7 h. 30
5 : 0,553 »		

Ce dernier essai, sans nous donner la « courbe en croix », nous a cependant démontré que l'effet toxique de l'acide sulfureux sur la croissance et la fermentation dépend surtout de la durée de contact ; or un contact avec l'eau distillée de même durée (témoins) n'exerce pas d'influence sur la croissance des levures. Il faut tenir compte de l'observation de Ventre sur la résistance au SO_2 , différente d'une levure en milieu aqueux et en milieu riche en sucre.

D'une manière générale, le pouvoir fermentaire et la croissance seraient atteints parallèlement, cependant, dans ce dernier essai, nous avons également obtenu pour deux temps de contact une moindre résistance de la fonction alcooligène que de la croissance pour les concentrations étudiées.

Nous pouvons conclure à une intoxication qui porte premièrement et plus profondément sur la fonction alcooligène. Notre « courbe en croix » met en évidence le point critique de cette intoxication. Nous avons pu surprendre l'adaptation très temporaire que la levure présente à un moment précis de l'expérience au-delà duquel, nous aurions l'arrêt total de la fermentation et de la croissance.

B. — ACTION DU SO_2 SUR LA FERMENTATION

1. Partie bibliographique

La littérature contient quelques études de l'effet du SO_2 sur le mécanisme fermentaire ; aucune d'entre elles n'a été établie sur les notions modernes acquises dans le domaine de la fermentation alcoolique. Ce caractère tient en partie

à l'ancienneté de ces recherches. Ces indications qualitatives concernent surtout le retard du début de la fermentation. Une mention est faite à propos de l'excès d'acétaldéhyde observé dans une fermentation bisulfitée. Cependant l'étude de l'action du SO₂ sur les substances intermédiaires et finales de la fermentation alcoolique n'a pas été faite à notre connaissance. Le prochain paragraphe tentera de combler cette lacune.

Martinand en 1909 écrit : « La fermentation alcoolique « en présence de SO₂ additionné au moût, quand elle se produit, se fait par élimination du SO₂ par l'intermédiaire « des aldéhydes produites par la levure car celles-ci en donnent plus en présence de SO₂. »

Et en 1910 : « Le dosage d'acétaldéhyde montre qu'il « s'en est formé beaucoup (165 mg. /l.) ».

En 1916, Laborde rappelle que c'est Passerini qui, en 1909 aurait, le premier, vu que la combinaison a lieu sous forme d'acide aldéhyde-sulfureux car il avait observé une production d'aldéhyde plus abondante dans le moût sulfité que dans le moût non sulfité. (Cependant Kerp fait l'étude de cette combinaison en 1904.)

Laborde relate une expérience de Peltier faite sous ses yeux dans laquelle cette forte production d'aldéhyde est mise en évidence. Celle-ci se trouverait en rapport de moitié avec la quantité d'acide sulfureux combiné : Le calcul montre que plus de la moitié doit être combiné à d'autres substances. Rappelons que Peltier travaille sur du moût dont le pouvoir propre de fixation a été démontré.

Laborde signale que la présence d'acide sulfureux combiné dans le moût en fermentation peut modifier l'action physiologique de la levure dans le sens d'une production plus abondante d'aldéhyde. Il étudie les variations de l'activité de la fermentation en présence de SO₂ par des mesures de CO₂ dégagé par 100 cc. de moûtensemencé par des traces de levure à 15° et 25° et constate que l'influence de l'antiseptique s'exerce surtout au début de la fermentation puis, lorsque la proportion de sucre est très diminuée dans le

témoin, la fermentation avec SO_2 tend à rattraper le temps perdu. Cette action serait plus sensible à 15° qu'à 25° . Il constate, par d'autres essais, une variation des propriétés électives des levures : le rapport glucose/lévuiose, de 1 s'abaisse à 0,5 au cours de la fermentation normale ; la présence de SO_2 semble favoriser l'action des levures sur le lévuiose. Serait-ce dû à une modification du protoplasme ?

D'autre part, toujours selon Laborde, les vins qui ont fermenté en présence de SO_2 deviennent plus aptes à capter du SO_2 que les vins fermentés sans acide sulfureux, car ils contiennent plus d'aldéhyde, ce qui augmente leur capacité de combinaison.

Il nous reste à parler des remarques faites par quelques auteurs sur le goût et l'odeur sulfhydriques des vins et moûts fermentés en présence d'acide sulfureux (Mathieu, Balavoine). Ce fait est attribué généralement à une fonction réductrice de la levure (voir thèse Loos). Laborde en 1914 et 1915 ajoute que ces propriétés réductrices de la levure seraient dues à la sécrétion d'une hydrogénase (Rey, Pailhade) qui peut agir sur le soufre et certains de ses composés tels que l'acide sulfureux et les sulfates. L'hydrogène sulfuré et son éther méthylique, le mercaptan communiqueraient au vin un goût et une odeur d'œufs pourris d'intensité variable qui disparaîtraient au bout d'un certain temps après une aération suffisante. Cette réduction cependant, ne se produirait pas exclusivement pendant la fermentation car on peut la constater dans le vin fait.

Fromageot et Moubacher montrent que le *B. Coli* provoque le dégagement de SH_2 à partir de cystine et de cystéine à condition qu'il existe dans le milieu soit du glucose, soit de l'acide lactique, soit de l'acide formique. Cette production de SH_2 n'est accompagnée ni de la désamination ni de la décarboxylation de l'acide aminé. Cette préparation provoque également le dégagement de SH_2 à partir du glutathion, sans que la présence du glucose soit nécessaire.

Ils n'ont cependant pas obtenu de résultat en traitant la levure dans les mêmes conditions.

2. Partie expérimentale : Métabolisme de la levure *croissant* en milieu bisulfité

Nous avons analysé le caractère de la fermentation bisulfitée en procédant à des dosages quotidiens du produit initial (glucose), intermédiaire (acétaldéhyde) et final (alcool). (Voir méthodes analytiques.)

Nous avons parallèlement contrôlé le titre de l'acide sulfureux libre et total dans les fermentations des liqueurs bisulfitées. En outre, nous avons contrôlé l'acidité, et à la fin de l'opération nous avons déterminé les acides volatils. Ces fermentations ont été faites sur 2,5 litres de milieu S.P.U. (10% glucose et 1 gr./l. biomalt) dans de grands flacons cylindriques (Iéna) d'une contenance de 3 litres, bouchés au coton, encapuchonnés de papier et portés à l'étuve à 25° C. Le bisulfitage a été fait à l'aide d'une solution concentrée de NaHSO₃ et a précédé immédiatement l'ensemencement.

Le flacon témoin a été inoculé en même temps et par la même quantité : 50 cc. de milieu S.P.U., prélevés stérilement des 2,5 litres dans un erlenmeyer stérile, inoculé par 25 gouttes de suspension de 48 heures (troisième repiquage), sont joints au flacon de fermentation après 48 heures.

Nous avons fait les différents dosages sur des prélèvements stériles quotidiens de 100 cc. Dans un premier essai pour lequel, nous n'avons pas fait les dosages d'acétaldéhyde, nous avons obtenu les chiffres contenus dans le tableau I.

Ces chiffres nous montrent déjà, que le glucose n'est pas entièrement consommé après 18 jours ; par conséquent, la liqueur bisulfitée n'atteint pas la teneur en alcool du témoin.

Un deuxième essai, dont les résultats sont indiqués dans le tableau II, nous montre de nouveau ce même phénomène de consommation incomplète du glucose.

Ce phénomène est illustré par les courbes suivantes (voir fig. 11) qui comparent la consommation du sucre dans les deux milieux.

TABLEAU I

Dates		Ac. sulfureux		Glucose		Alcool			
n. jrs	date	libre gr./l.	total gr./l.	A g/l.	B g/l.	en poids		en volume	
						A g/l.	B g/l.	A %	B %
0	2.3	0,1426	0,259	—	—	—	—	—	—
1	3.3	0,099	0,2387	—	—	—	—	—	—
2	4.3	0,0087	0,195	74,0	77,5	—	—	—	—
3	5.3	0,0058	0,1863	85,0	81,0	—	—	—	—
4	6.3	0,0058	0,164	78,0	75,0	—	—	—	—
6	8.3	0,0073	0,1834	66,0	63,0	8,6	9,6	1,08	1,21
7	9.3	0,0044	0,1281	59,5	56,9	18,6	20,8	2,35	2,70
8	10.3	0,0087	0,1746	49,5	49,5	19,8	22,0	2,50	2,77
9	11.3	0,0044	0,1688	43,0	43,0	29,5	23,5	3,75	2,97
10	12.3	0,0058	0,1688	45,0	37,8	25,6	29,0	3,26	3,65
11	13.3	0,0058	0,1717	37,0	28,0	28,0	30,5	3,55	3,87
13	15.3	0,0044	0,1746	20,7	20,7	33,0	37,4	4,16	4,75
14	16.3	0,0044	0,1688	30,0	16,3	34,0	48,5	4,3	6,11
15	17.3	0,0058	0,1688	23,4	8,3	31,6	39,5	4,04	5,0
17	19.3	0,0058	0,1688	18,9	3,6	40,0	48,5	5,1	6,11
18	20.3	0,0058	0,1746	15,8	0,36	40,0	50,0	5,1	6,3

A = flacon bisulfité ; B = flacon témoin

TABLEAU II

Dates		Ac. sulfureux		Glucose		Alcool				Acétaldéhyde	
n. jrs	date	libre gr./l.	total gr./l.	A g/l.	B g/l.	en poids		en volume		A g/l.	B g/l.
						A g/l.	B g/l.	A %	B %		
0	29.5	0,121	0,2219	—	89,0	—	—	—	—	—	—
1	30.5	0,0529	0,1959	83,0	83,0	—	—	—	—	0,267	0,128
2	31.5	0,0094	0,1653	86,0	78,0	4,5	6,35	0,57	0,86	0,292	0,110
3	1.6	0,0118	0,1086	82,0	75,5	5,4	5,5	0,68	0,69	0,282	0,115
4	2.6	0,0047	0,1487	83,0	79,0	8,1	9,1	1,02	1,15	0,256	0,098
6	4.6	0,0078	0,1086	63,0	51,2	12,59	16,2	1,58	2,07	0,295	0,126
7	5.6	0,0078	0,1274	58,5	49,5	14,0	20,0	1,76	2,5	0,286	0,123
9	7.6	0,0047	0,1274	56,7	41,5	15,2	23,0	1,91	2,9	0,253	0,125
10	8.6	0,0078	0,118	55,9	39,5	19,2	27,0	2,42	3,40	0,255	0,105
11	9.6	0,0047	0,1274	53,0	31,5	16,2	24,5	2,05	3,09	0,255	0,137
13	11.6	0,0078	0,1416	47,0	19,9	15,6	34,6	1,97	4,35	0,239	0,118
17	15.6	0,0078	0,1206	36,5	5,4	29,5	42,3	3,7	5,32	0,239	0,137
20	18.6	0,0078	0,0899	29,6	1,17	32,5	45,5	4,07	5,75	0,231	0,110
24	22.6	0,0078	0,1133	—	0,27	27,5	47,5	3,45	6,0	0,230	0,098

A = flacon bisulfité ; B = flacon témoin

Nous ne pouvons expliquer cette consommation incomplète du glucose. Si réellement nous avons eu une combinaison glucose-bisulfite, celle-ci ne devrait pas empêcher, selon Neuberg, la fermentescibilité du glucose ainsi lié (voir prop. physico-chimiques). L'expérience a été poussée jusqu'au 24^{me} jour ; dès le 18^{me} jour on n'observait plus sur le flacon de mouvement fermentaire : le liquide était à l'état de repos et la fermentation semblait donc bien achevée. On

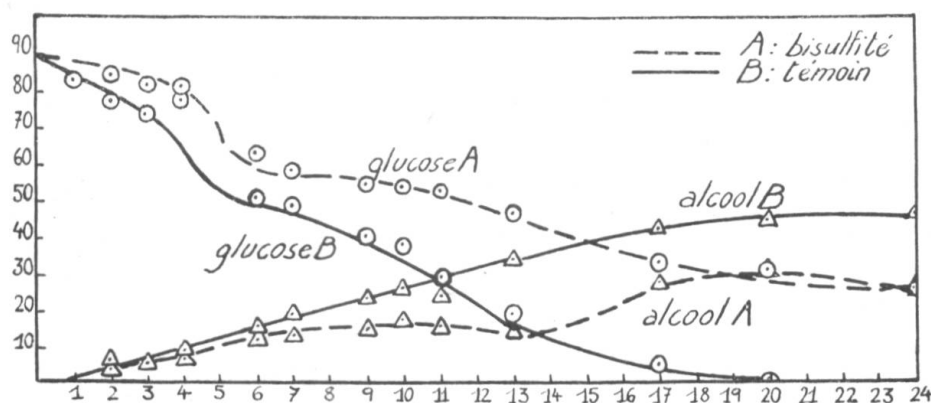


FIGURE 11

Axe des abscisses : nombre des jours

Axe des ordonnées : valeurs de glucose et d'alcool en gr./l.

ne peut, en conséquence, attribuer cette consommation incomplète du glucose à un simple retard de fermentation. Cette insuffisance dépendrait de l'intoxication de la levure ou des conditions très particulières réalisées par le contact du SO₂ avec un milieu sucré stérilisé.

Cette observation aurait un intérêt pour la pratique dans la mesure où l'on peut comparer le milieu S.P.U. au moût naturel.

Les chiffres obtenus pour l'acétaldéhyde (voir tableau II) sont très démonstratifs. Ils constituent une première démonstration expérimentale confirmant certaines des suppositions émises par Martinand et Laborde. Nous enregistrons en effet une production plus forte d'acétaldéhyde en milieu bisulfite que dans le témoin.

Il convient maintenant de rappeler les résultats concernant la « fixation » du SO_2 en milieu normal (S.P.U.) bisulfite : ce dernier « fixe » rapidement la presque totalité de l'acide sulfureux (voir § B de la première partie).

Une nouvelle preuve nous est fournie par les troisième et quatrième colonnes des tableaux I et II. Ces faits nous conduisent à poser la question suivante : le supplément d'acétaldéhyde formé en milieu bisulfite est-il responsable de la fixation plus intense observée dans ce milieu ?

Si nous calculons le rapport moléculaire entre l'acide sulfureux combiné et le supplément d'aldéhyde nous obtenons les valeurs du tableau III.

Le rapport des quantités d'acétaldéhyde produite en supplément aux quantités d'acide sulfureux combiné est

TABLEAU III

n. jrs	I	II	III	Rapport III/I.
	Acétald. supplém.	SO_2 combiné	SO_2 combiné exp. en acétald.	
	gr. /l.	gr. /l.	gr. /l.	%
1	0,141	0,143	0,098	69,9
2	0,182	0,165	0,107	59,0
3	0,167	0,0868	0,06	36,0
4	0,158	0,134	0,092	58,0
6	0,169	0,1008	0,0685	43,0
7	0,163	0,1196	0,083	51,0
9	0,128	0,1237	0,085	66,5
10	0,150	0,1102	0,076	50,5
11	0,118	0,1237	0,085	72,0
13	0,121	0,1328	0,093	76,5
17	0,102	0,1128	0,078	76,0
20	0,121	0,0821	0,056	46,5
24	0,144	0,1151	0,079	59,0

p.m. SO_2 = 64 ; p.m. CH_3CHO = 44

toujours inférieur à l'unité (ou à 100%). La quantité d'aldéhyde produite dépasse donc celle qui est nécessaire à la combinaison de l'acide sulfureux : 30-60% de supplément. La « fixation » en milieu inoculé s'explique donc par la production d'acétaldéhyde au cours de la fermentation.

Les mesures relatées montrent que même après fixation du SO₂, il reste une quantité d'acétaldéhyde supérieure à celle du témoin. Les transformations subséquentes subies par cet acétaldéhyde pourront modifier le cours normal de la fermentation.

C'est pourquoi nous avons fait après 27 jours une détermination des acides volatils selon la méthode de Duclaux.

L'acidité contrôlée les 10 derniers jours ne semble pas avoir varié et donnait :

pour le milieu bisulfité gr. /l. 2,46 en acide tartrique

pour le milieu témoin gr. /l. 2,05 en acide tartrique

Pour la détermination des acides volatils, nous avons filtré ce qui nous restait des milieux fermentés et nous en avons concentré 1 litre à moins de 100 cc. à un pH alcalin. Puis nous avons opéré la distillation fractionnée selon Duclaux et obtenu les chiffres suivants comparés à ceux de Duclaux :

A. Milieu bisulfité

Fractions cc.	NaOH N/20 cc.	%	Duclaux Ac. acétique 5 Ac. butyrique 1
10	7,1	10,8	—
20	13,4	20,5	—
30	18,9	28,6	27,4
40	25,2	38,3	36,7
50	30,0	45,5	45,8
60	36,0	54,5	55,3
70	42,3	64,0	65,2
80	49,7	75,3	75,3

B. Milieu témoin

Fractions cc.	NaOH N/20 cc.	%	Duclaux ac. acét. pur %	Duclaux a. ac. 10 a. but. 1 %
10	3,2	7,9	7,4	—
20	6,5	11,2	15,2	—
30	9,9	24,5	23,4	25,6
40	13,6	33,6	32,0	34,5
50	17,2	42,5	40,9	43,6
60	21,3	52,9	50,5	53,1
70	25,5	63,0	60,9	63,2
80	30,1	74,9	71,9	73,8
90	35,0	87,0	84,4	—
100	40,3	100,0	100,0	—

La comparaison de nos chiffres avec ceux de Duclaux indique que l'acidité volatile du témoin est constituée par de l'acide acétique presque pur, comportant au plus $\frac{1}{11}$ d'acide butyrique. Dans le milieu bisulfité nous décelons par contre de l'acide acétique avec $\frac{1}{6}$ d'acide butyrique.

D'autre part, le calcul approximatif des quantités d'acides volatils dans les deux milieux donne 0,4866 gr./l. dans le témoin et 0,79 gr./l. dans le milieu bisulfité, exprimé en acide acétique.

Nous pouvons résumer ces faits de la manière suivante :

Le bisulfitage du milieu S.P.U. inoculé par la levure L 21 augmente le taux des acides volatils et en modifie la composition : l'acide acétique diminue au profit de l'acide butyrique.

Cette production supplémentaire d'acide butyrique due au bisulfitage s'intègre dans la théorie suivante : le mécanisme le plus probable de la lipogenèse passe par le stade acide acétique, aldol, acide butyrique.

Il y a lieu de se demander si l'acide butyrique dont la production est stimulée par le bisulfitage joue un rôle dans l'accumulation des lipides par la levure. Nous n'avons certes pas vérifié « l'engraissement » des levures soumises à ce

régime. Cependant il est prouvé¹ que les levures se trouvant dans un milieu riche en acétaldéhyde s'enrichissent en lipides. Si même cet acétaldéhyde est bloqué par du sulfite de Na, la lipogenèse est ralentie². Notre propre observation paraît ici paradoxale car c'est le bisulfite de Na qui a provoqué la formation d'acide butyrique que nous supposons échelon de la lipogenèse. Rappelons que cet acide butyrique a été formé aux dépens d'un excès d'acétaldéhyde libre, excès dû à la présence du bisulfite de Na qui a stimulé sa formation.

Nous aurions donc ici une action indirecte et favorable de l'acide sulfureux sur le processus de la lipogenèse.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Dans notre *première partie* intitulée le « Sort de l'acide sulfureux dans les liquides fermentescibles » :

1. Nous avons établi une séparation entre l'étude des milieux non inoculés et celle des milieux inoculés.

2. Pour l'étude des premiers, nous avons rappelé les données bibliographiques concernant : l'équilibre réalisé entre l'acide sulfureux libre et combiné, la « fixation » du SO₂ et enfin la « destruction » du SO₂.

3. Nous avons relaté nos essais sur le moût de raisin, montrant l'influence de la température sur les capacités de « fixation » et de « destruction » de ce moût. La « destruction » est augmentée jusqu'à 100° et au delà c'est la « fixation » qui est favorisée. La température de stérilisation exalterait la capacité du moût de raisin de fixer le SO₂.

4. Nous avons établi un milieu de culture synthétique dit S.P. pour le substituer dans nos études au moût de raisin de composition mal connue et variable.

¹ Raaf S. H. Archiv. für Mikrobiologie 1941. 12, p. 131.

² Smedley. I. Zentralbl. Physiol. 1912. 26, p. 915.

5. Nous avons reconnu à ce milieu S.P. une action « destructrice » rapide et considérable du SO_2 , action que nous avons pu attribuer à l'asparagine.

6. D'autres essais nous ont montré que le glycocolle et l'acide aspartique sont également responsables de la « destruction » de l'acide sulfureux à condition d'être à un pH inférieur à celui de leur point isoélectrique.

7. Nous avons remplacé dans le milieu synthétique S.P. l'asparagine par de l'urée. Ce second milieu dit S.P.U., étudié pour différentes concentrations, stabilise le titre de l'acide sulfureux libre à un niveau propice à nos essais biologiques.

8. Nous avons résumé les données bibliographiques relatives au sort de l'acide sulfureux dans les milieux inoculés.

9. Nous avons vérifié le rôle exact que joue des levures dans la disparition de l'acide sulfureux libre. En confirmation de Mlle Porchet, nous avons pu montrer par des passages de levures débarrassées de leur liqueur de fermentation et ensuite par des passages de cette liqueur dans des solutions titrées de KHSO_3 , que seule la liqueur était responsable de cette disparition d'une manière sensible.

10. Nous avons étudié le comportement de l'acide sulfureux dans le moût de raisin inoculé et nous avons constaté une intense et rapide « fixation ». Le même phénomène est observé dans les milieux S.P. et S.P.U. Ici un fait paradoxal : le milieu S.P. inoculé conserve l'acide sulfureux à l'état combiné, alors que non inoculé il « détruit » la totalité du SO_2 .

Dans notre *seconde partie* intitulée « Etude de l'intoxication sulfureuse » :

1. Nous avons séparé l'action de cet antiseptique sur la levure elle-même de l'action sur la fermentation.

2. Nous avons rappelé les données de la littérature concernant l'action antiseptique de l'acide sulfureux sur la levure.

3. Nous avons étudié la croissance et la production d'alcool d'une levure préalablement intoxiquée. Nous avons

conclu que les deux fonctions vitales de la levure sont atteintes parallèlement. Cependant, nous avons pu surprendre un stade de l'intoxication caractérisé par la réaction suivante de la levure : alors que la fonction alcoologène de la levure est altérée progressivement par le contact avec l'acide sulfureux, la fonction croissance s'exalte ; la durée du contact de cette solution KHSO₃ rétablit temporairement, chez la levure intoxiquée, son pouvoir de croissance normal. L'intoxication porte premièrement et plus profondément sur la fonction alcoologène.

4. Nous avons rappelé les données des auteurs concernant l'action du SO₂ sur le métabolisme fermentaire.

5. Nous avons contrôlé le métabolisme fermentaire d'une levure croissant en milieu bisulfité par des dosages quotidiens de glucose, d'acétaldéhyde, d'alcool et d'acide sulfureux.

6. Nous avons constaté une consommation incomplète du glucose dans le milieu bisulfité entraînant une moindre production d'alcool.

7. Nous avons trouvé une teneur en acétaldéhyde beaucoup plus forte dans le flacon bisulfité que dans le témoin. Un calcul du rapport moléculaire entre l'acétaldéhyde supplémentaire au témoin et l'acide sulfureux combiné montre que cette quantité supplémentaire d'acétaldéhyde dépasse celle qui était nécessaire à la combinaison de l'acide sulfureux présent.

8. Cet excédent d'acétaldéhyde semble entraîner un changement dans le taux et la composition des acides volatils produits par fermentation en milieu bisulfité. Nous constatons à côté de l'acide acétique, la formation d'acide butyrique, échelon probable de la lipogénèse dans la levure.

*Institut de Botanique Générale.
Laboratoire de Microbiologie et
Fermentations. Genève.*

BIBLIOGRAPHIE

1. BACH, M. D. — « Sur une méthode applicable à la détermination du point isoélectrique des amino-acides. Cas de l'asparagine et glycolle ». Bull. Soc. Chim. Biol. nov. 1927. 9. 1233.
2. BALAVOINE, P. — « De la sensibilité du goût à l'acide sulfureux dans les vins ». Trav. Chim. Alim. et Hyg. 1925. Vol. XVI, fasc. 4, p. 133.
3. BENVIGNIN, L. et CAPT, E. — « Du dosage de l'acide sulfureux libre et total dans les vins rouges ». Trav. Chim. Alim. et Hyg. 1931, vol. XXII, fasc. 5, p. 365.
4. BERTIN, Charles. — « L'autodésulfitage des moûts ». Bull. Soc. Ind. Rouen, 52, 427 (1924).
5. COLLIER, D. — « Désacidification et départ en fermentation des moûts de raisin sulfités ». « Rôle du pH dans la détermination des doses antiseptiques d'anhydride sulfureux ». Annales des Ferm. t. IV, n° 3, mars 1938, p. 167.
6. DOPP, W. — « Über die Wirkung der schwefligen Säure auf Blütorgane ». Ber. über Physiologie, 64, p. 484.
7. DUGAST, I. — « Vinification dans les pays chauds ». Paris, G. Carré et C. Naud. Ed. 1900.
8. DUJARDIN et SALLERON. — « Notice sur les instruments de précision appliqués à l'œnologie ». 5^me éd. Paris.
9. DUPONT, E. — « L'acide sulfureux en vinification » (Sulfitage des vendanges). Rev. de Viticult. 1908, t. II, p. 230, 253, 284, 309.
10. FROMAGEOT, Cl. et MOUBACHER, R. — « Sur la production enzymatique d'hydrogène sulfuré à partir de dérivés organiques sulfurés ». Ann. Ferm., t. III, 1934, p. 305.
11. GIMEL, G. — « L'acide sulfureux et la casse des vins ». Rev. Vit. 1906, p. 218.
12. GAILLARD. — « Contribution à l'étude de l'action bactéricide et antimicrobienne des vins et des boissons alcooliques ». Trav. Chim. Alim. et Hyg. 1911, vol. II, fasc. 3, p. 47.
13. HAGGLUND, Erik. — « Schweflige Säure und Hefegärung ». Biochem. Zeitsch. Bd. 103, H 4/6, S. 299-305. 1920.
14. HAILER, E. — « Versuche über die Entwicklungshemmenden und keimtötender Eigenschaften der freier schwefligen Säure, der schwefligsäuren Salze und einiger komplexen Verbindungen der schwefligen Säure ». Biochem. Zentralblatt, 10, 1884.
15. HALLER, P. — « The Determination of sulphites and sulphur dioxide in gaseous mixtures ». Journ. of the Soc. of Chem. Industry, 38, 52 T. 1919.
16. HUBERT, A. D^r, et BAILLY, A. — « Une levure qui résiste à l'acide sulfureux ». Rev. Vit. 1925, 2, p. 311.
17. JACQUEMIN, G. — « Les fermentations rationnelles ».
18. KERP, W. — « Über die schwefligen Säure im Wein ». Chem. Zentralbl. 1904, 57.

19. KERP, W. — « Zur Kenntniss der gebundenen schwefligen Säure ». Arb. an d. K. g. Berlin, 21, 180 u. f. 1904.
20. KERP, W. et BAUR, E. — « Zur Kenntniss der gebundenen schwefligen Säure ». 3. Abhandlung : Über glucoseschweflige Säure. Chem. Zentralbl. 1907, II, 971.
21. KRÖEMER, K. — « Versuche über die Verbesserung der Weingärung durch Entschleimen der Moste ». Landw. Jahrb. 52, 1919. Ergebnisse, p. 103, Berlin.
22. LABORDE, J. — « Emploi de l'acide sulfureux en vinification ». Rev. de viticult. 1914-1915, 93.
23. LABORDE, J. — « L'acide sulfureux combiné dans les moûts et les vins ». Rev. de viticult. 1916, p. 309, 373, 421, 437, 453.
24. LOOS, E. W. — « Bases physiologiques du caractère de sulfito-résistance des levures ». Thèse n° 995, Genève, 1938.
25. MALVEZIN, P. — « L'acide sulfureux et la casse des vins ». Rev. Vit. 1906, 159.
26. MARTINAND, V. — « L'acide sulfureux en vinification. Ce que devient l'acide sulfureux dans la vinification en rouge à l'aide du métabisulfite de potasse et des levures cultivées ». Rev. Vit. 1907, 2, p. 177.
27. MARTINAND, V. — « Interprétation théorique des réactions qui s'opèrent dans la vinification en rouge à l'aide des composés sulfureux ». Rev. Viticult. 1909, 2, p. 346-376.
28. MARTINAND, V. — « Action des composés sulfureux dans la vinification et dans la conservation des vins ». Rev. Viticult. 1910, 1.
29. MATHIEU, L. — « Goûts sulfhydriques ». Rev. Viticult. 1934, 2, p. 337.
30. MONTEIRA, Francesco. — « Recherches expérimentales sur la valeur antiseptique du gaz sulfureux ». C. r. Soc. Biol. Paris, 101, p. 387-388, 1929.
31. MOREAU, L. et VINET, E. — « L'acide sulfureux en vinification ». Rev. de Viticult. 1926, 2, p. 112.
32. MOREAU, L. et VINET, E. — « Les levures sélectionnées en vinification ». Ann. Ferm. 1935, p. 101.
33. MOREAU, L. et VINET, E. — « Détermination du pouvoir antiseptique réel de l'acide sulfureux dans les moûts et les vins, ses variations suivant l'acidité du milieu ». Rev. Viticult. 1937, 2, p. 25.
34. MULLER, H., THURGAU et OSTERWALDER, A. — « Einfluss der schwefligen Säure auf die durch Hefen und Bakterien verursachten Gärvorgänge im Wein und Obstwein ». Landw. Jahrb. der Schweiz. 1914, S. 480-548.
35. MULLER, H., THURGAU et OSTERWALDER, A. — « L'emploi de l'anhydride sulfureux pour empêcher le brunissement des vins sans nuire à la formation d'acide malique ». Trav. de Chim. Alim. et Hyg. Bibliog. 1925, vol. XVI, fasc. 2, p. 70.
36. MUSSO, L. — « Variation de l'anhydride sulfureux libre et combiné dans les moûts sous l'action de la chaleur ». Bull. Soc. Ind. de Rouen, 52, 523 (1924).

37. NIELSEN, Niels et HARTELIUS. — « Untersuchung über die Wuchsstoffwirkung der Aminosäuren gegenüber Hefe ». *Ann. Ferm.* t. IV, n° 6, 1938, p. 364.
38. OSTERWALDER, A., Dr. — « Schizosaccharomyces liquefaciens, eine gegen freie schweflige Säure widerstandsfähige Gärhefe ». *Trav. Chim. Alim. et Hyg.* 1924, vol. XXV, fasc. 1, p. 5.
39. PACOTTET. — « Vinification ». *Coll. Encyclopédie Agricole*, Paris, 1904.
40. POLONOWSKI. — « Action de l'acide sulfureux sur les alcaloïdes de la fève de calabar ». *Bull. Soc. Chim. de France*, 17, p. 290 (1915).
41. PORCHET, B. — « Contribution à l'étude de l'adaptation des levures à l'acide sulfureux ». *Annuaire Agricole de la Suisse*, 1931.
42. RIBEREAU-GAYON. — « Sur certains troubles accidentels des vins blancs ». *Rev. Viticult.* 66, n° 1749, p. 8 (1918).
43. RIBEREAU-GAYON. — « L'acide sulfureux dans les vins blancs ». *Ann. Ferm.* 1932, p. 297.
44. ROST, E. et FRANZ, Fr. — « Vergleichende Untersuchung der pharmakologischen Wirkungen der organisch gebundenen Säure und der neutralen schwefligsäuren Natriums ». II Teil. *Biochem. Zent.* 14, 1795.
45. SABRAZES et MARCANDIER, A. — « Action du vin sur le bacille d'Eberth ». *Ann. Inst. Pasteur*, 1907, p. 312.
46. SAILLARD, Emile. — « La catalyse dans l'oxydation des sulfites alcalins ». *C. R. Acad. Sciences*, 160, p. 318, 1915.
47. VENTRE, J. — « Les levures en vinification ». *Rev. Viticult.*, p. 200, 1934, 1.
48. WIDMER, A., BRAUN, F. et KALBERER, O. E. — « Ueber das Verhalten der schwefligen Säure im Obst u. Traubensäften ». *Mitt. Lebensmittelunt.*, 22, p. 42-47, 1931.
49. WIDMER, A., BRAUN, F. et KALBERER, O. E. — « Ueber das Verhalten der schwefligen Säure im Obstsaften ». *Trav. Chim. Alim. et Hyg.* 23, p. 86-94, 1932.
50. WARCOLLIER et LE MOAL. — « Disparition progressive de l'acide sulfureux libre dans un jus de pommes conservé ». *Cpt. rend. hebdomad. des séances de l'Acad. des Sc.*, 174, n° 9, p. 634-637, 1922.
51. ZAY. — « Das Verhalten von Schwefligsäureanhydrid in Traubensaft ». (*Staz. sperim. agrar. ital.*, 57, 82, 1924). *Trav. Chim. Alim. et Hyg.*, 1925, vol. XVI, p. 256.
52. *Traité de Chimie minérale* publié sous la direction de Paul Pascal ; spécialement « Composés oxygénés du soufre » par P. Germain et A. Conduché. Tome II (1932).
53. *Traité de Chimie organique* publié sous la direction de V. Grignard ; spécialement « Formation des alcools par voie biochimique » par Cl. Fromageot. Tome V (1937).

TABLE DES MATIÈRES

Introduction générale	116
I. Aperçu des usages de l'acide sulfureux en œnologie	117
II. Propriétés physico-chimiques du SO ₂	120
1. Propriétés physiques du SO ₂	120
2. Propriétés chimiques du SO ₂	125
III. Méthodes analytiques	133
IV. Terminologie employée	137
Le sort du SO ₂ dans les liquides fermentescibles.	137
A. Causes abiologiques des transformations du SO ₂	137
I. Partie bibliographique :	
Introduction	137
1. Problème de l'équilibre de l'acide sulfureux libre et combiné	138
2. Documents sur la « fixation ».	141
3. Documents sur la « destruction ».	147
II. Partie expérimentale :	
1. Mode opératoire et formule des milieux employés.	149
2. Comportement de l'acide sulfureux dans le moût de raisin.	151
3. Comportement de l'acide sulfureux dans le milieu synthétique S.P.	154
4. Étude de l'action de l'asparagine et des acides aminés sur l'acide sulfureux	156
5. Comportement de l'acide sulfureux dans le milieu S.P.Û. et adaptation de ce dernier aux expériences biologiques	159
B. Causes biologiques des transformations du SO ₂	161
I. Partie bibliographique	161
II. Partie expérimentale.	163
Etude de l'intoxication sulfureuse.	166
A. Action du SO ₂ sur la levure	166
I. Partie bibliographique	166
II. Partie expérimentale.	169
Croissance et production d'alcool d'une levure préalablement intoxiquée	
B. Action du SO ₂ sur la fermentation	176
I. Partie bibliographique	176
II. Partie expérimentale.	179
Métabolisme d'une levure croissant en milieu bisulfité	
Résumé et conclusions générales.	185
Bibliographie	188
Table des matières	191