

Vitis 2, 45—56 (1959)

Laboratoire d'Oenologie de la Faculté des Sciences et
Station Agronomique et Oenologique de Bordeaux, France

Dosage Microbiologique des Acides Aminés des Moûts de Raisin et des Vins

par

Mme S. LAFON - LAFOURCADE et E. PEYNAUD

On connaît l'importance primordiale du rôle des aminoacides en biologie et en microbiologie. Cette importance se retrouve pour l'oenologie, puisque ces substances sont les principes essentiels de l'assimilation azotée des levures et des bactéries. En outre les acides aminés des moûts ont encore été considérés depuis longtemps, un peu arbitrairement semble-t-il, comme les produits pré-curseurs du bouquet des vins. Cependant on sait aujourd'hui que les alcools supérieurs des boissons fermentées ne sont formés que pour une part très minime à partir de la leucine, de l'isoleucine et de la valine du milieu initial, suivant la réaction classique d'EHRLICH (désamination et décarboxylation amenant la formation d'un alcool possédant un atome de carbone de moins que l'acide aminé correspondant). Il a été montré qu'ils se forment également à partir des autres acides aminés par transamination et, enfin qu'une petite proportion provient directement de la molécule des sucres (PEYNAUD et GUIMBERTEAU, 1959).

On verra du reste ici et ce sera une des principales conclusions de ce travail, que les teneurs des moûts en leucines et valine libres sont très faibles et ne sauraient expliquer les taux d'alcools supérieurs rencontrés dans les vins.

L'application des méthodes de chromatographie sur papier a permis à de nombreux auteurs une prospection plus ou moins complète et détaillée des aminoacides libres des vins et des jus de raisin dans divers pays vinicoles. Nous avons rassemblé dans le tableau I les résultats de ces identifications qualitatives. Trente-deux aminoacides ont été caractérisés de cette façon. Quelques-uns seulement se retrouvent d'une manière à peu près constante dans ces travaux : la proline à forte concentration, puis l'arginine, l'acide aspartique, l'acide glutamique, le glyco-colle, la leucine, la sérine, la valine. Les autres aminoacides se rencontrent en quantités plus faibles et de façon plus irrégulière.

Les documents quantitatifs sur les acides aminés des vins sont beaucoup plus rares, parce que l'application des méthodes analytiques est difficile aux faibles doses présentes. Les dosages ne sont possibles qu'en utilisant des techniques chromatographiques et, surtout, microbiologiques.

Les méthodes chromatographiques constituent d'excellentes approches qualitatives, elles se prêtent moins bien à des dosages précis. CARLES et collaborateurs (1958) ont estimé approximativement les teneurs en aminoacides, non pas en valeur absolue, mais en valeur relative, les uns par rapport aux autres, d'après la grandeur et la densité des taches sur le chromatogramme ; pour que les résultats soient comparables entre eux, chaque acide aminé est

Tableau 1

Acides aminés libres identifiés qualitativement dans les moûts et les vins

Acides aminés	DUPONT (France) 1951—1955	LÜTHI et VETSCH (Suisse) 1953	SISAKIAN et BESINGER (URSS) 1953	CASTOR (USA) 1953	HENNIG et FLINTJE (Allemagne) 1954	TARANTOLA (Italie) 1954	PROCOPIO et CALÉ (Italie) 1954	DIMOTAKIS (Grèce) 1955	GAUTHER (France) 1955	CARBALLO CAABEIRO (Espagne) 1956	PRILLINGER (Autriche) 1957	CARLES (France) 1958
<i>α</i> Alanine	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+
<i>β</i> Alanine												+
Acide <i>α</i> aminobutyrique					+	+	+	+		+	+	+
Arginine				+	+	+	+	+			+	+
Asparagine			+		+	+	+	+		+	+	+
Acide aspartique	+	+		+	+	+	+	+	+		+	+
Cystéine											+	+
Cystine				+		+		+	+		+	+
Glutamine											+	+
Acide glutamique	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glycocolle	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+
Histamine						+						+
Histidine		+		+	+	+		+		+		+
Hydroxyleucine												+
Acide hydroxy- pipécolique												+
Isoleucine	+			+	+	+	+					+
Leucine	+			+	+	+	+	+	+		+	+
Lysine				+	+	+	+	+		+		+
Méthionine				+	+			+			+	+
Méthionine sulfone												+
Norvaline								+				
Ornithine						+						+
Phénylalanine	+	+		+	+						+	+
Acide pipécolique												+
Acide pyrrolidone carboxylique												+
Oxyproline								+				+
Proline	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sérine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Thréonine	+	+	+	+	+	+		+			+	+
Tryptophane			+	+	+			+				+
Tyrosine	+			+	+	+				+	+	+
Valine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

évalué en pourcentage du total de ces acides. Ainsi la proline atteint 40% de l'ensemble, l'acide *α*-aminobutyrique jusqu'à 25%; la répartition est très irrégulière d'un vin à un autre. De même par estimation chromatographique, en se basant sur l'importance des spots, LÜTHI et VETSCH (1953) ont trouvé dans deux vins suisses les teneurs approximatives indiquées dans le tableau 2.

Récemment BOURDET et HÉRARD (1958) ont appliqué à quatre vins la méthode suivante : après fixation sur colonne d'échangeurs d'ions, élution, concentration par évaporation, les acides aminés et les amides sont séparés par chromatographie bidimensionnelle sur papier ; après révélation avec la ninhydrine, les taches sont découpées, éluées par l'alcool et on mesure les

Tableau 2

Estimation quantitative des taux des acides aminés libres dans les moûts et les vins

Teneurs en mg par litre

Acides aminés	Dosage micro-biologique		Estimation chromatographique	
	Moûts de raisin		Vins	
	Teneurs moyennes		LÜTHI et VETSCH	BOURDET et HERARD
	CASTOR		Vin rouge	Vin blanc
α Alanine	—	50 à 100	67	70
Arginine	403	—	84	91
Acide α aminobutyrique	—	—	31	24
Acide aspartique	52	6	76	72
Acide glutamique	687	3 à 15	334	315
Asparagine	—	—	56	41
Cystine	4	—	106	47
Glutamine	—	—	46	27
Glycocolle	7	5 à 8	12	16
Histidine	92	—	34	13
Isoleucine	66	—	36	24
Leucine	62	—		
Lysine	16	—	43	37
Méthionine	14	—	28	49
Phénylalanine	51	—	22	15
Proline	—	—	531	770
Sérine	—	1 à 3	9	11
Thréonine	—	20 à 25	27	32
Tryptophane	47	—	0	0
Tyrosine	20	—	32	37
Valine	60	—	19	16

densités optiques des éluats colorés ; les concentrations respectives sont alors calculées en se reportant à des courbes d'étalonnage établies pour chaque acide aminé. Le tableau 2 reproduit les résultats de ces auteurs pour deux vins.

La grande sensibilité et la bonne spécificité des méthodes microbiologiques, qui par ailleurs peuvent s'appliquer directement au vin, sans autre traitement qu'une neutralisation et une dilution, en font les méthodes de choix pour le dosage des acides aminés dans ce milieu. On connaît leur principe : dans des conditions bien déterminées, la croissance de certains microorganismes hétérotrophes vis-à-vis d'un acide aminé, c'est-à-dire ayant un besoin absolu de cette substance pour se développer, est proportionnelle ou tout au moins parallèle

à la teneur du milieu de culture en cet acide aminé. Les méthodes microbiologiques exigent donc pour chaque aminoacide un microorganisme spécifiquement hétérotrophe. CASTOR (1953) a pu doser ainsi dix-sept acides aminés différents dans les moûts de raisin. Plus tard CASTOR et ARCHER (1956) ont suivi l'évolution de ces acides aminés au cours de la fermentation alcoolique : alors que les taux de proline, sérine, glyco-colle, lysine, cystine demeurent pratiquement inchangés, les taux des autres acides aminés subissent d'importantes diminutions qui dans le cas de l'arginine et de la thréonine sont de l'ordre de 75 à 90 %.

Après mise au point convenable, nous avons appliqué les méthodes microbiologiques au dosage des acides aminés libres d'une série de moûts et de vins. Dix-sept acides aminés ont été déterminés dans ces milieux. Ces travaux font chronologiquement suite à ceux que nous avons consacrés pendant plusieurs années à la détermination microbiologique des vitamines des moûts et des vins (1955 — 1958) ; l'expérience acquise dans la mise au point de ces méthodes délicates nous a servi pour le dosage, souvent plus simple, des acides aminés.

Nous avons utilisé les méthodes microbiologiques classiques, décrites dans plusieurs monographies [notamment MÜCKE (1955), ADRIAN (1955), BLOCK (1956), notice DIFCO]. La technique générale est bien connue. On choisit un micro-organisme nécessitant absolument pour sa croissance l'acide aminé soumis au dosage, *Leuconostoc* ou *Lactobacillus*. On prépare une gamme étalon contenant des quantités croissantes de cet acide dans un milieu de culture approprié, dit milieu de base. D'autre part les échantillons à doser sont dilués et amenés au pH convenable, voisin de la neutralité. On ensemence à l'aide d'une culture bien active de la bactérie lactique choisie comme microorganisme-test. Après 72 heures d'incubation à 37°C, un titrage acidimétrique de l'acide lactique formé permet d'évaluer la croissance bactérienne dans chaque milieu et de calculer par comparaison avec la gamme-étalon, la richesse en acide aminé de chaque échantillon. Pour obtenir davantage de précision, la gamme est préparée en double exemplaire et chaque échantillon est dosé sous quatre dilutions différentes.

Nous donnons ci-dessous la composition exacte du milieu de base utilisé et rassemblons dans le tableau 3 les données relatives au dosage de chaque acide aminé.

Les souches des microorganismes sont fournies par l'American Type Culture Collections (2029 M Street N.W., Washington). Pour un certain nombre d'acides aminés nous avons utilisé les milieux de base déshydratés DIFCO.

Composition du milieu de base

Glucose	60 g
Acétate de sodium	12 g
Solution saline A	10 ml
Solution saline B	20 ml
Solution de purines	20 ml
Solution de xanthine	20 ml
Solution vitaminique A	20 ml
Solution vitaminique B	20 ml
Solution d'acides aminés non indispensables	200 ml
Solution d'acides aminés indispensables solubles dans l'eau	100 ml
Solution d'acides aminés indispensables solubles en milieu acide	100 ml
Solution de tryptophane	100 ml
Solution de cystine	100 ml
On amène la solution à pH 6,8 par addition de potasse et on complète à 1 litre.	

Tableau 3

Méthodes microbiologiques de dosage des acides aminés

Acides aminés	Méthodes et références	Technique codifiée d'après:	Gamme étalon en γ par tube
Dosages à l'aide de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> P 60 (ATCC 3042)			
Arginine	MC MAHAN et SNELL (1944)	DIFCO	0 à 200
Acide aspartique	HAC et SNELL (1945)	BLOCK (1956)	0 à 50
Cystine	BARTON - WRIGHT et CURTIS (1948) CAMIEN et DUNN (1950)	MÜCKE (1955)	0 à 50
Glycocolle	SHANKMAN, CAMIEN et DUNN (1947) LYMAN, KUIKEN et HALE (1947)	BLOCK (1956)	0 à 50
Histidine	HORN, JONES et BLUM (1948)	ADRIAN (1955)	0 à 50
Isoleucine, leucine	STEELE, SAUBERLICH, REYNOLDS et BAUMANN (1949)		
Lysine	Idem	DIFCO	0 à 100
Méthionine	Idem BARTON - WRIGHT et CURTIS (1948) CAMIEN et DUNN (1950)	DIFCO	0 à 60
Phénylalanine	HEGSTED (1944)	DIFCO	0 à 100
Proline	BLOCK (1956)	BLOCK (1956)	0 à 100
Sérine	MÜCKE (1955)	MÜCKE (1955)	0 à 100
Tyrosine	BARTON - WRIGHT et CURTIS (1948) CAMIEN et DUNN (1950) SHANKMAN (1943)	DIFCO	0 à 100
Valine	KUIKEN et coll. (1943) MC MAHAN et SNELL (1944)	ADRIAN (1955)	0 à 100
Dosages à l'aide de <i>Lactobacillus arabinosus</i> 17/5 (ATCC 8014)			
Acide glutamique	MÜCKE (1955)	MÜCKE (1955)	0 à 240
Thréonine	HORN, JONES et BLUM (1947)	ADRIAN (1955)	0 à 100
Tryptophane	GREENE et BLACK (1944)	DIFCO	0 à 12

Composition des diverses solutions

- Solution saline A: 25 g phosphate monopotassique, 25 g phosphate dipotassique dans 250 ml.
- Solution saline B: 20 g sulfate de magnésium, 0,5 g de chlorure de sodium, 1 g sulfate de manganèse, 0,5 g sulfate ferreux, 0,1 g perchlorure de fer dans 500 ml.
- Solution de purines: 100 mg adénine, 100 mg uracile, 100 mg guanine dans 100 ml contenant la quantité d'acide chlorhydrique suffisante par la dissolution.
- Solution de xanthine: 100 mg de xanthine dans 100 ml de solution ammoniacale (concentration suffisante pour assurer la dissolution).
- Solution vitaminique A: 2 mg thiamine, 20 mg riboflavine, 0,04 mg de biotine dans 100 ml en milieu légèrement acétique.
- Solution vitaminique B: 20 mg pyridoxine, 10 mg pantothénate de calcium, 10 mg acide p. aminobenzoïque, 30 mg acide nicotinique, 1 mg acide folique dans 1000 ml.
- Solution d'acides aminés non indispensables: 400 mg acide aspartique, 400 mg acide glutamique, 100 mg des acides aminés suivants: α alanine, glycocolle, hydroxyproline, norleucine, norvaline, proline, sérine, tyrosine, dans 100 ml en milieu chlorhydrique.
- Solution d'acides aminés indispensables solubles dans l'eau: 200 mg arginine, histidine, leucine, lysine, méthionine, thréonine, valine, dans 100 ml.
- Solution d'acides aminés indispensables solubles en milieu acide: 200 mg isoleucine, phénylalanine dans 100 ml en milieu chlorhydrique.

Ces deux dernières solutions sont conservées en glacière sans stérilisation préalable. Toutes les autres solutions sont stérilisées 15 minutes à 120° C. Les concentrations en acides aminés des solutions sont données pour la forme l; si les acides aminés se présentent sous la forme dl, les quantités indiquées doivent être doublées.

Tableau 4

Teneurs en acides aminés libres des moûts de raisin (Récolte 1957)

Teneurs en mg par litre

Acides aminés	Cépage Merlot				Cépage Cabernet-Sauvignon				Teneurs moyennes
	Saint-Caprais	Pauillac	Margaux	Pessac	Saint-Caprais	Pauillac	Margaux	Saint-Emilion	
Arginine	890	186	282	416	140	286	130	290	327
Acide aspartique	12	0	0	0	0	7	0	0	2
Acide glutamique	190	262	196	0	216	222	160	139	173
Cystine	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Glycocolle	16	10	22	26	26	29	22	25	22
Histidine	20	5	9	11	7	15	10	15	11
Isoleucine	0	0	0	12	32	12	0	0	7
Leucine	28	19	14	19	9	32	18	20	20
Lysine	0	0	0	0	74	54	0	0	16
Méthionine	4	0	3	3	0	0	0	0	1
Phénylalanine	18	1	0	0	0	15	0	7	5
Proline	500	440	190	0	420	216	364	0	266
Sérine	80	80	65	64	62	64	65	74	69
Thréonine	220	230	320	356	226	256	218	244	258
Tryptophane	0,4	0,2	0,6	2,1	1,4	0,3	0	0	0,6
Tyrosine	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Valine	20	3	0	24	0	10	0	0	6

Résultats analytiques

Nous avons appliqué ces méthodes de dosage à une série de moûts préparés par nos soins par pressurage de raisins noirs mûrs et à quelques vins blancs et rouges de la région de Bordeaux d'origine connue. Nos déterminations qui ont porté sur 19 échantillons différents, constituent donc des documents beaucoup plus étendus que les quelques chiffres déjà connus. On comprend que la difficulté et la durée des opérations limitent forcément le nombre des analyses.

Les résultats obtenus font l'objet des tableaux 4, 5 et 6. Malgré des irrégularités de composition et le nombre limité des dosages nous avons calculé, dans la dernière colonne de ces tableaux, les teneurs moyennes pour chaque catégorie, ces chiffres nous paraissant assez caractéristiques. Dans le tableau 7 est donnée la composition azotée générale des moûts et vins analysés.

Il est nécessaire de faire remarquer que les vins ne proviennent pas des moûts analysés, donc que les conclusions qui pourraient être tirées de la comparaison des teneurs en acides aminés de ces milieux pour en dégager l'influence de la fermentation alcoolique par exemple, ne peuvent être définitives. De même dans la comparaison entre les vins blancs et les vins rouges, on tiendra compte de ce que les différences observées proviennent pour une part des différences de méthodes de vinification et pour une autre part de la fermentation malolactique, qui ne s'est pas effectuée dans les vins blancs. Nous nous proposons d'ailleurs dans de prochaines séries de dosages d'étudier à partir d'un même moût l'effet de ces deux fermentations sur la teneur en acides aminés libres.

Tableau 5

Teneurs en acides aminés libres des vins rouges (Région de Bordeaux)
Teneurs en mg par litre

Acides aminés	Côtes de Canon- Fronsac	Saint- Emilion 1	Saint- Emilion 2	Saint- Emilion 3	Médoc	Teneurs moyennes
Arginine	25	66	49	25	68	47
Acide aspartique	23	45	25	16	44	31
Acide glutamique	220	266	190	90	340	221
Cystine	9	21	17	10	26	17
Glycocolle	32	36	22	17	33	28
Histidine	5	19	12	6	27	14
Isoleucine	20	29	25	15	40	26
Leucine	20	22	17	9	26	19
Lysine	47	52	50	26	62	47
Méthionine	5	5	5	2	6	5
Phénylalanine	21	21	14	9	28	19
Proline	53	95	52	50	110	72
Sérine	41	54	62	36	53	49
Thréonine	127	382	124	86	218	187
Tryptophane	1,0	4,8	1,4	1,1	4,0	2,5
Tyrosine	6	11	9	11	17	11
Valine	62	46	38	24	57	45

Les teneurs présentées par les moûts peuvent être assez variables d'un échantillon à un autre. La richesse générale en acides aminés est évidemment en rapport avec la teneur en azote total. Cependant d'une manière assez concordante, on note l'absence à peu près complète dans le jus de raisin de quelques-uns des acides aminés recherchés: acide aspartique, cystine, isoleucine, méthionine, phénylalanine, tyrosine, valine et même tryptophane; de même la lysine manque dans beaucoup de cas. D'autre part on rencontre à des doses faibles d'autres acides aminés, la leucine par exemple. Ces observations sont nouvelles et permettent de donner sa juste importance à la part que peut avoir la réaction d'EHRLICH dans la formation de certains constituants du vin. L'absence de valine et les taux très faibles de leucine et d'isoleucine ne peuvent expliquer en effet, selon ce processus, la formation notable d'alcool isobutylique et d'alcool isoamylique enregistrée au cours de la fermentation

De même pourra-t-on douter de la formation dans le vin de quantités appréciables d'alcool phényléthylique, de tyrosol et de tryptophol à partir de la phénylalanine, de la tyrosine et du tryptophane du moût, transformations qui cependant étaient tenues pour classiques. En réalité on verra même que les vins sont plus riches que les moûts en ces divers acides aminés, ce qui permet de dire que loin d'épuiser tous les acides aminés du moût, comme on aurait pu le croire, la fermentation diminue le taux de certains mais en libère d'autres. Pour cette raison encore le fait que les vins sont finalement plus riches en acide glutamique que les moûts, ne justifie pas la théorie de la formation, même partielle, de l'acide succinique du vin à partir de l'acide glutamique des moûts, au cours de la fermentation.

Tableau 6

Teneurs en acides aminés libres des vins blancs (Région de Bordeaux)
Teneurs en mg par litre

Acides aminés	Côtes de Bourg	Graves supérieures	Loupiac	Sainte-Croix du Mont	Sauternes	Barsac	Teneurs moyennes
Arginine	24	21	38	64	107	22	46
Acide aspartique	18	31	24	41	93	21	38
Acide glutamique	107	124	122	330	390	125	200
Cystine	11	21	21	21	66	11	25
Glycocolle	15	22	15	24	67	16	26
Histidine	13	9	9	16	33	8	14
Isoleucine	18	28	26	32	57	15	29
Leucine	15	22	15	16	34	12	19
Lysine	38	35	30	40	72	25	40
Méthionine	2	5	3	4	7	2	4
Phénylalanine	13	15	12	18	31	8	16
Proline	109	200	250	200	200	250	201
Sérine	53	46	51	50	72	53	54
Thréonine	160	77	82	85	212	52	111
Tryptophane	0	0	0	0	0	0	0
Tyrosine	7	10	9	16	29	7	13
Valine	24	33	26	37	76	22	36

Quatre aminoacides sont les constituants principaux de l'azote aminé des moûts et atteignent des taux de quelques centaines de mg ; ce sont, dans l'ordre d'importance, l'arginine (130 à 890 mg), la proline (0 à 500 mg), la thréonine (218 à 356 mg) et l'acide glutamique (0 à 262 mg). Ces chiffres confirment et précisent les observations chromatographiques antérieures. CASTOR et ARCHER (1956) avaient donné pour un moût de Colombard des chiffres encore plus élevés, notamment pour la proline, et qui paraissent exceptionnels (3,49 g par litre).

L'un de nous avait déjà montré (1939) que les vins rouges, à cause de la macération des parties solides du raisin au cours de la vinification, sont toujours nettement plus riches en substances azotées que les vins blancs (moyennes d'un grand nombre d'analyses d'azote total: 330 mg par litre pour les premiers, 185 mg pour les seconds). L'azote sous la forme aminée varie de 10 à 180 mg

Tableau 7

Composition azotée des moûts et vins analysés

Teneurs en mg par litre

Moûts et vins	N			
	total	ammoniacal	aminé formol-titration	aminé microbiologique
Moûts				
Merlot, Saint-Caprais	570	66	168	250
Merlot, Pauillac	358	45	101	143
Merlot, Pessac	436	80	119	143
Cabernet-Sauvignon, Saint-Caprais	515	99	144	118
Cabernet-Sauvignon, Margaux	414	66	118	83
Cabernet-Sauvignon, Saint-Emilion	432	66	129	110
Teneurs moyennes	454	70	129	141
Vins rouges				
Côtes de Canon-Fronsac	375	12,6	99	78
Saint-Emilion 1	352	11,2	83	104
Saint-Emilion 2	268	9,8	70	81
Saint-Emilion 3	218	4,2	48	49
Médoc	386	19,6	180	138
Teneurs moyennes	320	11,5	96	90
Vins blancs				
Côtes de Bourg	128	1,4	30	71
Graves supérieures	156	7,0	31	78
Loupiac	156	8,4	33	81
Ste Croix-du-Mont	218	7,0	38	108
Sauternes	302	8,4	65	168
Barsac	145	5,6	22	67
Teneurs moyennes	184	6,3	36	95

par litre et parfois davantage. Pour cette forme de l'azote, les différences entre les vins blancs et les vins rouges sont encore plus accusées que celles qui existent pour l'azote total. Les acides aminés déterminés par formol-titration représentent de 10 à 25 % de l'azote organique pour les vins blancs et de 20 à 40 % pour les vins rouges, comme si ces derniers étaient le siège d'une protéolyse plus poussée. Nous faisons ici les mêmes observations.

Les vins rouges sont riches surtout en acide glutamique et en thréonine; par ailleurs les dix-sept aminoacides dosés y sont toujours représentés. La composition aminée des vins est nettement plus variée que celle des moûts. LÜTHI et VETSCH l'avaient soupçonné d'après leurs chromatogrammes.

Les vins blancs offrent une composition azotée un peu différente de celle des vins rouges. C'est la proline qui est pour eux, avec l'acide glutamique, l'acide aminé le plus important; il y a presque trois fois plus de proline dans les vins blancs que dans les vins rouges. Par contre les vins blancs sont un peu moins riches en thréonine. Les autres acides aminés sont présents à doses à peu près semblables dans les deux types de vins. Les vins blancs analysés sont dépourvus de tryptophane.

En résumé, si l'on fait le bilan de l'action des levures sur les constituants azotés du moût au cours de la fermentation, sans perdre de vue cependant que les moûts et les vins analysés ne sont pas absolument comparables, il apparaît qu'elles consomment la plus forte proportion de l'arginine des moûts, une fraction notable de la proline et de la thréonine et un peu de sérine. Par contre elles libèreraient par utilisation des polypeptides du moût et par autolyse de leurs cellules, de petites quantités d'acide aspartique, de cystine, d'isoleucine, de lysine, de méthionine, de phénylalanine, de tryptophane, de tyrosine et de valine.

Les taux du glycoColle, de l'histidine, de la leucine ne varieraient pratiquement pas.

Pour chaque moût et vin analysés, nous avons calculé la richesse totale en azote aminé correspondant à la somme des dix-sept aminoacides dosés microbiologiquement. Nous n'avons tenu compte bien entendu que de deux groupements aminés pour l'arginine qui contient cependant 4 atomes d'azote, de même que pour l'histidine qui en contient 3. Nous avons comparé les chiffres ainsi obtenus avec les résultats du dosage par formol titration de l'azote aminé total. Ces résultats figurent dans le tableau 7. On peut estimer que la somme de ces dix-sept aminoacides représente la presque totalité des fonctions aminées, bien que manquent des acides aminés signalés dans les vins comme par exemple l' α -alanine, les acides aminobutyriques et les petites quantités d'amides qu'ils contiennent toujours. Le taux d'azote aminé calculé de cette façon est cependant assez souvent supérieur aux chiffres obtenus par dosage direct; c'est notamment le cas pour tous les vins blancs et aussi pour quelques moûts. On sait bien que le titrage en présence de formol ne donne pas toujours la totalité des groupes NH_2 , mais les écarts ne sont pas systématiques. En effet pour les vins rouges on retrouve des valeurs du même ordre de grandeur dans les deux cas. On peut se demander si les microorganismes utilisés dans ces dosages ne seraient pas sensibles aux petits polypeptides de certains vins et donc ne les titreraient pas en même temps. On sait en tout cas que les bactéries lactiques du vin les plus banales, celles de la fermentation malolactique, y occasionnent de profondes protéolyses à partir des polypeptides, avec libération d'ammoniaque. Il est donc vraisemblable que des bactéries similaires puissent utiliser de la même façon, au cours du dosage, certaines formes de l'azote d'un poids moléculaire plus élevé que les acides aminés. On remarque que précisément ce sont pour les catégories de vins qui n'ont pas subi d'action bactérienne et donc qui possèderaient encore des polypeptides assimilables, les vins blancs, que les écarts entre les deux méthodes de détermination sont les plus grands.

Conclusions

Nous avons déterminé au moyen des méthodes microbiologiques classiques dix-sept acides aminés se trouvant à l'état libre dans une série de moûts et de vins. Ces méthodes s'appliquent parfaitement à ces milieux sans autre traitement préalable qu'une neutralisation et une dilution convenable. L'arginine, la proline, la thréonine, l'acide glutamique sont les quatre acides aminés les plus abondants. Ils représentent plus de 85 % de l'azote aminé des moûts; dans les vins cependant, ils ne constituent plus qu'une fraction de 60 %. La fermentation alcoolique fait apparaître en effet de petites quantités d'acides aminés qui n'existaient pas à l'état libre dans les moûts; la composition azotée des vins est moins abondante mais plus variée que celle des moûts.

Ces dosages montrent encore que les taux des acides aminés assimilables par les levures selon la réaction d'EHRlich sont absents dans le moût de raisin, ou seulement présents à doses extrêmement faibles. Entre autres conséquences qui découlent de ces observations et contrairement aux notions admises jusqu'à maintenant, l'alcool isobutylique et l'alcool isoamylique des vins ne tirent leur origine que pour une part très minime de la valine et des leucines des moûts.

Enfin s'il existe une certaine concordance entre les chiffres d'azote aminé obtenus par dosage microbiologique et par formoltitration dans le cas des vins rouges, les écarts obtenus pour les moûts et surtout les vins blancs suggèrent que les techniques microbiologiques dosent encore certains petits polypeptides pouvant être dégradés par les bactéries.

Bibliographie

- ADRIAN, J.: Nouvelle technique pour le dosage microbiologique simultané des acides aminés indispensables et conditions de leur extraction en présence de glucides. Bull. Soc. Chim. biol. **37**, 107 (1955).
- BARTON - WRIGHT, E. C. et N. S. CURTIS: A modified method for the microbiological assay of tryptophan, methionine, cystine and tyrosine. Analyst **73**, 330 (1948).
- BLOCK, R. J.: Amino-acid handbook. C. C. Thomas éditeur, Springfield (1956).
- BOUDET, A. et J. HERARD: Influence de l'autolyse des levures sur la composition phosphorée et azotée des vins. Ann. Technol. agric. **7**, 177 (1958).
- CAMIEN, M. N. et M. S. DUNN: An improved microbiological method for the determination of cystine in human urine with *Leuconostoc mesenteroides* P-60. J. Biol. Chem. **183**, 561 (1950).
- CARBALLO CAABEIRO, J.: Analisis chromatografico cualitativo de jugos naturales y comerciales de origen vegetal. Ann. Investig. Agron. **5**, 195 (1956).
- CARLES, J., M. LAMAZOU - BETHEDER et R. PECH: Les acides aminés libres du vin. C. R. Acad. sci. **246**, 1254 (1958).
- CASTOR, J. G. B.: The free amino acids of musts and wines. Food Res. **18**, 139 et 146 (1953).
- CASTOR, J. G. B. et T. E. ARCHER: Amino acids in must and wines. Proline, serine and threonine. Amer. J. Enol. **7**, 19 (1956).
- DIFCO manual. DIFCO laboratories. Detroit, Michigan (1953).
- DIMOTAKIS, P. N.: Acides aminés libres dans les vins grecs (en grec). Chim. chron. Athènes **20** (1955).
- DUPONT, G.: Identification des acides aminés de moûts de raisin. Ann. Technol. agric. **2**, 95 (1953).
- GAUTHIER, J. A.: Mise en évidence des acides aminés libres du vin. Bull. Acad. Nat. Médecine **139**, 497 (1955).
- GREENE, R. D. et A. BLACK: The microbiological assay of tryptophan in proteins and foods. J. Biol. chem. **155**, 1 (1944).
- HAC, L. R. et E. E. SNELL: J. Biol. chem. **159**, 291 (1945).

- HENNIG, K. et S. M. FLINTJE: Papierchromatographische Untersuchung der Zucker, Zuckersäuren und Aminosäuren des Weines. Wein-Wissenschaft **8**, 121 (1954).
- HORN, M. J., D. B. JONES et A. E. BLUM: J. Biol. chem. **172**, 149 (1948).
- KUIKEN, R. A., W. H. NORMAN, C. M. LYMAN, L. HALE et L. BLOTTER: The microbiological determination of amino acids. I. Valine, leucine and isoleucine. J. Biol. Chem. **151**, 615 (1943).
- LÜTHI, H. et V. VETSCH: Papierchromatographische Bestimmung von Aminosäuren in Weinen. Schweiz. Z. Obst- u. Weinbau. **61**, 390 et 405 (1952).
- — : Papierchromatographische Trennung und Bestimmung von Aminosäuren in Traubenmost und Wein. Der Deutsche Weinbau **7**, (1953).
- LYMAN, C. M., K. A. KUIKEN et F. HALE: The histidine content of meat. J. Biol. chem. **171**, 233 (1947).
- MC MAHAN, J. R. et E. E. SNELL: The microbiological determination of amino acids. I. Valine and arginine. J. Biol. Chem. **152**, 83 (1944).
- MÜCKE, D.: Einführung in mikrobiologische Bestimmungsverfahren. G. Thieme, Leipzig (1955).
- PEYNAUD, E.: L'azote aminé et l'azote amidé dans les vins de Bordeaux, Ann. Falsif. Fraudes **32**, 228 (1939).
- PEYNAUD, E. et G. GUIMBERTEAU: Mécanismes de la formation des alcools supérieurs au cours de la fermentation alcoolique. C. R. Acad. Sci. (1959).
- PEYNAUD, E. et S. LAFON - LAFOURCADE: Les vitamines B du vin. Congr. Synd. nat. des Oenol., Mâcon (1957). — Vitamines du raisin dosées microbiologiquement. Bull. Soc. Phys. végétale **3**, 60 (1957). — Les vitamines B dans le raisin et dans le vin. Congr. Intern. Médec. étude scient. du raisin et du vin, Bordeaux (1957).
- PRILLINGER, F.: Über die stickstoffhaltigen Substanzen im Wein. Mitt. Klosterneuburg **7**, 138 (1957).
- PROCOPIO, M. et M. T. CALE: Amino acidi liberi nei vini. Riv. Vitic. Enol. Conegliano **7**, 12 (1954).
- SHANKMAN, S.: J. Biol. Chem. **150**, 305 (1943).
- SISAKJAN, N. M. et E. N. BESINGER: Variation de la composition en aminoacides du vin lors de sa technologie primaire (en russe). Biokhimiya U.R.S.S. **18**, 412 (1953).
- STEELE, B. F., H. E. SAUBERLICH, M. S. REYNOLDS et C. A. BAUMAN: Media for *Leuconostoc mesenteroides* P-60 and *Leuconostoc citrovorum* 8081. J. Biol. Chem. **177**, 533 (1949).
- TARANTOLA, C.: Separazione e identificazione cromatografica degli amino acidi nei vini. Atti. Accad. Ital. Vite Vino **6**, 146 (1954).
- VALAIZE, H. et G. DUPONT: Les acides aminés et le bouquet des vins. Ind. agric. alim. **68**, 245 (1951).

eingegangen am 31. I. 1959