VI. SUR LA FERMENTATION DE L'ACIDE GLYOXYLIQUE.

PAR ALEXANDRE LEBEDEV.

Lab. de technol. chim. agric. de l'Inst. Polytech. de Done.

(Received January 23rd, 1918.)

EN étudiant l'action de la levure, préparée d'après ma méthode, sur quelques acides organiques, j'ai fait aussi des expériences sur l'acide glyoxylique. Celui-ci, ayant une fonction d'aldéhyde, présente sûrement un intérêt particulier. L'action de la levure vivante sur l'acide glyoxylique a été examinée par Neuberg et Tir [1911], mais le résultat a été négatif: de toutes les races employées par ces auteurs une seulement (la race A) a donné un peu plus de CO_2 que le témoin (7 cc. de CO_2 contre 1.5 cc.) dans 2 tubes de Schrotter.

D'après mes expériences il faut admettre que la levure de Lebedev peut décomposer l'acide glyoxylique avec dégagement de CO_2 . Il n'est pas facile pour le moment d'expliquer de quelle manière agit cette réaction curieuse. A peine pourrait-on supposer que le dégagement de CO_2 soit dû tout simplement à l'excitation de l'autofermentation, parce que le même phénomène a lieu lorsqu'on emploie du suc de macération. Parallèlement au dégagement de CO_2 il se forme une quantité notable de CH_3COH . Si l'on se souvient de ce qu'on peut obtenir l'acide glyoxylique par l'oxydation de $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$, ce ne serait peut-être pas trop osé d'admettre que la levure puisse réduire celui-là en le transformant en $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$, étant donné que l'aldéhyde acétique lui-même se transforme en partie sous l'action de la levure en alcool éthylique.

Exp. 1. On a pris 6 fioles d'Erlenmeyer avec une soupape de fermentation de Meissl (Nos. 1-6). Elles ont été chargées de 1 gr. de levure + 50 cc. d'eau + 0.2 cc. de toluène. Aux Nos. 1-4 on a ajouté 100 mg. d'acide glyoxylique à chacune.

Température 25°.						
t.	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	Moyen	Moyen des Nos. 5 et 6
Après 17 h. (mg. de CO_2)	112	114.5	104.5	115	111.5	85.5
„ 45 „ „	145	150.5	134.5	159	147.0	114.5
„ 65 „ „	154	161.0	142.0	178	159.0	123
Bioch. XII						6

Alors on obtient par soustraction: $111.5 - 85.5 = 26$ mg.; $147 - 114.5 = 32.5$ mg.; $159 - 123 = 36$ mg. de CO_2 pour chaque fiole.

Exp. 2 est analogue à la précédente.

t.	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	Moyen	No. 5	No. 6	Moyen
4 h.	20.5	18.5	27	19.0	21.0	24	16	20.0
8 h.	66.5	72.5	72	71.5	70.5	50	39	44.5
24 h.	101.0	104.5	100	101.5	102.0	84	63	73.5

$21 - 20 = 1$ mg.; $70.5 - 44.5 = 26$ mg.; $102 - 73.5 = 28.5$ mg. de CO_2 pour chaque fiole.

Dans les Nos. 3 et 4 et dans les témoins (Nos. 5 et 6) on a dosé CH_3COH en forme de sa *p*-nitrophénylhydrazone sans la recrystalliser (F. 127°). On a mélangé le contenu des Nos. 3 et 4 et des Nos. 5 et 6; de cette manière on a obtenu 2 portions de liquide; on les a neutralisées soigneusement et on en a fait distiller $\frac{1}{3}$ de volume, en refroidissant le récipient avec de la glace fondante. Dans ces conditions il ne passe que des traces d'acide glyoxylique comme cela a été prouvé par une expérience préliminaire. On a obtenu 35 mg. de hydrazone (F. 127°); le témoin au contraire n'en a rien donné.

Exp. 3. On a fait fermenter l'acide glyoxylique avec du sucre (pour 100 mg. d'acide 200 mg. de sucre) et on a dosé CH_3COH . $T = 25^\circ$.

t.	ac. glyox. + sucre		ac. glyoxylique		sucre		témoins	
12 h.	147	156	87	—	136	134	78.5	69.5
33 h.	174	178	108	—	166	178	97.5	88.0
47 h.	209	208	130.5	134	190	218	118.5	107.0
	32 mg. d'hydrazone		30 mg. d'hydrazone		8 mg. d'hydrazone		traces	

Exp. 4. On a pris 4 fioles et on les a chargées chacune de 40 cc. de suc de macération; 2 fioles ont été additionnées chacune de 62.5 mg. d'acide. On a ajouté, comme toujours, à chaque fiole du toluène. $T = 25^\circ$.

t.	ac. glyoxylique		témoins	
21 h.	9	12.5	4	4.6
45 h.	19	22.5	7	6.5
69 h.	27	27.5	8	8.0

Le suc qui a été chauffé pendant 10 min. à 70° n'agissait pas sur l'acide glyoxylique.

Exp. 5. On a pris 4 fioles avec des soupapes de fermentation; à chacune d'elles on a ajouté 22.5 cc. de suc. Aux 2 fioles on a ajouté en outre 2.5 cc. de solution à 3.54 % d'acide glyoxylique à chacune (88.5 mg.).

t.	CO_2 (ac. glyoxylique)		CO_2 (témoins)	
48	13.5	16	6	6
72	20.5	25	11	9

$29.5 - 12 = 17.5$ mg.; $45.5 - 20 = 25.5$ mg. Pour une fiole: 9 et 13 mg. de CO_2 .

Exp. 6. 4 fioles ont été chargées de la levure qu'on a conservée au laboratoire au moins pendant une année. Pour 10 gr. de levure on a pris 50 cc. d'eau. Aux 2 fioles on a ajouté en outre 100 mg. d'acide glyoxylique à chacune. $T = 25^{\circ}$.

t.	CO ₂ (ac. glyoxylique)		CO ₂ (témoins)	
11 h.	48.5	50.5	50.0	—
24 h.	100.5	105.5	98.5	105
29 h.	113.5	118.0	114.5	119

Si l'on considère la quantité de CO₂ dégagé, on ne s'aperçoit pas d'une différence quelconque entre les fioles chargées de CHO . CO₂H et les témoins, néanmoins on a obtenu 28 mg. d'hydrazone qui, recristallisée une fois, avait le point de fusion 128° . Le témoin n'a donné après la distillation aucune hydrazone. Ce fait curieux dit en faveur de la supposition que l'aldéhyde acétique se forme à cause de la réduction de l'acide glyoxylique. Pour faire ressortir plus clairement l'influence de la concentration, j'ai fait l'expérience suivante.

Exp. 7. On a pris 5 fioles (Nos. 1-5) avec des soupapes de fermentation; on a ajouté 10 gr. de levure, 50 cc. d'eau et 0.2 cc. de toluène à chacune. Aux fioles Nos. 1, 2 et 3 on a ajouté en outre 300, 200 et 100 mg. d'acide glyoxylique. $T = 25^{\circ}$.

t.	300 mg. d'ac. glyox.	200 mg. d'ac. glyox.	100 mg. d'ac. glyox.	témoins	
21 h.	19	40	73	65	33.5
27 h.	30	70	109	94	69.5
39 h.	40	84	137	105	99.5
64 h.	40	84	144	120	121.0

Le mécanisme de la décomposition n'étant pas bien clair, je me suis posé la question si l'acidité du milieu influencerait l'autofermentation d'une manière sensible.

Exp. 8. 2 fioles ont été chargées de 10 gr. de levure, 50 cc. d'eau et 0.2 cc. de toluène. A une d'elles on a ajouté 0.1 cc. de HCl.

t.	HCl		témoin	différence
3 h.	50 mg. de CO ₂		21 mg. de CO ₂	29 mg. de CO ₂
20 h.	112	„ „	63 „ „	49 „ „
28 h.	126	„ „	72 „ „	54 „ „
55 h.	156	„ „	113 „ „	43 „ „
70 h.	191	„ „	166 „ „	25 „ „

Ainsi devient-il plausible que l'acide minéral puisse favoriser l'autofermentation de la levure, il faut donc s'attendre à ce que les acides organiques puissent produire, suivant le degré de leur dissociation électrolytique, le même effet.

Les expériences avec les acides glycolique, acétique, lactique, etc. m'ont donné un résultat nettement positif. J'en ferai connaître quelques-unes faites à ce sujet.

Exp. 9. 4 fioles ont été chargées chacune de 10 gr. de levure et 50 cc. d'eau. Aux 2 fioles on a ajouté 200 et 100 mg. d'acide glycolique.

t.	200 mg.	100 mg.	témoins	
17 h.	70	76	66.5	59.0
24 h.	94	95	80.5	77.5
38 h.	130	139	125.5	124.5
43 h.	146	168	154.0	153.0

Exp. 10. Au lieu de 10 gr. de levure on a pris 25 cc. de suc de macération. Aux 2 fioles on a ajouté 62 mg. d'acide glycolique à chacune.

t.	ac. glycol.		témoins		différence pour 1 fiole
14 h.	9	12	4	4.0	6 mg. de CO ₂
45 h.	19	22	7	6.5	14 " "
69 h.	27	28	8	8.0	20 " "

Cette expérience dit plutôt en faveur de la supposition que l'acide glycolique soit décomposé sous l'influence de la levure. Je n'ai pas réussi à préciser définitivement quelle était l'action de HCl sur le suc de levure, parce qu'une petite quantité d'acide minéral suffisait déjà pour en faire une coagulation partielle.

Exp. 11. On a pris 6 fioles chargées chacune de 10 gr. de levure + 50 cc. d'eau + 0.2 cc. de toluène (Nos. 1-6). Aux fioles 1 et 2 on a ajouté 378 mg. d'acide glycérique, aux fioles 3 et 4 209 mg. d'acide acétique à chacune.

t.	ac. glycér.		ac. acét.		témoins		différence pour 1 fiole	
							ac. glycér.	ac. acét.
28 h.	166	183	117	116	66	67	108 mg. de CO ₂	50 mg. de CO ₂
55 h.	188	166	166	158	102	112	70 " "	55 " "

Exp. 12. Cette expérience est analogue aux précédentes; aux 2 fioles on a ajouté 200 mg. d'acide lactique à chacune.

t.	ac. lactique		témoins		différence pour 1 fiole
28 h.	109	121	66	61	51.5 mg. de CO ₂
49 h.	132	150	104	91	43.5 " "
72 h.	139	160	138	118	21.5 " "

Elle montre que la différence diminue avec le temps, ce qui donne tout lieu à croire que le dégagement de CO₂ en présence de l'acide lactique était dû plutôt à l'action stimulante exercée par lui qu'à la décomposition de l'acide lactique, d'autre part les expériences que j'ai publiées antérieurement ont démontré [Lebedev, 1915, 1916] que la présence de l'acide lactique se manifestait seulement par l'augmentation de la quantité de CO₂ dégagé, mais pas

d'alcool formé; le rapport $\frac{\text{CO}_2}{\text{C}_2\text{H}_5\text{O}}$ pendant l'autofermentation reste au contraire presque égal à l'unité. On voit de tout ce que je viens de dire qu'il n'est pas facile de se faire une idée précise de ce qui se passe en vérité et il faudra encore beaucoup d'expériences pour y mettre une pleine clarté. La fermentation de l'acide glycérique a été établie par moi [Lebedev, 1914] fermement, parce que le dégagement de CO_2 était accompagné de la formation de CH_3COH . Dans le travail fait par moi¹ en collaboration avec M. Polonsky nous avons dosé tous les produits qui se formaient pendant la décomposition de l'acide glycérique, à savoir CO_2 , CH_3COH , $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ et $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$, et nous avons constaté que la somme ($\text{CH}_3\text{COH} + \text{CH}_3\text{CO}_2\text{H} + \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) était presque égale à la quantité de CO_2 . En ce qui concerne les acides glyoxylique, acétique, lactique et glycolique la question reste ouverte, parce que, excepté CO_2 et CH_3COH , on n'a pas découvert, tout au moins momentanément, d'autres produits de leur décomposition.

Il était intéressant de voir quelle action exerçait un milieu neutre sur le travail de la levure de Lebedev pendant la fermentation du sucre, c'est pourquoi j'ai fait quelques expériences en présence de CaCO_3 ; je vais reproduire ici une de celles-ci.

Exp. 13. 4 fioles chargées chacune de 10 gr. de levure + 50 cc. d'eau + 0.2 cc. de toluène. On a ajouté au No. 1—5 gr. de sucre, au No. 2—5 gr. de sucre + 1 gr. de CaCO_3 , au No. 3—1 gr. de CaCO_3 .

	1	2	4	3			
t.	sucre	sucre + CaCO_3	témoin	tém. + CaCO_3	No. 1 - No. 4	No. 2 - No. 3	(1 - 4) - (2 - 3)
24	1173	879	82	69	1091	810	281
27	1379	1048	156	119	1223	929	294
48	1447	1058	229	162	1218	896	322

On a dosé CH_3COH et on a obtenu: No. 1—5.5 mg., No. 2—10.5 mg. de *p*-nitrophénylhydrazone, Nos. 3 et 4—des traces de celle-ci.

On peut expliquer l'action de CaCO_3 de trois manières. 1. Le milieu neutre est nuisible à l'action de la zymase. 2. Le sel de Ca de l'éther phosphoré se décompose plus lentement que l'éther libre. 3. Le sel de Ca de l'acide pyruvique, si celui-ci vraiment est un produit intermédiaire, ne fermente pas si bien que l'acide libre et en outre, la marche de la réaction étant dérangée, l'aldéhyde acétique apparaît, ce qui concorde aussi avec des expériences de Fernbach et Schoen [1913, 1914]. Les expériences ultérieures montreront quelle des trois explications est la plus probable.

En ce qui concerne l'acide glyoxylique il faut noter ici seulement le fait de la formation de CH_3COH et par conséquent de $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$. S'il y a

¹ Ce travail paraîtra bientôt.

vraiment une simple réduction de l'acide, il faudrait admettre qu'il soit un accepteur énergétique de H, parce que d'après la réaction

une molécule de celui-ci pourrait joindre 8 atomes de H ou $\frac{1}{8}$ de son poids. Il est alors possible que la décomposition de $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_3$ soit déterminée par la même cause, puisque dans ce cas une partie des molécules pourrait s'oxyder aux dépens de la réduction de l'autre partie de la même molécule.

L'alcool qui se forme en l'absence de l'air dans les tissus végétaux ne résulte pas toujours de la fermentation du sucre. Sans parler de celui-ci, peut-être faudra-t-il ajouter aux sources connues depuis longtemps comme, par exemple, l'acide pyruvique (Neuberg) et glycérique (Lebedev), encore l'acide glyoxylique que l'on trouve si souvent dans les plantes. L'éclaircissement de cette question se rapportant entièrement au domaine de la physiologie végétale ne faisait pas l'objet de mes recherches.

REFERENCES.

- Fernbach and Schoen (1913), *Compt. Rend.*, **157**, 1478.
 — (1914), *Compt. Rend.*, **158**, 1719.
 Lebedev (1914), *Ber.*, **47**, 667.
 — (1915), *J. Microbiol.*, **2**, 307.
 — (1916), *J. Russ. Phys. Chem. Soc.*, **48**, 771.
 Neuberg and Tir (1911), *Biochem. Zeitsch.*, **32**, 323.