

Zeitschrift: Bulletin de la Société botanique de Genève
Herausgeber: Société botanique de Genève
Band: 25 (1932-1933)

Artikel: Les éthers formés par les levures et le dosage de ces éthers au moyen de l'analyse qualitative et quantitative de leurs acides gras
Autor: Nielsen, H.
DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-1099517>

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: 17.04.2026

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

BULLETIN
DE LA
SOCIÉTÉ BOTANIQUE DE GENÈVE

Publié sous la direction de **Robert CHODAT**, professeur à l'Université

Chaque collaborateur est responsable de ses travaux

Les abonnements (SUISSE : 12 fr. — UNION POSTALE : 13 fr. 50)
sont perçus au Siège social, Institut de Botanique, Genève.

Compte de chèques postaux : I. 3088

VOLUME XXV

GENÈVE, Nov. 1932 - Oct. 1933

**Les éthers formés par les levures et le dosage de
ces éthers au moyen de l'analyse qualitative et
quantitative de leurs acides gras**

PAR

Chr. H. NIELSEN

INTRODUCTION

La formation des corps aromatiques pendant la fermentation provoquée par les microorganismes est connue depuis fort longtemps. Bien des auteurs anciens, dans leurs descriptions de la vie de ces organismes, mentionnent l'apparition de ces corps ; mais, comme les méthodes pour les recherches chimiques, n'étaient pas encore assez développées, ces auteurs devaient se borner à indiquer l'odeur typique dégagée au cours de la fermentation : odeur de pomme, odeur d'ananas, ou plus généralement, odeur aromatique de fruits. La quantité était mesurée par « beaucoup » ou « peu », suivant l'intensité de l'odeur.

Il est bien certain cependant, que ces odeurs, plus ou moins caractéristiques pour un organisme déterminé, peuvent être dues à la formation, dans le milieu nutritif, de beaucoup de corps de constitutions chimiques assez différentes ; mais on s'est rendu compte, peu à peu, que dans plusieurs cas, l'odeur fondamentale est principalement dûe à la formation d'éthers

d'acides gras. Et nous pensons surtout ici aux odeurs agréables développées par plusieurs espèces de levures.

On se trouve toutefois rarement en présence d'une odeur pure, c'est-à-dire d'une odeur qui soit exactement la même que celle d'un éther défini ; il semble en effet que la majorité de ces parfums soit constituée par des mélanges d'éthers. Et cependant ils sont assez typiques pour qu'on les ait utilisés comme caractères de détermination de diverses espèces de microorganismes. On se sert alors de l'identification organoleptique de ces odeurs-mélanges : odeur de pomme, odeur d'ananas, etc. On imagine dès lors tout le parti qu'on pourra tirer, dans le domaine de l'identification des espèces, des résultats d'une analyse chimique de ces corps odorants.

Selon BEIJERINCK, c'est NÆGELI qui le premier a trouvé que le *Saccharomyces sphaericus* NÆGELI (syn. *Saccharomyces anomalus* HANSEN ; — *Hansenula anomala* var. *sphaericus* DEKKER ; — *Endomyces anomalus* ZENDER) produit pendant la fermentation des quantités abondantes d'éther acétique. Cependant les travaux de NÆGELI ne sont pas basés sur les résultats d'une recherche chimique approfondie. Ce n'est que beaucoup plus tard que BEIJERINCK lui-même a repris ces investigations. On en trouvera les résultats dans une publication de sa main intitulée : « Over azijnthergisting » se trouvant dans « Handleiding van het vijfde Nederlandsche Natuur-en Geneeskundig Congres, gehonden te Amsterdam, 1895 », et aussi, dans les « Verzamelde Geschriften van M. W. BEIJERINCK. »

Les résultats de BEIJERINCK confirment l'hypothèse de NÆGELI, à savoir que le *Saccharomyces sphaericus* NÆGELI, appelé par BEIJERINCK, *Saccharomyces acetaethylicus*, développe dans le milieu nutritif de l'éther acétique presque pur.

Bien que les travaux de BEIJERINCK aient donné des résultats très intéressants, ils n'ont pas été continués, ni par lui, ni par d'autres auteurs. Et pourtant les investigations faites dans ce domaine, si mal connu, posent quantité de questions dont les réponses pourraient être précieuses et pour la science et pour l'industrie.

Ces questions sont entre autres les suivantes :

Quelle est :

1. La composition chimique des mélanges d'éthers produits par des espèces de levures différentes.
2. La production maximum d'éther.
3. L'influence des corps nutritifs.
4. L'influence de la source d'azote.
5. L'influence des sels accessoires.
6. L'influence et les limites de la température.
7. L'influence de la concentration du milieu.
8. L'influence de l'aération.
9. L'action des accélérateurs.
10. La limite du pH.

et beaucoup d'autres encore.

L'abandon dans lequel les recherches dans ce domaine ont été délaissées est-il dû au fait que la méthode employée par BEIJERINCK était trop laborieuse ? Nous le supposons.

BEIJERINCK a travaillé avec de grandes quantités de milieu nutritif (une sorte de pâte de raisins diluée) qu'il a inoculée au moyen du *Saccharomyces sphaericus* ; après un certain temps, l'éther a été séparé par distillation ; s'il restait encore assez de substance nutritive dans le résidu, on inoculait à nouveau, redistillait après fermentation, et ainsi de suite, jusqu'à la consommation de tous les corps nutritifs. BEIJERINCK continuait de cette manière jusqu'au moment où il avait recueilli une quantité d'éther assez grande pour l'analyse chimique (analyse élémentaire, et différents dosages physico-chimiques).

Le rendement n'était guère que de 0,2 % au maximum ; il lui fallait donc distiller 25 litres de milieu pour avoir 50 gr. d'éther.

Il va de soi que cette méthode, très laborieuse et longue ne pouvait pas être utilisée pour suivre le développement d'une seule et même culture. Pour atteindre ce but, il fallait une méthode analytique, qui permît un dosage des éthers en faible quantité. Une telle analyse est extrêmement difficile si l'on veut s'adresser au radical alcoolique de l'éther : cependant elle devait devenir plus aisée si l'on se tournait vers le groupe acide de l'éther.

Comme il suffit pour la plupart des recherches de connaître

la quantité et la qualité de l'acide gras combiné dans l'éther, pour suivre le développement des éthers pendant la fermentation, nous avons décidé de pousser nos recherches dans cette direction.

Dans les cas qui peuvent se présenter, où il sera indispensable de savoir à quel radical d'alcool l'acide est lié, il faudra procéder de la manière indiquée par BEIJERINCK, étant donné que pour le moment il n'existe pas d'autre méthode.

Il manquait une méthode analytique, facile à réaliser dans un laboratoire de microbiologie. Nous n'avons donc pas pu approfondir les questions posées et notre travail, qui n'est qu'un premier sondage dans ce domaine nouveau, s'est réduit à ceci :

1. Etablir une méthode analytique facile et pourtant exacte.
2. Chercher une méthode de culture permettant la recherche en série avec des résultats comparables.
3. Faire quelques séries de recherches permettant de vérifier les méthodes proposées.

Les résultats de ces dernières recherches nous autoriseront à tirer quelques conclusions utiles pour des travaux futurs.

CHAPITRE I

La méthode analytique

Dans plusieurs traités analytiques, on trouve des indications sur le dosage des éthers dans le vin et les produits de distillation. Ces méthodes, différentes dans les détails, sont toutes basées sur les principes suivants :

- a. Neutralisation du liquide initial avec de la soude (potasse) caustique.
- b. Séparation des éthers par distillation.
- c. Saponification des éthers avec une quantité de soude (potasse) connue.
- d. Titrage de la quantité de soude (potasse) non employée pour la saponification.
- e. Calcul de la quantité des éthers *en supposant que les éthers présents sont de l'éther éthylique acétique.*

Comme le poids moléculaire de l'éther éthylique acétique est environ 74 et celui de l'éther éthylique valérianique environ 130, on trouve le même résultat pour deux liquides différents, dont l'un contient $x\%$ d'éther éthylique acétique et l'autre, $1,76 x\%$ d'éther éthylique valérianique. On doit donc en conclure que cette méthode n'est applicable que pour le contrôle journalier du distillé sortant d'une même distillerie ; elle convient encore pour la comparaison d'année en année de vins du même vignoble. Absolument, et même relativement, les chiffres obtenus ainsi n'ont pourtant pas une bien grande valeur ! Mais si l'on combine cette méthode avec celle de DUCLAUX, pour le dosage quantitatif et qualitatif des acides gras dans un liquide, on réalise une méthode appropriée au but que nous poursuivons, sous réserve, bien entendu, que cette dernière méthode soit assez sensible pour doser des quantités très faibles d'acides gras.

La marche de l'analyse sera dès lors la suivante, les opérations mentionnées sous a, b et c restant les mêmes :

- d. Libération des acides gras par adjonction d'une quantité d'acide stable équivalente à la quantité d'alcali employée pour la saponification.
- e. Adjonction d'eau distillée pour amener ce liquide à un volume déterminé, par exemple à 125 cm^3 .
- f. Distillation de 110 cm^3 de ce liquide d'après la méthode de DUCLAUX.
- g. Calcul de la quantité d'acide gras (ou des acides gras) dans l'éther.

Mais avant d'examiner les limites inférieures de la sensibilité de la méthode de DUCLAUX, il nous faut nous rendre compte quelles quantités d'acides gras nous devons nous attendre à recevoir pour le dosage, en distillant 100 ou au maximum 200 cm^3 de liquide fermenté.

Dans la publication de BEIJERINCK, on trouve que le rendement en éther est de $0,2\%$ au maximum avec un producteur d'éther très puissant. Dans d'autres publications, on rencontre très peu d'indications sur ce sujet ; ici et là, nous avons trouvé la valeur approximative de $0,06\%$. Nous avons fait

quelques recherches préliminaires avec le *Hansenula saturnus* (KLÖCKER) SYDOW (syn. *Saccharomyces saturnus* KLÖCKER ; *Willia saturnus* (KLÖCKER) HANSEN ; *Williopsis saturnus* (KLÖCKER) ZENDER) et nous avons trouvé environ 0,068 % d'éthers totaux. Pour le calcul de la table suivante, nous nous sommes basé sur une distillation de 100 cm³ du liquide contenant 0,06 % d'éther.

Table N° 1

Acides gras	Poids moléculaire	Ether éthylique P. M.	Acide en % du P. M. d'éther	Quantité acide correspondant à 0,06 % d'éther éthylique	Quantité totale d'acide qu'on doit trouver par la méthode Duclaux
Ac. formique	46.016	74.048	62.14	0.03728	0.02419
Ac. acétique	60.032	88.064	68.17	0.04090	0.03599
Ac. propionique	74.048	102.080	72.54	0.04352	0.04548
Ac. butyrique	88.064	116.096	75.85	0.04551	0.04881
Ac. valérianique	102.080	130.112	78.46	0.04708	0.05179

Dans la dernière colonne de la table, se trouvent les quantités des différents acides dosés d'après la méthode de DUCLAUX et correspondant à 0,06 gr. d'éther éthylique. Ces quantités ne représentent pas les limites que nous exigerons ; elles sont calculées pour avoir une base de comparaison avec les limites inférieures de la méthode de DUCLAUX. On pourrait dire que les chiffres de la dernière colonne représentent les limites pour le dosage des éthers purs ; nous admettons que ce n'est pas la peine de faire des recherches avec les organismes qui produisent moins de 0,06 % d'éther. Mais, si l'odeur produite est un mélange d'éther, il est évident que les limites exigées pour les composants se trouveront encore plus basses que les limites calculées ci-dessus.

Nous ne voulons pas insister sur cette question qui s'expliquera d'elle-même dans la suite de l'exposé.

L'ingénieuse méthode de DUCLAUX est malheureusement peu connue et peu employée en dehors de France, et sa

description complète ne se trouve que dans très peu de traités analytiques. Nous avons jugé préférable, pour faciliter l'intelligence des explications qui suivent, de réimprimer ci-dessous le texte original de DUCLAUX, tel qu'il se trouve dans son *Traité de Microbiologie, Tome III, pag. 384 e.s., Paris 1900.*

“ 198. — **Principe de la méthode**

Le principe de la méthode est le suivant : supposons une solution à 1 ou 2 %, au maximum, d'un acide volatil quelconque ; amenons-la à un volume constant, par exemple de 110 cc., et distillons-la dans un ballon de 250 à 300 cc., en relation avec un réfrigérant ordinaire. Recueillons, dans cette distillation, 10 prises successives, chacune de 10 cc., exactement mesurés. Chacune de ces prises est saturée à part, à l'aide d'une solution alcaline quelconque, et on inscrit à la suite les unes des autres les lectures faites successivement sur la burette, à la suite de ces opérations partielles. Supposons que la quantité totale d'acide introduite dans le ballon exige 100 cc. de la solution alcaline employée. Les lectures successives représenteront alors, en centièmes, les proportions de cet acide existant dans les 10, 20, 30 et 40, etc., premiers centimètres cubes passés à la distillation. Cela posé, on peut considérer comme démontrées les trois lois suivantes :

1. La marche des nombres dans cette série d'opérations est caractéristique de l'acide volatil employé.
2. Il existe un rapport constant entre la quantité d'acide introduite dans le ballon et la quantité qui a distillé à un moment quelconque, de sorte que la quantité passée dans les 10, 20, 30, 40, etc., premiers cc., on peut conclure à la quantité d'acide total introduit dans le ballon de distillation.
3. S'il y a deux acides mélangés, chacun se comporte comme s'il était seul et suit les lois de sa distillation propre.

Voyons maintenant comment on peut utiliser ces lois dans la pratique.

199. — **Cas d'un seul acide**

Examinons d'abord le cas où il n'y a qu'un seul acide présent dans le liquide à distiller. L'opération marche alors toute seule. On mesure exactement 110 cc. On distille assez vite pour que l'opération ne dure pas plus de 40 ou 45 minutes. Chacune des prises de 10 cc., reçue dans un flacon jaugé à col étroit, est saturée à son tour avec de l'eau de chaux. Quant on se sert de teinture de tournesol, il faut arriver au bleu franc, et le virage est facile à saisir même avec les acides gras comme l'acide butyrique et l'acide valérianique, pour lesquels le bleu définitif est précédé pendant longtemps d'une teinte violette, tenant à ce que les sels de chaux de ces acides sont un peu alcalins. Si on cherche le rapport des volumes d'eau de chaux nécessaires pour saturer les 10, 20, 30,... premiers cc. au volume nécessaire pour saturer l'acide total du ballon, on trouve les rapports suivants pour les acides volatils les plus habituellement rencontrés dans les fermentations.

Première table (DUCLAUX)

	Acide formique	Acide acétique	Acide propionique	Acide butyrique	Acide valérianique
10 cc.	3.5	5.9	11.5	17.3	30.5
20 —	7.2	12.2	22.8	32.7	53.0
30 —	11.3	18.7	33.5	47.0	69.5
40 —	15.5	25.6	44.0	58.5	81.0
50 —	20.2	32.7	54.0	68.8	88.5
60 —	25.5	40.4	63.3	77.5	93.5
70 —	31.1	48.7	72.5	84.3	96.5
80 —	38.5	57.5	81.0	90.5	98.3
90 —	48.0	67.5	88.5	94.6	99.5
100 —	59.0	80.0	95.0	97.5	100.0

La marche de ces distillations se traduit dans les courbes suivantes (fig. 32), et on voit que les acides divers passent d'autant plus facilement dans les premières portions du liquide distillé qu'ils sont moins volatils. Avec l'acide formique et l'acide acétique, le titre des divers prises augmente constamment : pour les autres il y a décroissance plus ou moins rapide

du titre acide. Ils se rencontrent dans le liquide distillé, tandis que les acides acétique et formique se concentrent au contraire dans le liquide resté dans la cornue.

Il résulte de cela que la marche des chiffres d'une prise à l'autre suffit souvent pour indiquer l'acide auquel on a affaire et une fois qu'on est assuré de sa nature, on peut, en s'arrêtant à une prise quelconque, et en cherchant dans le tableau ci-dessus le facteur correspondant, savoir la quantité d'acide volatil existant dans le liquide du ballon. Par exemple, si on a fait dix prises, et que la marche des nombres coïncide avec celle de l'acide acétique, il suffira, le facteur correspondant à 100 cc. recueillis étant 80,0, de multiplier par $100/80$ ou plus simplement par $5/4$ le poids d'acide trouvé dans les dix prises pour avoir le poids de l'acide de la liqueur distillée.

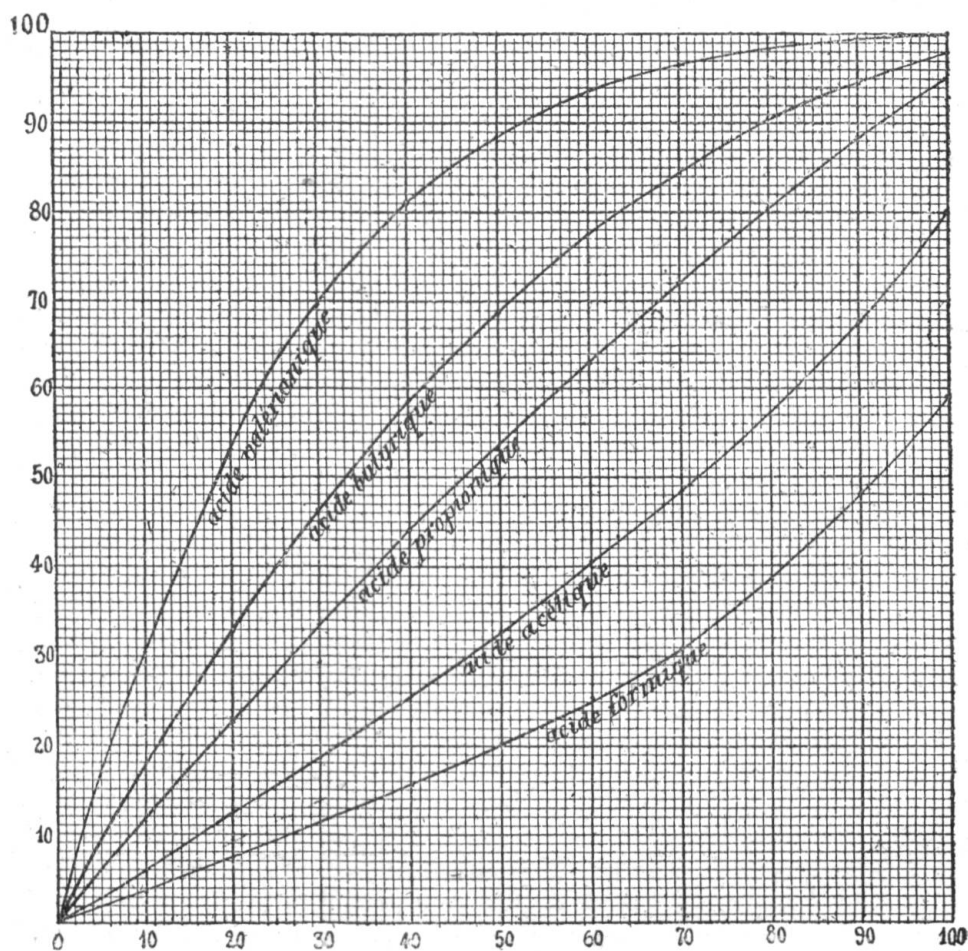


Fig. 32

Le nom de l'acide est donc fourni par la marche des nombres fournis par les diverses prises successives. Au lieu d'évaluer ces nombres en centièmes de l'acide du ballon, sur lequel on ne sait rien à l'avance, il est plus commode de les évaluer en centièmes de l'acide passé dans les 100 cc. du liquide recueilli. Cela revient à prendre le rapport des nombres contenus dans les colonnes du tableau ci-dessus au nombre du bas de la colonne, et on a alors un autre tableau, qui est le suivant :

Deuxième table (DUCLAUX)

	Acide formique	Acide acétique	Acide propionique	Acide butyrique	Acide valériannique
10 cc.	5.9	7.4	12.1	17.6	30.5
20 —	12.2	15.2	24.0	33.6	53.0
30 —	19.0	23.4	35.3	47.5	69.5
40 —	26.4	32.0	46.2	60.0	81.0
50 —	34.4	40.9	56.8	70.6	88.5
60 —	43.2	50.5	66.7	79.5	93.5
70 —	52.8	60.6	76.2	86.5	96.5
80 —	64.4	71.9	85.0	92.5	98.3
90 —	79.6	84.4	93.0	97.0	99.5
100 —	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

Les courbes ci-dessous (fig. 33) traduisent encore la marche de ces nombres, On voit qu'elles se séparent moins que les précédentes, car, parties du même point 0, elles doivent aboutir au même point 100, mais elles sont encore assez distinctes pour bien différencier les acides. Il est donc facile, en comparant aux nombres des tableaux ceux que fournit l'expérience, de savoir à quel acide on a affaire, avec la deuxième table, et de conclure ensuite, à l'aide de la première, de la quantité qui en a passé à la distillation à la quantité totale contenue dans le liquide distillé.

200. — Cas d'un mélange de deux acides

Le cas d'un mélange de deux acides volatils est un peu plus compliqué. J'ai dit plus haut que chacun d'eux se comporte comme s'il était seul, et suit la marche à équivalents égaux

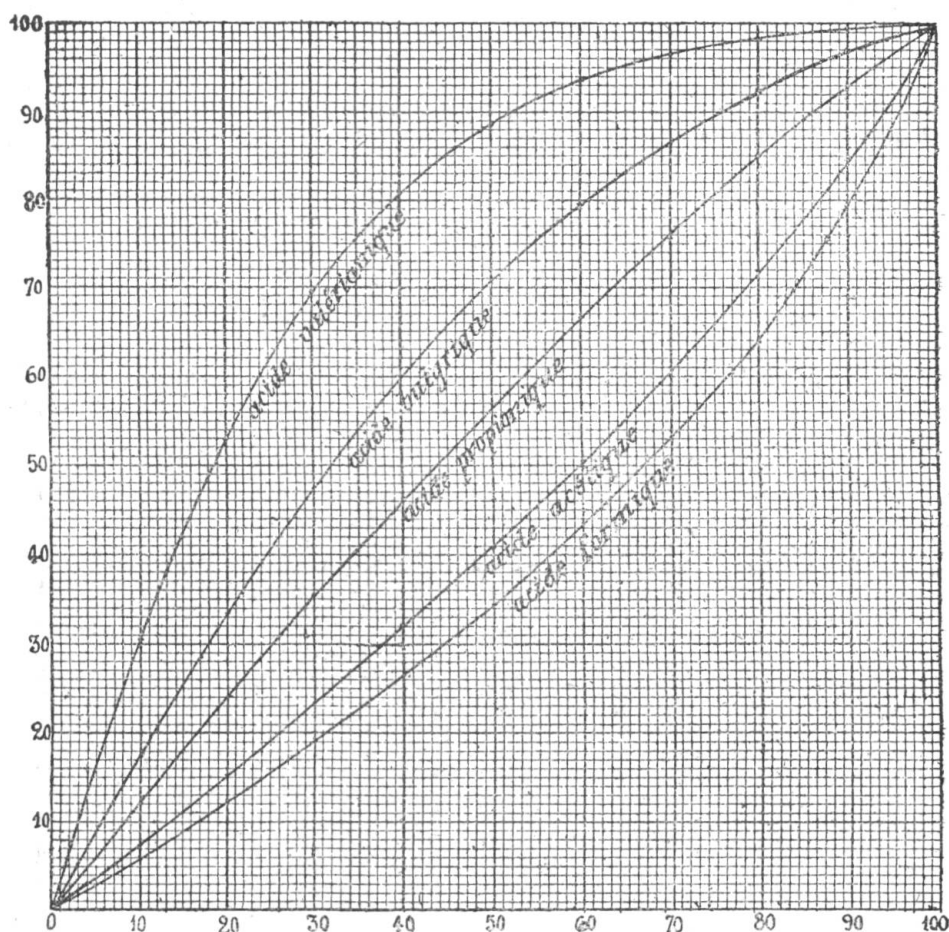


Fig. 33

d'acide acétique et d'acide butyrique, la marche des nombres correspondant à la distillation de ce mélange sera la moyenne des nombres correspondant à chacun des deux acides dans l'un quelconque des tableaux, et la courbe de la distillation sera celle qui, dans chacune des figures qui précèdent, se tiendrait à égale distance, dans le sens vertical, de la courbe de l'acide acétique et de l'acide butyrique. S'il y a au contraire deux molécules d'acide butyrique contre une d'acide acétique, il faudra, pour avoir les nombres de la distillation, ajouter deux fois le nombre correspondant à l'acide butyrique au nombre correspondant à l'acide acétique, et prendre le tiers de la somme obtenue.

Réciproquement, étant donnés les nombres fournis par l'expérience, on peut, en les ordonnant ou en les traduisant

sous forme de courbe, voir s'ils coïncident avec l'une des courbes de la figure 33, et s'il n'y a pas coïncidence, voir entre quelles courbes de la figure la courbe trouvée vient se placer.

Si la courbe résultante a une courbe régulière, convexe vers le haut, comme celles de l'acide formique ou de l'acide acétique, elle ne peut qu'appartenir à un mélange des deux acides. De même si elle est régulière et convexe vers le bas, elle correspond à un mélange de deux des trois autres acides.

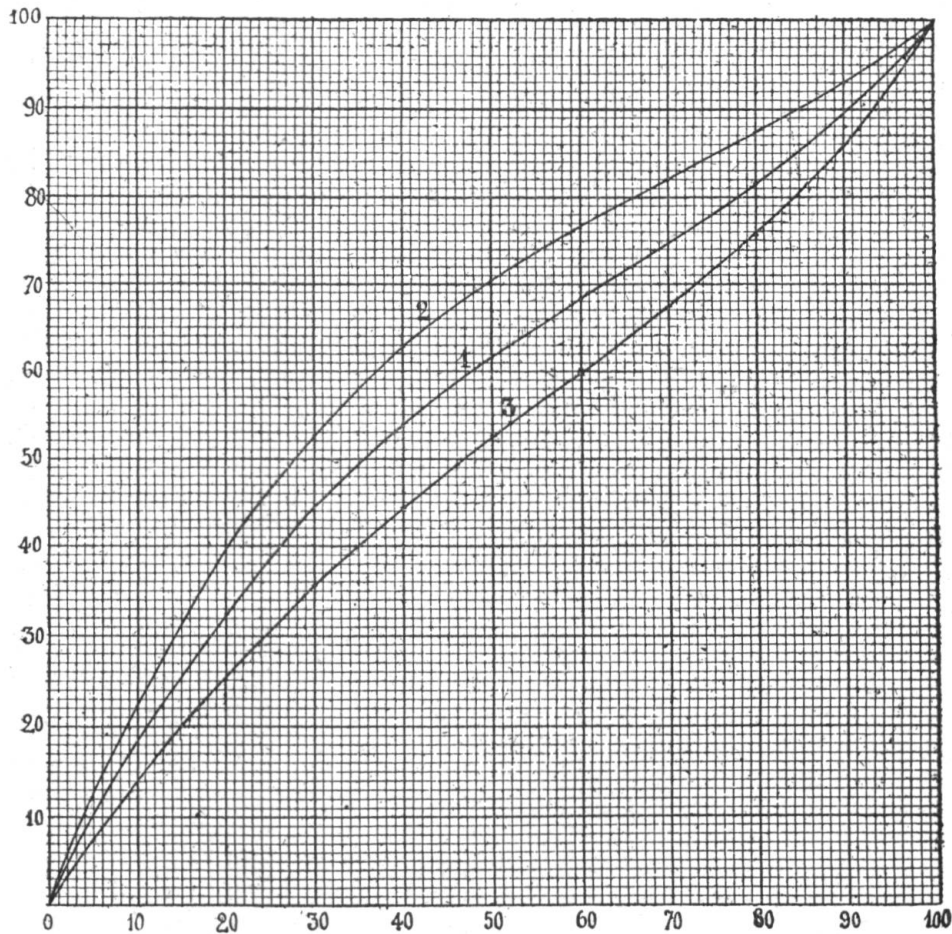


Fig. 34

Si au contraire elle correspond, par exemple, à un mélange d'acide acétique et d'acide butyrique, les nombres ont une marche irrégulière, décroissant au début, au moment du passage de l'acide butyrique, croissant à la fin, au moment où l'acide acétique passe à son tour en plus grande abondance

à la distillation. La courbe prend alors une double courbure comme celle de la fig. 34, qui correspondent à des mélanges d'acide valérianique et d'acide formique. Les titres des prises décroissent au début, parce que c'est à ce moment que l'acide valérianique distille : ils croissent à la fin, à cause de l'acide formique, et le point d'inflexion de la courbe varie avec la proportion des acides mélangés.

Une courbe à double courbure, si peu accentuée qu'elle soit, ou une marche non régulièrement croissante ni décroissante des nombres relatifs à chaque prise, indique donc un mélange d'un acide supérieur à l'acide propionique avec de l'acide acétique ou formique, et il reste à chercher quelle est la combinaison d'acides qui, distillée, donne les chiffres les plus voisins des chiffres trouvés. Généralement, il n'y a pas d'ambiguïté. La composition qualitative et quantitative des acides recherchés apparaît nettement. Pour éviter les tâtonnements qu'exige la recherche de la combinaison qui raccorde le mieux la théorie à l'expérience, il suffit de faire par avance un certain nombre de schémas de distillation avec des acides différents, mélangés en proportions diverses, et à chercher lequel de ces schémas représente le mieux les nombres fournis par l'expérience. Voici un certain nombre de ces schémas de distillation pour des mélanges divers des acides les plus fréquemment rencontrés dans les fermentations. On ne s'est astreint, pour tous ces mélanges, qu'à calculer les rapports pour la région dans laquelle les courbes s'écartent le plus, et où les mesures sont les plus précises. Cette région est variable d'un mélange à l'autre, et indiquée par le volume des prises pour lesquelles elle commence et elle finit.

201. — Tables de distillation

Voici quels sont, dans ces limites, pour les mélanges d'acides dont les proportions sont indiquées dans la première colonne, les rapports de distillation qu'on peut déduire des nombres de la page 388.

Mélanges d'acide valérianique et d'acide acétique

	20	30	40	50	60	70 cc.
<i>Acide valér. pur</i>	53.0	69.5	81.0	88.5	93.5	96.5
20 ac. Val: 1 ac. Ac.	51.2	67.3	78.6	86.2	91.4	94.8
10 » 1 »	49.5	65.3	76.5	84.2	89.6	93.3
8 » 1 »	48.8	64.4	74.4	83.2	88.7	92.5
6 » 1 »	47.6	62.9	74.0	81.7	87.3	91.4
5 » 1 »	46.7	61.8	72.8	80.6	86.1	90.6
4 » 1 »	45.4	60.2	71.2	79.0	84.9	89.4
3 » 1 »	43.5	58.0	68.8	76.6	82.8	87.6
2 » 1 »	40.4	54.1	64.7	70.1	79.2	84.6
1 » 1 »	34.1	46.4	56.5	64.7	72.0	78.7
1 » 2 »	27.8	38.8	48.3	56.8	64.8	72.8
1 » 3 »	24.6	34.4	44.4	52.8	61.2	69.8
1 » 4 »	22.8	32.6	41.8	50.4	59.1	67.8
1 » 5 »	21.5	31.1	40.1	48.8	57.7	66.8
1 » 6 »	20.6	30.0	39.0	47.7	56.6	66.0
1 » 8 »	19.4	28.5	37.4	46.2	55.3	64.8
1 » 10 »	18.6	27.6	36.4	45.2	54.4	64.1
1 » 20 »	17.0	25.1	34.3	43.1	52.5	63.1
<i>Acide acétique pur</i>	15.2	23.4	32.0	40.9	50.5	60.9

Mélanges d'acide butyrique et d'acide acétique

	30	40	50	60	70	80 cc.
<i>Acide butyr. pur</i>	47.5	60.0	70.6	79.5	86.5	92.5
10 ac. But: 1 ac. Ac.	45.3	57.5	67.9	76.9	84.2	90.6
5 » 1 »	43.5	55.3	65.6	74.7	82.2	89.1
4 » 1 »	42.6	54.4	64.6	73.7	83.0	88.4
3 » 1 »	41.5	53.0	63.2	72.2	80.1	87.3
2 » 1 »	39.5	50.8	60.7	69.8	78.0	85.6
1 » 1 »	35.2	46.0	55.7	65.0	73.7	82.2
1 » 2 »	31.4	41.3	50.8	60.2	69.4	78.8
1 » 3 »	29.4	39.0	48.8	57.7	67.3	77.0
1 » 4 »	28.2	37.6	46.8	56.3	66.0	76.0
1 » 5 »	27.4	36.7	45.8	55.3	65.2	75.3
1 » 10 »	25.6	34.5	43.6	53.1	63.2	73.8

Mélanges d'acide propionique et d'acide acétique

	30	40	50	60	70	80 cc.
<i>Acide propion. pur</i>	35.3	46.2	56.8	66.7	76.2	85.0
5 ac. Prop : 1 ac. Ac.	33.3	43.8	54.2	64.0	73.6	82.8
4 » 1 »	32.9	43.3	53.6	63.4	73.0	82.2
3 » 1 »	32.3	42.6	52.8	62.6	72.4	81.7
2 » 1 »	31.2	41.1	51.9	61.3	71.1	80.6
1 » 1 »	29.3	39.1	48.9	58.6	68.5	78.5
1 » 2 »	27.4	36.7	46.2	55.9	66.0	76.3
1 » 3 »	26.4	35.5	44.9	54.5	64.7	75.2
1 » 4 »	25.8	34.8	44.1	53.7	64.0	74.5
1 » 5 »	25.4	34.4	43.6	52.2	63.5	74.0

Mélanges d'acide valérianique et d'acide butyrique

	10	20	30	40	50	60 cc.
<i>Acide valér. pur</i>	30.5	53.0	69.5	81.0	88.5	93.5
10 ac. Val. : 1 ac. But.	29.3	51.2	67.5	79.1	86.9	92.2
5 » 1 »	28.3	49.8	65.8	77.5	85.5	91.2
4 » 1 »	27.9	49.1	65.1	76.8	84.9	90.7
3 » 1 »	27.3	48.1	64.0	75.8	84.0	90.0
2 » 1 »	26.2	46.5	62.2	74.0	82.5	88.8
1 » 1 »	24.1	43.3	58.5	70.5	79.5	86.5
1 » 2 »	21.9	40.1	54.8	67.0	76.6	84.2
1 » 3 »	20.8	38.4	52.8	65.2	75.1	83.0
1 » 4 »	20.2	37.5	51.9	64.2	74.2	82.2
1 » 5 »	19.8	37.0	51.2	63.5	73.6	81.8
1 » 10 »	18.8	35.4	49.5	61.8	75.2	88.0
<i>Acide butyr. pur</i>	17.6	33.6	47.5	60.0	70.6	79.5

Mélanges d'acide valérianique et d'acide propionique

	20	30	40	50	60	70 cc.
<i>Acide valér. pur</i>	53.0	69.5	81.0	88.5	93.5	96.5
10 ac. Val. : 1 ac. Prop.	50.4	66.4	77.8	85.5	91.0	94.6
5 » 1 »	48.2	63.8	75.2	83.2	89.0	93.2
4 » 1 »	47.2	62.6	74.0	82.2	88.1	92.4
3 » 1 »	45.7	60.9	72.3	80.6	86.8	91.4
2 » 1 »	43.3	58.1	69.4	77.9	84.6	89.7
1 » 1 »	38.5	52.4	63.6	77.6	80.1	86.3
1 » 2 »	33.7	46.7	57.8	66.7	75.6	83.0
1 » 3 »	31.2	43.8	54.8	64.7	73.4	81.3
1 » 4 »	29.8	42.1	53.2	63.2	72.1	80.2
1 » 5 »	28.8	41.0	52.2	62.1	71.0	79.6
1 » 10 »	26.6	38.4	48.4	59.7	69.1	78.0
<i>Acide propion. pur</i>	24.0	35.3	46.2	56.8	66.7	76.2

Mélanges d'acide butyrique et d'acide propionique

	20	30	40	50	60	70 cc.
<i>Acide butyr. pur</i>	33.6	47.5	60.0	70.6	79.5	86.5
8 ac. But. : 1 ac. Prop.	32.5	46.1	58.5	69.1	78.1	85.3
4 » 1 »	31.7	45.0	57.2	67.8	77.0	84.4
3 » 1 »	31.2	44.4	56.5	67.1	76.3	83.9
2 » 1 »	30.4	43.4	55.4	66.0	75.1	83.3
1 » 1 »	28.8	41.4	53.1	63.7	73.1	81.3
1 » 2 »	27.2	39.4	50.8	61.2	71.0	79.6
1 » 3 »	26.6	38.3	49.6	60.2	69.9	78.8
1 » 4 »	25.9	37.7	49.0	59.5	69.2	78.2
1 » 8 »	25.0	36.7	47.7	58.3	68.1	77.3
<i>Acide propion. pur</i>	24.0	35.3	46.2	56.8	66.7	76.2

Ces tables facilitent singulièrement le travail. Une fois calculée la série des rapports centésimaux pour la fermentation soumise à l'étude, on est averti tout de suite, quand on a un peu l'habitude, soit par la marche des nombres, soit par l'odeur des premières ou des dernières prises, des acides auxquels on a affaire, et on contrôle cette première indication en cherchant sur les tables si la marche des nombres trouvés par l'expérience coïncide avec une des séries calculées. Cette coïncidence n'est naturellement jamais parfaite : les incertitudes de la méthode des distillations, les irrégularités inévitables dans la mesure des prises et dans les dosages ne le permettent pas. Il faut se déclarer satisfait quand la coïncidence a lieu à une ou deux unités du dernier chiffre près, en plus ou en moins. Quand la série trouvée se confond avec ce degré d'approximation avec une des séries du tableau, ce tableau indique de suite la nature et la proportion des acides mélangés. Quand elle se place entre deux séries consécutives du tableau, suivant qu'elle est à égale distance des deux, ou plus près de l'une que de l'autre, on juge aisément, rien que par un calcul mental, du rapport des deux acides dans le mélange. ”

Jusqu'ici, nous avons cité textuellement DUCLAUX. Dans les pages qui vont suivre, nous aurons à parler fréquemment des chiffres donnés par DUCLAUX dans sa première et sa deuxième table ; pour faciliter l'explication, nous appellerons les chiffres de la première table « valeurs de quantité DUCLAUX » et la cour-

be qui les exprime « courbe de quantité DUCLAUX », nous appellerons ceux de la deuxième table « valeur d'identification DUCLAUX », et la courbe qui y correspond « courbe d'identification DUCLAUX ». Comme ces explications sont assez longues, nous emploierons comme abréviations les quatre expressions suivantes : « v.q.D. », « c.q.D. », « v.id.D. » et « c.id.D. ».

Nous avons cherché en vain dans les œuvres de DUCLAUX des indications sur la limite inférieure de la méthode ; cette lacune nous a forcé à l'établir nous-même.

En commençant avec l'acide formique, nous avons immédiatement constaté, que la marche de la distillation divergeait sensiblement de celle donnée par DUCLAUX. Ayant cru que notre acide n'était pas assez pur, nous en avons fait venir un second, lequel a donné assez exactement, le même résultat que le premier. Les deux acides étant de la qualité qu'on vend dans le commerce, sous le nom d'acide formique pur, devaient sembler-il, être suffisants pour nos recherches. Pour éviter toute erreur, nous avons cependant fait venir une certaine quantité d'acide formique chimiquement pur pour recherches scientifiques (Kahlbaum). Les expériences faites avec ce dernier acide ont confirmé les résultats obtenus avec les deux premiers.

Table No 2
Valeurs de quantités (Nielsen)
Acide formique

Solution d'acide formique %	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Essai N°
1.00	4.1	8.8	13.7	18.9	24.5	30.7	37.8	46.7	56.3	69.6	78
0.90	4.0	8.6	13.5	18.5	24.2	30.4	37.3	45.5	55.8	69.2	70
0.80	4.0	8.6	13.4	18.6	24.2	30.4	37.4	45.6	55.8	69.4	71
0.70	4.2	8.6	13.4	18.5	24.0	30.1	37.0	44.9	55.1	69.0	72
0.60	4.1	8.6	13.5	18.7	24.3	30.5	37.7	46.1	56.5	69.6	73
0.50	3.9	8.4	13.3	18.4	24.0	30.2	37.2	45.5	55.9	69.4	74
0.40	4.1	8.6	13.3	18.5	24.1	30.3	37.4	45.9	56.2	69.5	75
0.30	4.1	8.5	13.3	18.5	24.2	30.4	37.4	45.8	56.3	70.1	76
0.20	4.0	8.4	13.2	18.2	23.8	30.0	36.9	45.2	55.3	69.1	64
0.10	3.9	8.3	13.0	18.0	23.5	29.8	36.8	45.0	55.4	68.9	65
Moyenne v q.D.	4.0	8.5	13.4	18.5	24.1	30.3	37.3	45.6	55.9	69.4	Moyenne v q D.
	3.5	7.2	11.3	15.5	20.2	25.5	31.1	38.5	48.0	59.0	

Table No 3

Valeurs d'identification (Nielsen)

Acide formique

Solution d'acide formique %	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Essai N°
1.00	5.8	12.6	19.6	27.2	35.2	44.1	54.3	66.3	80.9	100	78
0.90	5.8	12.4	19.4	26.8	34.9	43.9	53.9	65.8	80.6	100	70
0.80	5.8	12.4	19.3	26.7	34.9	43.8	53.9	65.7	80.4	100	71
0.70	6.0	12.5	19.4	26.8	34.9	43.6	53.6	65.2	79.8	100	72
0.60	5.9	12.4	19.3	26.8	35.0	43.8	54.1	66.3	81.2	100	73
0.50	5.7	12.1	19.1	26.5	34.6	43.6	53.6	65.6	80.6	100	74
0.40	6.0	12.4	19.2	26.6	34.7	43.7	53.9	66.0	80.9	100	75
0.30	5.9	12.2	19.0	26.5	34.5	43.4	53.3	65.4	80.3	100	76
0.20	5.8	12.2	19.1	26.4	34.4	43.4	53.5	65.4	80.0	100	64
0.10	5.7	12.1	18.8	26.2	34.1	43.2	53.3	65.3	80.3	100	65
Moyenne	5.8	12.3	19.2	26.7	34.7	43.7	53.7	65.7	80.5	100	Moyenne
v. id. D	5.9	12.2	19.0	26.4	34.4	43.2	52.8	64.6	79.6	100	v id. D.

Dans les deux tables qui précèdent, nous donneront les valeurs de quantités (table n° 2) et les valeurs d'identification (table n° 3), constatées par nous dans des solutions d'acide formique, dont la concentration varie entre 1 % et 0,1 %. L'écart entre la quantité totale trouvée par Duclaux et celle constatée par nous, est de 10,1 unités. En d'autres termes, nous avons trouvé 17,6 % de plus.

En cherchant dans les premières publications relatives à cette méthode, (Annales de Chimie et de Physique, V^{me} série, Tome II, 1874, pag. 289 e.s.), nous avons constaté que Duclaux lui-même a aussi trouvé pour l'acide formique une valeur totale plus élevée que 59, soit 63,5. Ci-dessous, les valeurs de quantités en question.

	v.q.D. constaté	v.q.D. calculé
1.	3,5	3,5
2.	7,6	7,3
3.	11,8	11,6
4.	16,3	16,3
5.	21,6	21,6
6.	27,3	27,5
7.	33,7	34,1
8.	41,4	41,4
9.	50,7	49,7
10.	63,5	58,8

DUCLAUX a donné pour cette divergence, l'explication suivante :

« La marche de la distillation est encore fidèlement représentée par une formule analogue aux précédentes. Les irrégularités que l'on observe partout sur les derniers nombres de la série, ne sont pas importantes. La capacité de la cornue s'accroît lorsque la distillation s'avance, et les parois mises à nu restent chargées d'une quantité d'acide dont le calcul ne peut tenir compte, et que l'on ne recueille pas dans l'expérience. De là les différences observées. »

Mais en plaçant les valeurs de quantités constatées par nous (moyenne de 10 expériences) à côté des valeurs calculées par DUCLAUX, nous nous sommes aperçu que la marche de la distillation n'était plus représentée par la formule invoquée par DUCLAUX.

	V.q.Nielsen. constaté	V.q.D. calculé
1.	4,0	3,5
2.	8,5	7,3
3.	13,4	11,6
4.	18,5	16,3
5.	24,1	21,6
6.	30,3	27,5
7.	37,3	34,1
8.	45,6	41,4
9.	55,9	49,7
10.	69,4	58,8

ACIDE FORMIQUE.

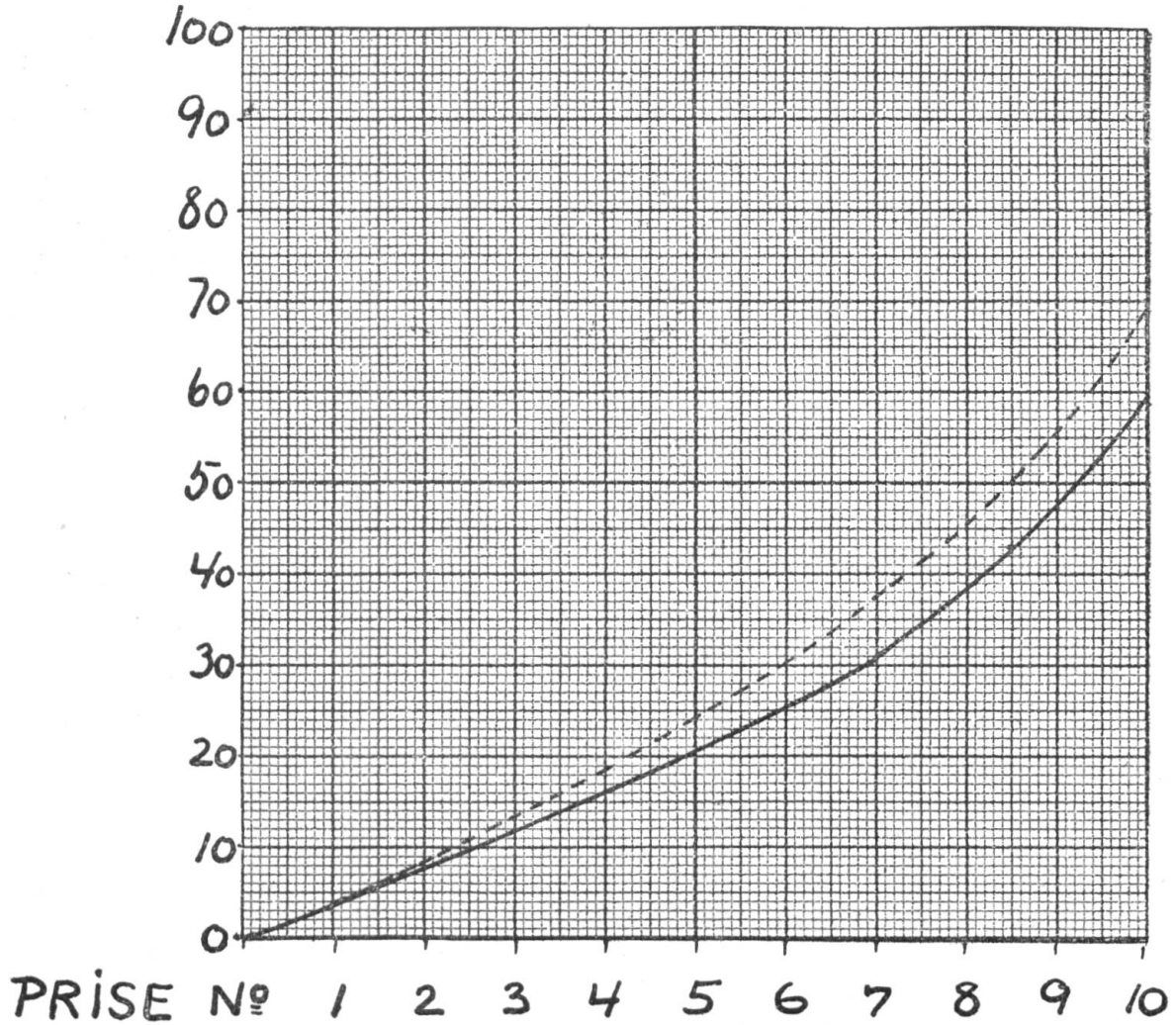


Fig. 1.

— C.Q. DUCLAUX.
- - - C.Q. NIELSEN.

Comme les valeurs d'identification représentent les valeurs de quantités DUCLAUX et celles constatées par nous sont pratiquement égales, cela signifie évidemment, que la courbe de quantité Duclaux ne change pas de forme, mais qu'elle se déplace. On peut se rendre compte sur la figure n° 1 que la courbe de Duclaux recouvrirait la nôtre si on la faisait tourner autour du point 0 en amenant son point terminal 10,4 unités plus haut.

Ce n'est pas notre but d'approfondir cette question dans le présent travail ; nous nous bornons à constater un fait et à employer les valeurs nouvelles.

Les résultats des recherches sur la limite inférieure de la méthode de Duclaux pour l'acide formique sont contenus ci-dessous dans la table n° 4.

Table N° 4
Acide formique

Essai N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Acide %	Trouvé %
66	5.4	11.6	18.1	25.2	33.2	41.9	52.0	64.0	79.3	100	0.04579	101.0
67	5.0	11.1	17.5	24.5	32.4	41.5	51.3	63.5	79.1	100	0.02015	100.3
68	4.7	10.7	17.2	24.0	31.6	40.4	50.2	62.8	78.5	100	0.00887	97.7
69	4.3	10.6	16.6	23.9	32.6	41.4	51.1	63.3	78.7	100	0.00390	111.4
v. id. D. Nielsen	5.8	12.3	19.2	26.7	34.7	43.7	53.7	65.7	80.5	100	—	—

Dans les colonnes 1 à 10, nous avons donné les valeurs d'identification des prises successives que nous avons constatées ; dans la colonne suivante, nous indiquons la quantité d'acide exprimée en pourcent du liquide initial et dans la dernière colonne, la quantité d'acide constatée à l'analyse et exprimée en pourcent de la quantité mise au début.

En comparant les valeurs d'identification D.N. avec celles obtenues comme résultats des distillations d'acide formique en concentration très faibles, on voit que ces dernières valeurs sont plus ou moins déformées, surtout celles des premiè-

res prises. Cependant les différences ne sont pas assez grandes pour gêner l'identification de l'acide.

En outre, les résultats de l'essai n° 68 nous montrent qu'avec une teneur en acide formique d'environ 0,009 %, les valeurs d'identification indiquent encore assez nettement la présence d'acide formique. Un rendement de 97,7 est acceptable.

En nous basant sur ces résultats, nous avons pu fixer à 0,009 % la limite approximative de la méthode de Duclaux pour l'acide formique.

Nous avons traité les quatre autres acides, soient les acides acétique, propionique, butyrique et valérianique, de la même manière que l'acide formique. Les résultats des recherches avec l'acide acétique se trouvent dans la table n° 5.

Table N° 5

Acide acétique

Essai N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Acide %	Trouvé %
55	7.2	14.8	22.8	31.6	40.5	49.9	60.3	71.8	84.5	100	0.02656	101.1
56	7.4	15.0	22.4	30.7	40.0	49.7	60.0	71.6	84.6	100	0.01328	99.4
57	6.6	14.1	21.8	29.7	38.8	48.7	59.1	70.9	83.6	100	0.00664	100.0
58	5.6	11.7	20.3	27.0	36.5	46.7	57.7	70.0	83.7	100	0.00332	113.3
v. id. D.	7.4	15.2	23.4	32.0	40.9	50.5	60.6	71.9	84.4	100	—	—

Pour les investigations avec l'acide acétique, nous avons employé l'acide acétique glacial pur de la qualité ordinairement employée dans les laboratoires scientifiques. Avec des concentrations d'acide acétique un peu plus fortes que celles mentionnées dans la table n° 5, nous avons trouvé des valeurs de quantités identiques à celles données par DUCLAUX.

Nous avons fixé à 0,007 % la limite approximative pour l'acide acétique.

Avec l'acide propionique, nous avons eu des difficultés sur lesquelles nous reviendrons plus tard. Les résultats de toutes les distillations faites nous ont donné l'impression que les

valeurs de quantités données par DUCLAUX sont un peu trop élevées en général. Ainsi pour la valeur finale nous n'avons jamais pu trouver 95; nous sommes presque toujours arrivé aux environs de 93,7. La différence n'étant cependant pas très grande, nous avons accepté les valeurs données par DUCLAUX, telles quelles. L'acide employé était celui qu'on utilise pour les recherches scientifiques.

Les résultats de nos recherches sur la limite inférieure de la méthode de DUCLAUX appliquée à l'acide propionique sont enregistrées dans la table n° 6.

Table N° 6
Acide propionique

Essai N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Acide %	Trouvé %
80	11.7	23.2	34.4	45.0	55.4	65.9	74.9	83.9	92.3	100	0.100	98.7
81	11.8	23.0	34.1	44.8	55.0	65.2	74.8	83.8	92.0	100	0.048	97.6
82	12.3	24.2	35.1	45.8	56.0	65.8	75.1	84.0	92.3	100	0.023	97.9
83	11.9	23.5	34.1	44.5	54.2	63.9	73.4	82.2	91.1	100	0.008	78.5
v. id. D.	12.1	24.0	35.3	46.2	56.8	66.7	76.2	85.0	93.0	100	—	—

Nous avons déterminé 0,023 % comme limite approximative pour l'acide propionique.

Pour les recherches faites sur les acides butyrique et valériannique, nous avons employé des acides purs de la qualité ordinaire. Les valeurs de quantités de ces acides s'écartaient un peu pour les différentes prises des v.q.D. ; au total toutefois, nous avons trouvé respectivement 97,5 et 100, chiffres tout à fait en concordance avec ceux de DUCLAUX. C'est pourquoi nous les avons jugés suffisamment purs pour nos recherches des limites. On doit cependant se garder d'attribuer à la déformation des valeurs d'identification pour les solutions étendues, une importance trop grande ; le fait que les acides employés n'étaient pas absolument purs, explique cette discordance. Les valeurs obtenues avec la plus forte concentration se sont révélées être les meilleures pour la comparaison des séries de valeurs d'identification ; nous avons déjà pu

nous en rendre compte pendant nos essais préliminaires où nous opérions avec des concentrations considérables.

Nous effectuerons ici la comparaison avec les valeurs de notre essai n° 84, pour le cas de l'acide butyrique, et pour l'acide valérianique, avec les valeurs de l'essai n° 90. (Voir les tables n° 7 et n° 8.)

Nos recherches nous ont finalement donné les limites approximatives de l'acide butyrique et de l'acide valérianique. Elles sont pour le premier : 0,025 % et pour le second 0,030 %.

Table N° 7
Acide butyrique

Essai N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Acide %	Trouvé %
84	16.8	31.9	45.3	57.3	67.8	76.9	84.8	91.1	96.1	100	0.1106	99.5
85	16.4	31.3	44.8	56.7	67.4	76.2	83.9	90.4	95.7	100	0.0531	98.8
86	16.6	30.9	43.8	55.7	66.0	75.1	83.1	89.8	95.4	100	0.0233	97.1
87	15.3	28.2	40.3	51.2	61.6	70.6	79.9	87.1	93.8	100	0.0103	96.3
v. id. D	17.6	33.6	47.5	60.0	70.6	79.5	86.5	92.5	97.0	100	—	—

Table N° 8
Acide valérianique

Essai N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Acide %	Trouvé %
90	27.8	52.6	64.7	76.7	85.4	91.1	95.3	97.8	99.1	100	0.1182	99.3
91	26.4	46.5	62.0	74.0	83.1	89.6	93.9	96.7	98.6	100	0.0567	99.9
92	25.6	45.7	61.3	73.1	81.9	88.1	92.5	95.7	98.1	100	0.0272	96.2
93	24.2	43.3	57.8	68.8	76.9	83.6	88.6	93.2	96.6	100	0.0131	96.4
v. id. D	30.5	53.0	69.5	81.0	88.5	93.5	96.5	98.3	99.5	100	—	—

Conclusions : Si nous mettons côte à côte les valeurs-limites exigées (voir table n° 1) et les valeurs-limites constatées, (voir table n° 9), nous nous apercevons que la méthode de DUCLAUX est utilisable pour nos recherches, surtout si l'on observe la précaution d'employer une quantité de liquide voisine de 200 cm³ pour la distillation.

Table N° 9

Acides gras	Quantité totale d'acide qu'on doit trouver par la méthode DUCLAUX	Limite inférieure de la méthode de DUCLAUX
Acide formique	0 024	0.009
Acide acétique	0.036	0.007
Acide propionique	0.045	0.023
Acide butyrique	0.049	0.025
Acide valérianique	0 052	0.030

Dans les cas où le dosage effectué selon notre méthode s'applique à un mélange d'éthers, nous avons constaté le fait suivant : Si l'un des deux éthers est représenté à une concentration telle, que la quantité d'acide qu'il peut libérer soit de beaucoup inférieure à la quantité exigée par la limite inférieure de la méthode, l'analyse demeurera cependant juste à condition que le second des éthers soit en concentration suffisante pour l'analyse. — Nous donnerons plus tard, dans le texte où nous appliquerons le calcul des résultats, des exemples à ce propos.

La méthode de DUCLAUX nous apparaît comme très précieuse pour la biologie ; on s'étonne de la précision à laquelle on peut arriver, à condition que l'on prenne toutes les précautions nécessaires. Dans la description même de DUCLAUX, plusieurs de ces précautions ne sont pas mentionnées ; c'est la raison pour laquelle nous donnons ci-dessous toutes les observations que nous avons faites pendant cette série de recherches.

Appareil à distiller et autres instruments

DUCLAUX décrit ainsi son appareil à distiller :

«un ballon de 250 à 300 cm³, en relation avec un réfrigérant ordinaire. »

Il est utile d'ajouter à cette description, quelques détails.

Les acides gras sont extrêmement volatils ; en conséquence il faut choisir avec beaucoup de soin des bouchons neufs pour l'appareil ; car, si l'appareil n'est pas *absolument étanche*,

l'analyse ne vaut rien. Ayant commencé nos recherches à blanc avec un montage de ce genre, nous avons eu beaucoup d'ennuis, car il nous fallait changer les bouchons après chaque dixième distillation environ. Dans les expériences à blanc, une erreur d'appareil est immédiatement décelée ; ce n'est pas le cas pendant une analyse ordinaire. Comme nous avons à faire plusieurs centaines de distillations, nous avons construit un appareil à distillation muni d'une fermeture au mercure. Le ballon à distiller (en verre de Jena n° 20) est muni d'un double col destiné à recevoir le mercure ; le tube de communication, qui forme une seule pièce avec le réfrigérant, plonge dans le mercure ; une étanchéité absolue et permanente est assurée de cette façon.

Le réfrigérant. — Il faut qu'il soit à *boules allongées* de manière à empêcher le distillat de s'accumuler quelque part dans le réfrigérant.

Les détails sont d'ailleurs clairement représentés dans la planche n° I (photographie de notre appareil). On voudra bien s'y reporter.

Pour la mesure des prises différentes, nous avons employé des éprouvettes (en verre de Jena n° 20), exactement jaugées à 10 cm³.

La burette utilisée contenait 25 cm³, avec une longueur d'échelle voisine de 2 cm par cm³. Cette burette qui donne environ 35 gouttes par cm³ permet facilement la lecture du 1/100 cm³.

Il va de soi, qu'après chaque analyse il faut laver et sécher l'intérieur de l'appareil de même que les éprouvettes. Comme cette opération faite de la manière ordinaire est assez longue, nous avons cherché et trouvé un autre procédé qui nous a considérablement facilité cette opération. Le lavage et séchage se font maintenant en 20 minutes environ sans démonter le réfrigérant. Comme cette méthode est indispensable dans le cas où il faut faire plusieurs distillations par jour, nous en donnons ci-dessous la description :

1. Détacher le ballon à distiller et lui substituer un réci-

- pient à large ouverture d'une contenance de quelques litres.
2. Faire passer à contre-sens dans l'intérieur du réfrigérant, l'eau qui alimente le manchon du réfrigérant, en fixant l'orifice inférieur du tube de caoutchouc de vidage au tube de sortie du distillat.
 3. Vider l'extérieur et l'intérieur du réfrigérant en détachant du robinet le tube d'alimentation d'eau.
 4. Sécher l'intérieur du réfrigérant en y faisant circuler de l'air chaud provenant du séchoir dont la description suit.

Le séchoir est constitué par un tube de cuivre (10 mm. de diamètre et 1,25 m. de longueur) dont la partie centrale est recourbée en spirale (9 spires, — environ 50 mm. de diamètre); l'extrémité inférieure du tube est droite et horizontale (30 cm. de longueur). Elle sert à l'entrée de l'air. L'extrémité supérieure est droite, horizontale, puis dans les derniers 15 cm., verticale.

En plaçant un bec de Bunsen au-dessous de la spirale, et en insufflant avec une soufflerie de laboratoire ordinaire (trompe à eau dans un flacon de Wulff), on obtient toute la quantité d'air chaud dont on a besoin. Dans la planche n° I, le séchoir et la soufflerie sont bien visibles ; sur le tube vertical du séchoir, une éprouvette jaugée est en train de sécher.

Eau distillée

Les différentes prises sont recueillies dans des éprouvettes jaugées à 10 cm³. Aussitôt qu'une éprouvette est remplie, on verse le liquide dans un flacon d'Erlenmeyer d'environ 100 cm³ ; on rince à deux reprises l'éprouvette avec 10 cm³ d'eau distillée, que l'on ajoute au distillat, puis on sèche l'éprouvette. La titration se fait de la manière ordinaire en tenant compte des indications mentionnées plus loin.

Comme on reçoit fréquemment des solutions d'acide très étendues, il faut tenir compte de la réaction de l'eau distillée employée pour rincer les éprouvettes.

On procèdera en conséquence de la manière suivante : On

ajoute à une quantité d'eau distillée (environ 250 cm³ par série), la quantité nécessaire de phénolphtaléine (soient environ 2 gouttes par 100 cm³); puis, en ajoutant de la solution alcaline, on amène cette eau à la couleur de virage adoptée pour les titrations. Cette eau est employée pour rincer les éprouvettes.

En procédant de cette manière, on élimine toute erreur provenant de l'acidité de l'eau distillée et l'on n'a plus besoin d'ajouter d'indicateur à chaque prise.

La titration

DUCLAUX a employé comme indicateur pour les titrations, le tournesol. Dans le « Guide pour les manipulations de Chimie Biologique de Bertrand et Thomas », l'emploi de la phénolphtaléine est recommandé pour la méthode de DUCLAUX. D'après KOLTHOFF (Der Gebrauch von Farbindicatoren) on peut employer comme indicateurs des acides gras, la phénolphtaléine, le bleu de thymol, le rouge de phénol et le rouge neutre. Nous avons fait une série de recherches avec tous ces indicateurs, en titrant nos différents acides en solutions étendues. Les résultats obtenus nous ont amené à la conclusion que, pour nous, le virage de la phénolphtaléine est le plus facile à saisir, nous avons donc employé cet indicateur pour toutes les titrations. Comme il y a dans cette question un facteur subjectif, qui dépend des yeux de l'expérimentateur, nous n'osons pas prétendre que notre choix soit le plus juste.

Il n'est pas exclu que les différences observées entre les v.q.D. et les nôtres (acide formique — acide propionique), soient en partie causées par le fait que DUCLAUX a employé un autre indicateur que nous. Une révision totale de toutes les valeurs de quantités de DUCLAUX, faite par un chimiste connaissant à fond le domaine des indicateurs nouveaux, pourrait rendre de grands services.

Pour la titration, DUCLAUX a employé l'eau de chaux et la recommande vivement dans son traité. Pour toutes les titrations des acides formique, acétique, butyrique et valérianique, nous avons également employé cette solution. Nous pensons

comme DUCLAUX, que l'eau de chaux a beaucoup d'avantages sur les autres solutions alcalines.

Mais pour les titrations d'acide propionique en solution très étendue, la saturation avec l'eau de chaux est lente et le virage de la phénolphtaléine n'est pas net. Après quelques essais avec différentes bases, nous avons trouvé que la titration de l'acide propionique se faisait le mieux avec de la potasse caustique; c'est elle que nous avons utilisée pour toutes les titrations déjà mentionnées.

Pour obtenir des résultats titrimétriques aussi exacts que possible, il faut employer les liquides alcalins à une dilution appropriée à chaque cas. Nous procédons toujours de manière à employer pour la titration de dix prises, 30 à 40 cm³ au minimum de la solution alcaline.

Conformément au plan proposé au début de notre exposé, nous avons examiné en détail la méthode de DUCLAUX. L'importance accordée à cet examen était nécessaire pour la compréhension générale de notre recherche. Nous passons maintenant à l'examen de la méthode que nous avons adoptée.

La marche de l'analyse sera (comme déjà indiqué) la suivante :

- a. Neutralisation du liquide initial avec de la soude ou de la potasse caustique.
- b. Séparation des éthers par distillation.
- c. Saponification des éthers avec une quantité connue de soude (potasse) caustique.
- d. Libération des acides gras par adjonction d'une quantité d'acide stable équivalente à la quantité d'alcali employée pour la saponification.
- e. Adjonction d'eau distillée pour amener ce liquide à un volume déterminé, par exemple à 125 cm.³
- f. Distillation de 110 cm³ de ce liquide d'après la méthode de DUCLAUX.
- g. Calcul de la quantité d'acide gras (ou des acides gras) dans l'éther.

Les levures forment à côté des éthers une quantité d'acides gras qui demeurent à l'état libre dans le milieu de culture ; après la séparation des éthers, ces acides se trouvent à l'état de sels de soude (potasse) dans le résidu de la distillation. Comme il est extrêmement intéressant de savoir si les acides gras qui se trouvent dans les éthers sont les mêmes que ceux qui se trouvent à l'état libre dans le milieu, nous avons compris le dosage des acides gras du milieu dans notre plan d'analyse.

Dans sa publication (Annales de Chimie et de Physique, V^{me} série, Tome II, 1874.), DUCLAUX indique une méthode pour le dosage des acides gras dans le vin. C'est avec cette méthode que nous avons commencé nos recherches, après l'avoir modifiée, afin de la rendre utilisable pour notre recherche. Nous ne pouvons songer à mentionner ici tous les essais que nous avons entrepris pour justifier les modifications de la méthode ; nous devons nous contenter de donner les résultats les plus importants.

Nous donnons ci-dessous sommairement et sans commentaires la méthode pour le dosage qualitatif et quantitatif des acides gras dans les éthers et dans le milieu, sous forme définitive.

Dans les paragraphes suivants, nous étudierons de plus près les détails et nous signalerons au passage les résultats les plus importants de quelques-uns de nos essais à blanc.

La méthode suivante est utilisable pour les milieux *liquides* avec 5 pour cent de sucre, *ou moins*.

- A.** Filtrer sur papier, environ 250 cm³ du milieu nutritif fermenté ; puis mesurer avec une pipette 200 cm³ du filtrat que l'on verse dans un flacon d'Erlenmeyer (capacité flacon un litre). Ajouter au liquide 2 gouttes de phénolphtaléine (solution 1 %) et neutraliser (rose) avec de la potasse caustique N/1. La quantité employée est appelée *a* cm³ KOH N/1.
- B.** Adapter le flacon d'Erlenmeyer au réfrigérant et distiller lentement environ 140 cm³ dans une ampoule (capacité

environ 180 cm³) où l'on a versé auparavant la quantité de potasse caustique N/1 nécessaire à la saponification des éthers ; cette quantité est appelée $b \text{ cm}^3 \text{ KOH N/1}$.

- C. Sceller l'ampoule et la laisser 4 heures dans l'eau bouillante (voir sous H, le traitement du résidu de la distillation).
- D. Desceller l'ampoule et verser son contenu avec les eaux de lavage de l'ampoule dans un flacon d'Erlenmeyer (capacité environ 500 cm³). Faire bouillir et évaporer lentement jusqu'à ce qu'il reste environ 40 cm³ de liquide dans le flacon.
- E. Transvaser ce liquide, après refroidissement, dans un ballon jaugé de 125 cm³. Le flacon d'Erlenmeyer est lavé à deux reprises avec 15 cm³ d'eau distillée ; les eaux de lavage sont également versées dans le ballon jaugé. Puis ajouter au liquide la quantité d'acide sulfurique N/1 équivalente à la quantité de la potasse caustique N/1 employée pour la saponification, c'est à dire $b \text{ cm}^3 \text{ H}_2\text{SO}_4 \text{ N/1}$. Remplir ensuite avec de l'eau distillée jusqu'au trait marqué sur le flacon.
- F. Distiller de ce mélange 110 cm³, d'après la méthode de DUCLAUX.
- G. Calculer, en se basant sur les valeurs de quantités constatées, les valeurs d'identification et les déterminer ensuite (voir plus loin le paragraphe : calcul des résultats).
- H. Ajouter au résidu $a \text{ cm}^3$ d'acide sulfurique N/1 (voir sous A) ; amener ensuite avec de l'eau distillée à 220 cm³. Distiller ce mélange et récolter exactement 200 cm³ du distillat dans un ballon jaugé.
- I. Verser le distillat avec les eaux de lavage du ballon jaugé dans un flacon d'Erlenmeyer (capacité environ 500 cm³), puis ajouter quelques gouttes de phénolphtaléine et neutraliser (rose) avec de la potasse caustique N/1. Cette quantité est appelée $c \text{ cm}^3 \text{ KOH N/1}$.

Porter le liquide à l'ébullition et évaporer lentement jusqu'à ce qu'il en reste environ 40 cm³ dans le flacon d'Erlenmeyer.

- K.** Transvaser ce liquide, après refroidissement, dans un ballon jaugé de 125 cm³ ; le flacon d'Erlenmeyer est lavé à deux reprises avec 15 cm³ d'eau distillée ; les eaux de lavage sont également versées dans le ballon jaugé. Puis ajouter au liquide c cm³ d'acide sulfurique (voir 1) et remplir avec de l'eau distillée jusqu'au trait.
- L.** Distiller de ce mélange 110 cm³ d'après la méthode de DUCLAUX.
- M.** Calculer en se basant sur les valeurs de quantités constatées, les valeurs d'identification et déterminer ensuite les quantités d'acide gras formées dans le milieu (voir ci-dessous : calcul des résultats).

Calcul des résultats

La détermination des valeurs d'identification se fait d'après la méthode indiquée par DUCLAUX. Dans le cas de mélange d'acides gras, les Tables données dans la description de la méthode sont extrêmement utiles pour s'orienter ; elles ne sont cependant pas assez détaillées pour une détermination plus précise. Pour combler cette lacune, nous nous sommes servi de la méthode graphique que l'on emploie toujours pour les mélanges binaires.

Nous donnons dans la figure 2 un exemple des abaqués que nous avons employés. Celui-ci comprend tous les mélanges possibles entre l'acide acétique et l'acide valérianique. Cet abaque n'est dessiné que pour les prises les plus régulières, soient les prises 2 à 8.

En dessinant les abaqués avec une grandeur de 5 mm. par unité, les dixièmes d'unité se laissent facilement apprécier.

Les valeurs d'identification des différents mélanges se trouvent aux points d'intersection des ordonnées correspondantes avec les lignes caractérisant les différentes prises.

Ci-dessous un exemple de détermination et de calcul des résultats, destiné à rendre les explications plus claires.

En dosant un éther et en titrant les différentes prises avec

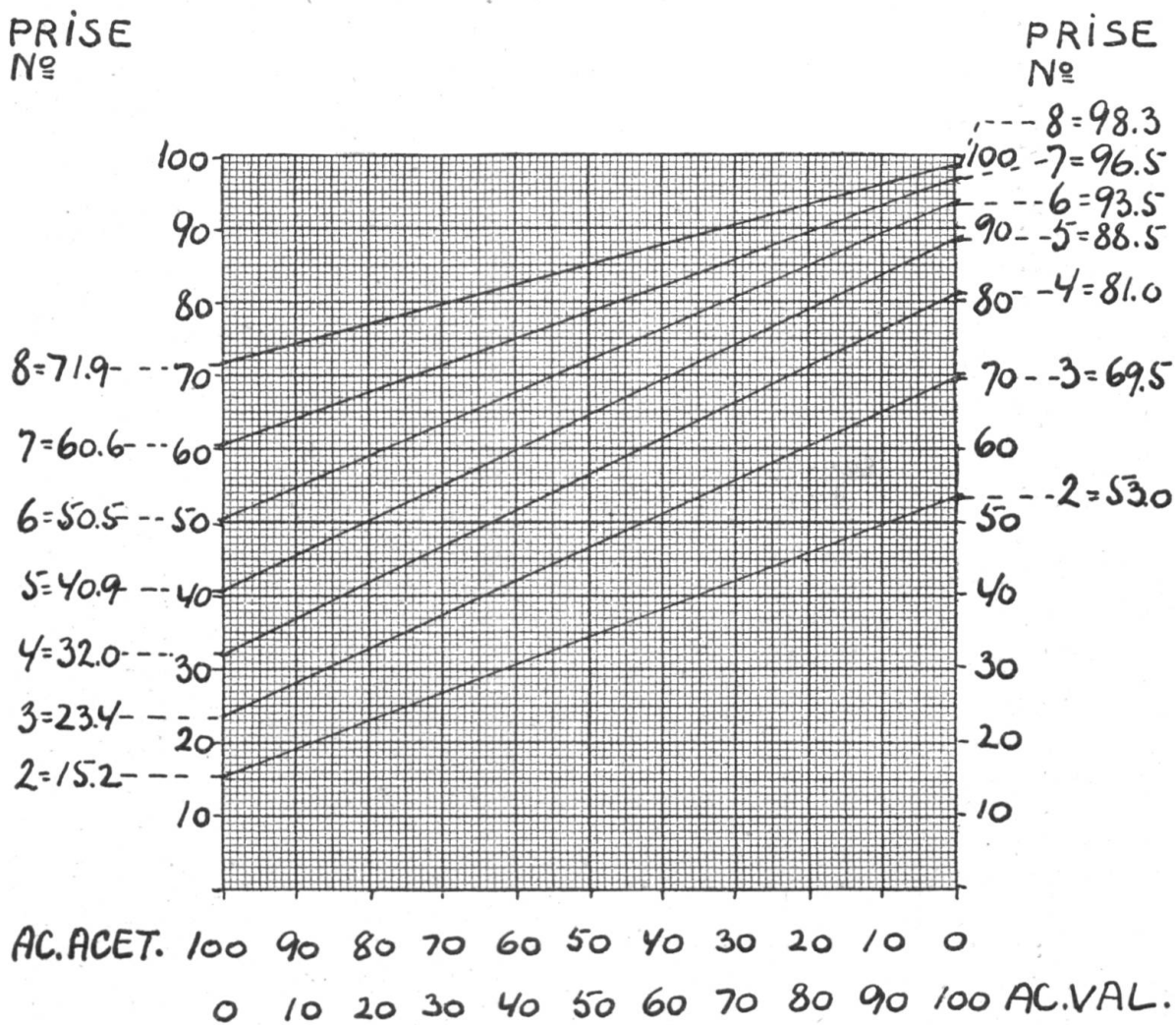


Fig.2.

ABAQUE ACIDE ACETIQUE — ACIDE VALERIANIQUE.

de l'eau de chaux N/23,3 on a constaté les valeurs de quantités (colonne v.q.) suivantes :

	v. q.	v. id. calculées.	v. id. théoriques fournies
1.	11,95	7,9	— par l'abaque
2.	24,17	16,1	16,0
3.	36,80	24,5	24,3
4.	49,55	32,9	33,0
5.	63,20	42,0	41,9
6.	77,18	51,3	51,4
7.	92,38	61,4	61,3
8.	108,98	72,5	72,4
9.	127,75	84,9	—
10.	150,40	100,0	—

En nous basant sur les valeurs de quantités nous avons calculé les valeurs d'identification correspondantes (colonne v. id. calculées). En comparant ces dernières valeurs avec les valeurs d'identification DUCLAUX pour les acides purs, on voit directement qu'il s'agit ici d'un mélange. La comparaison avec les tables de mélanges de DUCLAUX apprend que le mélange est formé par de l'acide valérianique et de l'acide acétique. On cherche alors dans l'abaque de ces deux acides, les valeurs d'identification qui sont les plus proches des valeurs d'identification calculées ; on constate que dans le cas présent, celles d'un mélange de 2 équivalents d'acide valérianique pour 98 équivalents d'acide acétique sont les plus semblables (colonne v.id. théoriques fournies par l'analyse). Cela reviendrait à dire, que dans le liquide destiné à la distillation fractionnée, les deux acides se trouvent dans la proportion 2 : 98 ; mais il nous faut tenir compte, pour le calcul, du fait suivant : en 10 prises 100 % de l'acide valérianique distille, tandis que 80 % seulement d'acide acétique passe. Il en résulte que la proportion entre ces deux acides dans le distillat est en réalité 2 et 78,4, soit, exprimé en pourcents : 2,49 % et 97,51 %. On a employé, pour la titration du distillat 150,40 cm³ d'eau de chaux N/23,3 ; 2,49 % de cette quantité, soient 3,74 cm³, sont utilisés pour la saturation de l'acide valérianique ; les 97,51 % de la quantité d'eau de chaux, soient 146,66 cm³, servent à la saturation de l'acide acétique.

Le calcul des quantités d'acide gras dans les éthers exprimées pour 100 cm³ du milieu de culture, se fait d'après la formule suivante, dans laquelle

a = cm³ de la solution alcaline employée,

N = Normalité de la solution alcaline,

p = valeur de quantité DUCLAUX pour la 10^{me} prise (pour acide formique 69,4 — acide acétique 80 — acide propionique 95,0 — acide butyrique 97,5 et acide valérianique 100)

P.M. = poids moléculaire de l'acide en question

$$\begin{aligned} & \frac{a}{N} \cdot \frac{PM \cdot 100 \cdot 125}{1000 \cdot p \cdot 110 \cdot 2} \\ = & \frac{a}{N} \cdot \frac{PM \cdot 12,5}{p \cdot 220} \\ = & \frac{a}{N} \cdot f_1 \end{aligned}$$

Les valeurs de f sont les suivantes :

Acide formique : 0,037674.

Acide acétique : 0,042636.

Acide propionique : 0,044287.

Acide butyrique : 0,051319.

Acide valérianique 0,058000.

Pour le cas présent on trouve donc :

$$\frac{3,74 \cdot 0,058}{23,3} = 0,0093 \text{ gramme d'acide valérianique dans l'éther, exprimé pour } 100 \text{ cm}^3 \text{ du milieu de culture.}$$

$$\frac{146,66 \cdot 0,042636}{23,3} = 0,2684 \text{ gramme d'acide acétique dans l'éther, exprimé pour } 100 \text{ cm}^3 \text{ du milieu de culture.}$$

Le calcul des quantités d'acides gras à l'état libre dans le milieu (voir dans la description de la méthode, les opérations **H** à **M**) se fait de la même manière ; mais comme ces acides sont deux fois distillés, la formule sera la suivante :

$$\begin{aligned}
 & \frac{a}{N} \cdot \frac{PM \cdot 100 \cdot 125 \cdot 100}{1000 \cdot p \cdot 110 \cdot p \cdot 2} \\
 = & \frac{a}{N} \cdot \frac{PM \cdot 125}{p^2 \cdot 22} \\
 = & \frac{a}{N} \cdot f_1
 \end{aligned}$$

Les valeurs de f_1 sont les suivantes :

Acide formique :	0,054285.
Acide acétique :	0,053295.
Acide propionique :	0,046618.
Acide butyrique :	0,052635.
Acide valérianique :	0,058000.

La description de la méthode d'analyse étant terminée, nous passons à l'étude de ses détails.

L'appareil à distiller

Notre appareil à distiller se compose d'un flacon d'Erlenmeyer (capacité 1 l. — verre de Jena n° 20) et d'un réfrigérant à boules allongées, muni d'un tube mince qui entre dans l'ampoule réceptrice. L'appareil est clairement représenté sur la *planche n° II* et ne demande pas plus d'explications.

Ce que nous avons dit à propos de l'appareil à distiller pour les acides gras peut être répété ici. Il faut faire très attention à l'ajustement du bouchon et du tube de connection en caoutchouc pour ne pas avoir de pertes. Nous avons fait plusieurs essais avec un appareil muni d'une fermeture à mercure ; mais la pression dans le flacon à distiller changeait de temps à autre si brusquement, que le mercure était projeté au dehors ; cela nous a forcé à utiliser un appareil ordinaire.

Nous avons choisi comme alambic un flacon d'Erlenmeyer parce que cette forme se prête mieux à la distillation des solutions sucrées. La formation de caramel pendant la distillation des solutions sucrées sur les parois d'un ballon de forme ronde est considérable, tandis que celle produite sur les parois d'un flacon d'Erlenmeyer est très faible. Comme

il se dégage de l'acide acétique et d'autres acides pendant la caramélisation du sucre, il faut éviter en employant, comme nous avons dit, un flacon d'Erlenmeyer comme alambic.

Nous avons, pour la saponification, choisi la méthode de la saponification en ampoule scellée. Cette opération est extrêmement facile et les essais à blanc nous ont montré que les résultats sont supérieurs à ceux qu'on obtient avec les appareils ordinairement employés dans ce but.

Les ampoules utilisées sont de forme cylindrique avec une tige de 10 cm. de longueur; en scellant et descellant avec un peu de prudence, il est possible d'employer la même ampoule pour 6 ou 7 distillations. Nous avons utilisé pour les ampoules le verre de Jena « *Fiolax* ».

Dans sa description de la méthode de dosage des acides gras dans le vin, DUCLAUX recommande la saturation du liquide avec de l'eau de chaux et la libération des acides gras par de l'acide tartrique. Nos premiers essais à blanc furent faits de cette manière; nous avons dû l'abandonner pour les raisons suivantes :

a. La grande quantité d'eau de chaux, nécessaire pour la saturation du milieu, gênait beaucoup pour la saponification; le distillat à saponifier occupait un volume d'environ 300 à 400 cm³.

b. Les solutions obtenues pour la distillation d'après la méthode de DUCLAUX contenaient du tartrate de chaux. Leur distillation était fréquemment difficile, parfois même tout à fait impossible, après la 6^{me} ou la 7^{me} prise. Le liquide, dans le ballon à distiller, sautait de telle manière qu'il se mélangeait avec le distillat.

c. Les résultats obtenus ne sont pas tout à fait exacts, mais toujours un peu trop faibles. Nous n'avons pas étudié la grandeur de l'erreur non plus que sa cause, d'une manière approfondie. Une série d'essais nous a donné l'impression que l'erreur est au moins de 5 % et que sa cause est probablement la formation de sels doubles.

Nous donnons ci-dessous les résultats d'un essai avec un mélange des cinq acides gras (formique-acétique-propionique-butyrique-valérianique) dans des proportions connues.

I. Nous avons saturé 100 cm³ de la solution des cinq acides gras avec de l'eau de chaux; puis nous avons ramené ce volume, par évaporation, à 30 cm³. Nous avons transvasé cette solution avec les eaux de lavage dans un ballon jaugé de 125 cm³, puis ajouté la quantité nécessaire d'acide tartrique pour la libération des acides, et ensuite rempli jusqu'au trait avec de l'eau distillée. De cette solution nous avons distillé 110 cm³ d'après la méthode de DUCLAUX.

Les résultats obtenus sont les suivants :

	v. id. calculées.	v. id. théoriques.	
1.	13,2	13,9	
2.	25,7	26,3	
3.	36,7	37,5	
4.	47,1	47,9	
5.	56,9	57,3	Rendement
6.	66,0	66,1	95,3 %.
7.	74,7	74,6	
8.	83,1	82,7	
9.	91,3	91,0	
10.	100,—	100,—	

Les v.id. théoriques sont calculées en se basant sur les quantités d'acides présentes et connues.

On voit que les valeurs d'identification sont assez exactes, mais le rendement n'est que de 95,3 %.

II. Nous avons répété la même opération en employant la potasse caustique et l'acide sulfurique à la place de l'eau de chaux et de l'acide tartrique.

Les résultats sont les suivants :

	v. id. calculées.	v. id. théoriques.	
1.	13,1	13,9	
2.	25,1	26,3	
3.	36,2	37,5	
4.	46,5	47,9	Rendement
5.	56,1	57,3	99,3 %.
6.	65,3	66,1	
7.	74,1	74,6	
8.	82,6	82,7	
9.	90,9	91,0	
10.	100.—	100.—	

On voit que les valeurs d'identification sont un peu moins exactes que celles obtenues avec l'eau de chaux et l'acide tartrique ; mais le rendement est presque parfait puisqu'il est de 4 points plus élevé.

Ces observations (*a*, *b*, et *c*) nous ont conduit à une nouvelle série d'essais. En voici les résultats :

Plusieurs bases autres que la chaux et plusieurs acides autres que l'acide tartrique n'ont donné que des résultats très peu satisfaisants. C'est la raison pour laquelle nous avons finalement adopté la potasse caustique et l'acide sulfurique ; ce sont les réactifs qui, pour le moment, donnent les meilleurs résultats.

On vérifie bien exactement le titre de la potasse caustique par rapport à l'acide sulfurique et, s'il n'y a pas correspondance absolue, on en tient compte dans le dosage.

ad B.

— Nous avons empiriquement constaté qu'il faut distiller environ 50 % du liquide pour recueillir tous les éthers présents.

— Dans la description de la méthode, nous avons écrit : «dans une ampoule où l'on a versé auparavant *la quantité* de potasse caustique N/1 *nécessaire* à la saponification des éthers ; »

Nous avons vu dans la description de DUCLAUX que les résultats les plus exacts sont obtenus s'il n'y a pas trop de sels dans le liquide. Pour cette raison il est évidemment plus prudent de limiter la quantité de potasse à la quantité nécessaire.

Nous avons empiriquement constaté que la quantité maximale de potasse caustique N/1 qu'on peut utiliser est de 15 cm³. En employant cette quantité, il se produit déjà pendant la distillation à 10/11^{mes} (opération *F*), une cristallisation dans le résidu, mais les résultats obtenus sont cependant assez exacts. La quantité de 15 cm³ de potasse caustique N/1 correspond théoriquement aux quantités d'éthers éthériques suivantes :

Ether formique :	1,11 gr.
Ether acétique :	1,32 gr.
Ether propionique :	1,54 gr.
Ether butyrique :	1,74 gr.
Ether valérianique :	1,95 gr.

Comme nous prenons en travail 200 cm³ du milieu fermenté, la limite théorique de la méthode est atteinte avec des solutions qui contiennent, par 100 cm³, la moitié de ces quantités d'éther ou de mélanges d'éthers équivalents. S'il faut traiter des liquides plus riches en éthers, on ne prend que 100 cm³ en travail et l'on multiplie le résultat obtenu par 2.

L'analyste qui travaille avec de grandes séries d'essais est toujours orienté sur la quantité d'alcali à employer. Mais, ce n'est plus le cas, s'il fait occasionnellement une analyse d'un milieu quelconque. On verse, dans ce cas, 15 cm³ de *KOH* N/1 dans l'ampoule et l'on vérifie après l'analyse, si la quantité a été trop grande ou, au contraire, trop petite. Si l'alcali a été ajouté en grand excès, on peut obtenir des résultats encore plus précis en refaisant l'analyse avec une quantité de potasse un peu plus grande que celle théoriquement nécessaire.

Si la quantité a été trop petite, on refait l'analyse avec 100 cm³ de milieu fermenté.

Nous ne voulons pas insister plus sur cette question ; la pratique l'enseignera rapidement à l'expérimentateur.

ad C.D.E. et F.

Ces opérations ne demandent pas d'explications complémentaires.

ad H.

L'opération décrite sous *H* peut se faire de plusieurs manières ; nous l'avons toujours faite en nous servant d'un ballon jaugé de 200 cm³. Cette méthode étant satisfaisante à tous points de vue, nous en donnons ci-dessous la description.

Comme un ballon jaugé de 200 cm³ est fait pour mesurer exactement ce volume, mais n'est pas fait pour le verser, il nous a fallu déterminer auparavant la quantité de liquide qui reste attaché aux parois du ballon en versant son contenu.

On pèse le ballon vide et sec, on le remplit jusqu'au trait avec de l'eau distillée, on verse le contenu, puis on repèse le ballon.

Pour le ballon que nous avons employé, nous avons trouvé 0,6 gramme de différence.

L'opération mentionnée sous *H*, se fait de la manière suivante :

Le résidu (environ 70 à 80 cm³), se trouvant dans le flacon d'Erlenmeyer après la séparation des éthers, est versé avec les eaux de lavage dans le ballon jaugé de 200 cm³ ; on y ajoute *a* cm³ d'acide sulfurique N/1 et ensuite on remplit jusqu'au trait avec de l'eau distillée. Le contenu du ballon jaugé est alors versé dans un flacon d'Erlenmeyer *sec* (capacité un litre) ; puis le ballon est lavé à deux reprises, premièrement avec 10 cm³ d'eau distillée et secondement avec 10,6 cm³ ; les eaux de lavage seront également versées dans le flacon d'Erlenmeyer. En manipulant de cette manière on est assuré d'avoir le volume de 220 cm³ dans le flacon, à quelques dixièmes pour cent près.

Au début de la description nous avons indiqué que la

méthode n'est utilisable que pour les solutions avec 5 % de sucre ou moins. La cause de cette limitation est la distillation à 10/11^{mes}, mentionnée dans le dernier alinéa (ad **H**). En traitant une solution à 5 % de sucre de la manière indiquée, il reste dans le flacon après la distillation une solution de sucre à 50 %, concentration qui est la plus élevée qu'on puisse admettre.

S'il faut traiter une solution entre 5 et 10 % de sucre, on prend 100 cm³ en travail et multiplie le résultat par 2. Le résultat sera, si la teneur en éther est faible, un peu moins exacte ; cependant il n'y a pas d'autre moyen.

ad I. — K. — L. — M.

Ces opérations ne demandent pas d'explications complémentaires.

Arrivés à la fin de l'explication de la méthode analytique, nous donnons, à titre d'exemple un essai à blanc que nous avons fait trois fois et choisi entre beaucoup d'autres.

Le liquide initial contenait dans 200 cm³ :

Acide formique :	0,0230 gr.
Acide acétique :	0,0259 gr.
Acide propionique :	0,0387 gr.
Acide butyrique :	0,0358 gr.
Acide valérianique :	0,0375 gr.
Ether acétique :	0,1000 gr.
Glucose :	2,5000 gr.
Phosphate monopotassique :	0,1000 gr.
Sulfate de magnésium :	0,1000 gr.
Chlorure de calcium :	0,0500 gr.
Peptone :	0,2500 gr.

et était saturé avec de l'acide carbonique.

Pour l'éther, nous avons trouvé les valeurs suivantes :

	v. id. calculées.	v. id. D. acide acétique.
1.	7,7	7,4
2.	15,4	15,2
3.	23,1	23,4
4.	31,1	32,0
5.	39,9	40,9
6.	49,2	50,5
7.	59,4	60,6
8.	70,2	71,9
9.	83,1	84,4
10.	100,—	100,—

Les valeurs d'identification sont satisfaisantes. Le rendement fut à plusieurs reprises d'environ 100 % (erreur ± 2 %).

Pour les acides nous avons trouvé les valeurs suivantes :

	v. id. calculées.	v. id. théoriques.
1.	14,8	14,6
2.	27,7	27,6
3.	39,4	39,2
4.	49,9	49,8
5.	59,5	59,3
6.	68,3	68,1
7.	76,5	76,3
8.	84,3	84,1
9.	91,8	91,9
10.	100.—	100.—

La concordance des valeurs d'identification pour un tel mélange (5 acides) est remarquable ; mais, par contre le rendement fut à plusieurs reprises de 90 à 96 % (environ 84 % avec de l'eau de chaux et de l'acide tartrique). Comme les valeurs d'identification sont presque idéales, l'erreur pourrait être due à une perte de liquide ; ou bien s'est-il produit une destruction de sels sur les parois très chaudes du flacon pendant la concentration à 40 cm³ ? Nous n'avons pas réussi à déterminer d'une façon certaine la cause de cette perte.

Les recherches à blanc sont extrêmement difficiles à exécuter, car, dans un milieu fermenté, les éthers et les acides se trouvent dans une sorte d'équilibre ; ce n'est pas le cas dans les mélanges artificiels. Pour obtenir des résultats justes, il est nécessaire de saturer les acides *avant* d'ajouter l'éther ; sans cette précaution, une partie de l'éther est hydrolysée avant l'analyse et les résultats sont faussés.

Conclusion

La méthode donnée est juste pour les acides gras des éthers et acceptable pour les acides gras libres dans le milieu fermenté.

Nous souhaitons que ceux qui reprendront ces recherches ne se borneront pas à augmenter la documentation, mais perfectionnent encore la méthode.

CHAPITRE II

La méthode de culture

Nous avons indiqué dans l'introduction qu'il nous fallait une méthode de culture permettant la recherche en série avec des résultats comparables.

Nous avons commencé nos recherches en préparant une grande quantité de solution nutritive, qui a été répartie en fractions de 300 cm³ dans une quinzaine de flacons d'Erlenmeyer (capacité un litre) qui sont ensuite stérilisés.

Après refroidissement nous avons inoculé tous les flacons en même temps avec une quantité de la même culture. Ayant mis tous les flacons dans un thermostat à 25° C., nous avons pris chaque jour un flacon pour l'analyse chimique. Nous avons dû abandonner cette méthode parce que les résultats n'étaient jamais comparables.

Si l'on analyse après la stérilisation et le refroidissement le contenu de chaque flacon, on constate qu'il y a déjà à ce moment d'assez grandes différences de concentrations entre eux, dues à l'évaporation différente des liquides. En outre le développement dans les divers flacons n'est pas pareil, malgré toutes les précautions prises pour égaliser toutes les conditions de culture. Un facteur qui est presque toujours présent, et qui joue ici un très grand rôle, est la différence de température d'un flacon à l'autre à l'intérieur du thermostat. Cette différence provient de la circulation imparfaite de l'air entre les flacons posés dans le thermostat. Il est aussi possible que des facteurs oligodynamiques entrent en jeu, le verre employé étant de la qualité ordinaire. Quoi qu'il en soit, la méthode n'était pas utilisable pour notre travail.

Nous avons continué les recherches en nous servant d'un grand flacon (capacité 5 litres — verre de Jena 20), muni d'un appareil pour l'extraction stérile des échantillons du milieu ; ce dispositif est du même genre que celui employé par SCHOPFER (W.H. SCHOPFER — *La Sexualité des champignons*), mais simplifié.

Le flacon de culture est représenté sur la *planche III* rempli de milieu nutritif (environ 3,5 litres) et prêt pour l'inoculation. On voit clairement le tube d'inoculation (diamètre 10 mm.) ; dans la partie inférieure de ce tube nous avons percé plusieurs trous pour améliorer la diffusion du matériel d'inoculation dans le milieu.

L'extracteur proprement dit est aussi bien visible ; il se compose d'un tube droit dont l'extrémité inférieure est courbée en équerre, et l'extrémité supérieure soudée à une boule de verre. La boule porte deux tubulures, l'une à son pôle supérieur et l'autre à sa face inférieure et oblique par rapport au long tube. Un filtre de coton est joint à la première de ces tubulures par un tube de caoutchouc. La seconde est munie d'un tube de caoutchouc fermé par une baguette de verre *Pyrex*.

Le procédé d'extraction est montré sur la *planche IV*. On se sert comme récipient du milieu fermenté, d'un flacon de

lavage ordinaire. La communication entre le récipient et l'extracteur est établie de la manière bien connue, déjà indiquée par PASTEUR.

En fermant l'orifice du filtre de coton avec le doigt et en aspirant légèrement par le tube de caoutchouc, fixé à la deuxième tige du récipient, le liquide monte dans la boule de verre et descend directement dans le récipient par la tubulure inférieure. Aussitôt que la quantité nécessaire pour l'analyse est suffisante, on laisse entrer l'air par le filtre de coton, et en aspirant, on vide le tube de communication. Enfin on détache le récipient et ferme le tube de caoutchouc de l'extracteur avec la baguette de verre bien flambée.

Comme les levures productrices d'éther se développent presque toujours à la surface du milieu, il est important que cette surface ne change pas de grandeur, *malgré* les prélèvements de milieu fermenté ; cette condition est réalisée par l'emploi du flacon cylindrique. Bien qu'une certaine quantité du voile se colle contre les parois du flacon pendant l'échantillonnage, le voile n'est pas rompu.

Les petites irrégularités constatées dans les séries de valeurs analytiques, sont probablement causées par le fait que les corps produits par les levures à la surface, ne se mélangent pas toujours avec la même vitesse dans le milieu. A vrai dire, ces irrégularités ne sont pas très importantes et n'influencent pas les conclusions.

Les quatre séries d'essais dont les résultats sont mentionnés dans le chapitre suivant, ont été exécutées avec la méthode indiquée ci-dessus.

Milieu

Le milieu employé contenait par 100 cm³.

Glucose	5	gr.
Phosphate monopotassique	0,2	»
Sulfate de magnésium	0,2	»
Chlorure de calcium	0,1	»

Cette même composition a été employée par BEIJERINCK

pour ses recherches sur les levures productrices d'éther acétique.

Comme source d'azote nous avons utilisé pour 100 cm³ l'un ou l'autre des corps indiqués ci-dessous :

Peptone,	à raison de	0,30 gr.
Chlorure d'ammonium,	»	0,20 »
Nitrate de potassium,	»	0,38 »
Asparagine,	»	0,25 »

C'est le milieu que nous appelons dans notre exposé : « *Solution nutritive de BEIJERINCK* » en mentionnant chaque fois la source d'azote.

Inoculation

L'inoculation était faite avec 100 cm³ d'une culture vieille de 48 à 72 heures, culture préalablement habituée au milieu d'essai par un triple repiquage dans ce même milieu.

CHAPITRE III

La vérification de la méthode analytique

Les recherches suivantes serviront d'une part à la vérification de la méthode analytique et permettront d'autre part un sondage dans la question de l'influence de la source d'azote sur la production d'éther.

Pour ces recherches, nous avons reçu du « CENTRAALBUREAU VOOR SCHIMMELCULTURES » à BAARN (HOLLANDE), les souches de trois espèces de levures (*Hansenula*), toutes productrices d'éther et provenant de la collection de BEIJERINCK.

Les recherches préliminaires avec ces trois espèces avaient pour but de déterminer la plus puissante productrice d'éther. Nous les avons inoculées dans le milieu nutritif de BEIJERINCK,

déjà mentionné dans le chapitre précédent. Les dosages ont été faits par voie organoleptique et le moment de l'apparition de l'odeur d'éther fut noté (voir la table n° 10). Comme les intervalles entre les dosages (dosage après 17- 41 - 48 - 72 - 96 - 113 heures) sont assez longs, les résultats obtenus sont globaux.

Table N° 10

Durée de la culture jusqu'à l'apparition de l'éther.

	Pep- tone	Aspa- ragine	NH ₄ Cl	KNO ₃
H. anomala v. longa DEKKER. .	48 h.	48 h.	41 h.	65 h.
H. „ v. sphaerica (NAEGELI) DEKKER	65 h.	65 h.	65 h.	65 h.
H. „ v. robusta DEKKER	65 h.	72 h.	65 h.	113 h.

Les résultats indiquent que l'odeur d'éther apparaît le plus vite avec le *Hansenula anomala* var. *longa*. Mais en ce qui concerne la quantité d'éther formé, ces recherches n'ont point donné de résultats ; car on obtient avec toutes ces levures et dans les quatre milieux différents, à un moment donné, une intensité d'odeur si forte, que les appréciations comme « peu », « moyen » et « fort » étaient tout à fait exclues.

Nous avons alors choisi le *Hansenula anomala* var. *longa* DEKKER pour nos recherches parce que c'était celle qui produisait le plus rapidement des éthers.

Nous avons dosé dans chaque échantillon :

- Glucose : Méthode ordinaire ; transformation de sulfate ferrique en ferreux, au moyen de l'oxydure de cuivre ; puis titration avec KMnO₄.
- Acidité : L'acidité est exprimée en cm³ de la solution alcaline N/1 nécessaires pour la saturation de 100 cm³ du milieu nutritif. (indicateur Phénolphtaléine).

pH. : Mesuré avec β et γ dinitrophénol.
 Ether et CO₂ : Le résultat de l'appréciation organoleptique est exprimé par les signes —, +, ++, +++ ; indiquant respectivement : rien, peu, moyen, beaucoup.

Dans un certain nombre d'échantillons, les acides gras dans l'éther et ceux dans le milieu sont dosés d'après la méthode indiquée dans le chapitre I.

Série N° 1

Milieu : Solution nutritive de BEIJERINCK avec *peptone*.
 Matériel inoculé : 100 cm³ d'une culture de *Hansenula anomala* var. *longa* DEKKER. Age 72 h.
 Température de culture 25° C.

Echantillon n° 1.

Prélevé immédiatement après l'inoculation.

Glucose : 5,19 %

Acidité : 3,01

pH. : 4,7

Ether — CO₂ —

Echantillon n° 2. après 24 h.

Glucose : 4,79 %

Acidité : 3,29

pH. : 4,7

Ether — CO₂ (+?)

Aspect de la culture : Ilots à la surface.

Echantillon n° 3. après 48 h.

Glucose : 4,56 %

Acidité : 3,97

pH. : 4,3

Ether + CO₂ +

Aspect de la culture : Ilots blancs réunis par un voile très mince.

Echantillon n° 4.

après 72 h.

Glucose : 4,19 %
 Acidité : 3,93
 pH. : 4,1
 Ether ++ Co₂ ++

L'odeur de l'éther était très aromatique.

Aspect de la culture : Voile assez épais. Liquide légèrement trouble.

Acides gras dans les éthers :

	v. id. calculée	v. id. abaque
1	9,1	
2	17,8	17,5
3	26,7	26,2
4	35,3	34,9
5	43,8	43,8
6	52,8	53,1
7	62,3	62,8
8	72,7	73,5
9	84,7	
10	100,0	

Les v. id. abaque sont celles d'un mélange d'acide valérianique et d'acide acétique dans la proportion 6 : 94.

Acides gras dans l'éther en % du milieu nutritif

Acide valérianique = 0,0034 gr.
 Acide acétique = 0,0313 gr.
 Proportion = 9,8 : 90,2.

Acides gras dans le milieu :

	v. id. calculée	v. id. abaque
1	7,2	
2	15,2	14,3
3	22,6	22,1
4	31,4	30,4
5	39,7	39,0
6	48,4	48,5
7	58,5	58,5
8	69,2	70,0
9	82,7	
10	100,0	

Les v. id. abaque sont celles d'un mélange d'acide formique et d'acide acétique dans la proportion 30 : 70.

Acides gras dans le milieu en % du milieu nutritif :

Acide formique = 0,0035 gr.
 Acide acétique = 0,0091 gr.
 Proportion = 27,8 : 72,2.

V. id. assez déformées ; les résultats sont douteux à cause des faibles quantités d'acides.

Echantillon n° 5. après 101 h.

Glucose : 3,33 %
 Acidité : 4,76
 pH. : 3,9
 Ether +++ CO₂ +++

Odeur d'éther très aromatique.

Aspect de la culture : voile très épais, granuleux, blanc et plein de bulles de CO₂. Liquide trouble. — Environ 1 mm. de dépôt.

Echantillon n° 6. après 118 h.

Glucose : 2,84 %
 Acidité : 4,55
 pH. : 3,9
 Ether +++ CO₂ +++

L'odeur d'éther était nettement celle de l'éther acétique.

Aspect de la culture : Pas de changement

Acides gras dans les éthers.

	v. id. calculée	v. id. abaque
1	8,1	
2	16,5	16,2
3	24,7	24,6
4	33,2	33,3
5	42,2	42,1
6	51,5	51,6
7	61,5	61,5
8	72,5	72,5
9	84,8	
10	100,0	

Les v. id. abaque sont celles d'un mélange d'acide valérianique et d'acide acétique dans la proportion 2,5 : 97,5.

Acides gras dans les éthers en % du milieu nutritif :

Acide valérianique = 0,0063 gr.
 Acide acétique = 0,1430 gr.
 Proportion = 4,2 : 95,8.

Acides gras dans le milieu.

	v. id. calculée	v. id.D.
1	7,6	
2	15,5	15,2
3	23,4	23,4
4	31,8	32,0
5	40,7	40,9
6	50,2	50,5
7	60,5	60,6
8	71,5	71,9
9	84,1	
10	100,0	

Les v. id.D. sont celles de l'acide acétique.

Acide gras dans le milieu en % du milieu nutritif :

Acide acétique = 0,0590 gramme.

Echantillon n° 7.

après 166 h.

Glucose : 1,30 %

Acidité : 4,25

pH. : 3,9

Ether +++ CO₂ +++

L'odeur d'éther était nettement celle de l'éther acétique.
Aspect de la culture : Pas de changement ; le dépôt atteint environ 2 mm.

Acides gras dans les éthers.

	v. id.	v. id. abaque
1	7,9	
2	16,1	16,0
3	24,5	24,3
4	32,9	33,0
5	42,0	41,9
6	51,3	51,4
7	61,4	61,3
8	72,5	72,4
9	84,9	
10	100,0	

Les v. id. abaque sont celles d'un mélange d'acide valérianique et d'acide acétique dans la proportion 2 : 98.—

Acides gras dans les éthers en % du milieu nutritif :

Acide valérianique = 0,0093 gr.

Acide acétique = 0,2684 gr.

Proportion = 3,3 : 96,7

Acides gras dans le milieu.

	v. id.	v. id. abaque	
1	7,5		Les v. id. abaque sont celles d'un mélange d'acide formique et d'acide acétique dans la proportion 10 : 90. Acides gras dans le milieu en % du milieu nutritif : Acide formique = 0,0080 gr. Acide acétique = 0,0823 gr. Proportion = 8,9 : 91,1
2	15,3	14,9	
3	23,2	22,9	
4	31,5	31,5	
5	40,4	40,3	
6	49,7	49,8	
7	59,9	59,9	
8	71,1	71,3	
9	83,8		
10	100,0		

Echantillon n° 8.

après 191 h.

Glucose : 0,40 %

Acidité : 5,98

pH. : 3,9

Ether + + + CO₂ + + +

L'odeur d'éther était nettement celle de l'éther acétique.

L'aspect de la culture n'a pas changé.

Echantillon n° 9.

après 215 h.

Glucose : traces

Acidité : 6,60

pH. : 3,9

Ether + + + CO₂ —

L'odeur d'éther était nettement celle de l'éther acétique.

Acides gras dans les éthers.

	v. id.	v. id. abaque	
1	7,7		Les v. id. abaque sont celles d'un mélange d'acide valériannique et d'acide acétique dans la proportion 2 : 98.— Acides gras dans les éthers en % du milieu nutritif : Acide valériannique = 0,0141 gr. Acide acétique = 0,4058 gr. Proportion = 3,4 : 96,6
2	15,7	16,0	
3	24,1	24,3	
4	32,7	33,0	
5	41,7	41,9	
6	51,4	51,4	
7	61,6	61,3	
8	72,8	72,4	
9	85,2		
10	100,0		

Acides gras dans le milieu.

	v. id.	v. id.D.
1	7,7	
2	15,6	15,2
3	23,6	23,4
4	32,0	32,0
5	41,0	40,9
6	50,6	50,5
7	60,8	60,6
8	71,9	71,9
9	84,4	
10	100,0	

Les v. id.D. sont celles de l'acide acétique.

Acide gras dans le milieu en % du milieu nutritif :

Acide acétique = 0,1301 gramme.

Echantillon n° 10.

après 335 h.

Glucose : —
 Acidité : 3,25
 pH. : 4,3
 Ether + CO₂ —

L'odeur d'éther était nettement celle de l'éther acétique.

Aspect de la culture : le voile a presque disparu ; liquide presque clair, dépôt environ 4 mm.

Acides gras dans les éthers.

	v. id.	v. id. abaque
1	7,9	
2	16,2	16,0
3	24,6	24,3
4	33,0	33,0
5	41,8	41,9
6	51,0	51,4
7	60,7	61,3
8	71,6	72,4
9	84,2	
10	100,-	

Les v. id. abaque étaient celles d'un mélange d'acide valérianique et d'acide acétique dans la proportion 2 : 98.—

Acides gras dans les éthers en % du milieu nutritif :

Acide valérianique = 0,0025 gr.

Acide acétique = 0,0732 gr.

Proportion = 3,3 : 96,7

Acides gras dans le milieu.

	v. id.	v. id. abaque	
1	8,4		Les v. id. abaque étaient celles d'un mélange d'acide valérianique et d'acide acétique dans la proportion 5 : 95. Acides gras dans le milieu en % du milieu nutritif : Acide valérianique = 0,0036 gr. Acide acétique = 0,0501 gr. Proportion = 6,7 : 93,3
2	17,0	17,1	
3	25,7	25,7	
4	34,5	34,5	
5	43,5	43,3	
6	52,9	52,7	
7	62,7	62,4	
8	73,4	73,2	
9	85,5		
10	100.-		

Récapitulation des résultats analytiques de la série N° 1**Table N° 11**

Echantillon N°	Après heures	Glucose	Acidité	pH.	Ether	CO ₂
1	0	5.19	3.01	4.7	—	—
2	24	4.79	3.29	4.7	—	+ ?
3	48	4.56	3.97	4.3	+	+
4	72	4.19	3.93	4.1	+ +	+ +
5	101	3.33	4.76	3.9	+ + +	+ + +
6	118	2.84	4.55	3.9	+ + +	+ + +
7	166	1.30	4.25	3.9	+ + +	+ + +
8	191	0.40	5.98	3.9	+ + +	+ + +
9	215	—	6.60	3.9	+ + +	—
10	335	—	3.25	4.3	+	—

Table N° 12

Echantillon N°	Après heures	Acides gras dans les éthers en % du milieu nutritif			Acides gras dans le milieu en % du milieu nutritif			
		Ac. val.	Ac. acét.	Proportion	Ac. form.	Ac. val.	Ac. acét.	Proportion
4	72	0.0034	0.0313	9.8 : 90.2	0.0035	—	0.0091	27.8 : 72.2
6	118	0.0063	0.1430	4.2 : 95.8	—	—	0.0590	—
7	166	0.0093	0.2684	3.3 : 96.7	0.0080	—	0.0823	8.9 : 91.1
9	215	0.0141	0.4058	3.4 : 96.6	—	—	0.1301	—
10	335	0.0025	0.0732	3.3 : 96.7	—	0.0036	0.0501	6.7 : 93.3

Série N° 2

Milieu : Solution de BEIJERINCK avec NH_4Cl .
 Matériel inoculé : 100 cm³ d'une culture de *Hansenula anomala* var. *longa* DEKKER.
 Age : 60 h.
 Température de culture 25° C.

Echantillon n° 1.

Prélevé directement après l'inoculation.

Glucose : 5,15 %
 Acidité : 3,13
 pH. : 4,5
 Ether — CO₂ —

Echantillon n° 2. après 24 h.

Glucose : 4,86 %
 Acidité : 3,39
 pH. : 3,9
 Ether + ? CO₂ —

Aspect de la culture : développement très faible, quelques îlots à la surface.

Echantillon n° 3. après 48 h.

Glucose : 4,86 %
 Acidité : 3,73
 pH. : 3,3
 Ether + ? CO₂ —

Aspect de la culture : Quelques îlots assez grands, granuleux, réunis par un voile très mince.

Echantillon n° 4. après 72 h.

Glucose : 4,58 %
 Acidité : 3,99
 pH. : 3,3
 Ether : + ? CO₂ +

Aspect de la culture : Voile un peu plus épais avec des îlots granuleux, liquide trouble, dépôt.

Echantillon n° 5. après 96 h.

Glucose : 4,30 %
 Acidité : 3,74
 pH. : 3,3
 Ether + ? CO₂ +

Aspect de la culture : Des boules de levures se forment à la surface, d'un diamètre d'environ 1 mm.; plus tard elles descendent dans le milieu et forment un dépôt assez abondant.

Echantillon n° 6. après 120 h.

Glucose : 3,94 %
 Acidité : 3,94
 pH. : 3,2
 Ether + (pas assez pour dosage.) CO₂ ++

Aspect de la culture : pas de changement.

Echantillon n° 7. après 144 h.

Glucose : 3,59 %
 Acidité : 4,08
 pH. : 3,1
 Ether + (pas assez pour dosage.) CO₂ ++

Aspect de la culture : pas de changement.

Echantillon n° 8. après 168 h.

Glucose : 3,14 %
 Acidité : 4,24
 pH : 3,0
 Ether + (pas assez pour dosage.) CO₂ ++

Aspect de la culture : pas de changement en général; le liquide est très trouble, dépôt environ 3 mm.

Echantillon n° 9.

après 216 h.

Glucose : 2,29 %

Acidité : 4,52

pH : 2,9

Ether + (pas assez
pour dosage.) CO₂ ++

Aspect de la culture : pas de changement.

Echantillon n° 10.

après 240 h.

Glucose : 1,80 %

Acidité : 4,81

pH : 2,9

Ether + (pas assez
pour dosage.) CO₂ ++

Aspect de la culture : pas de changement.

Echantillon n° 11.

après 264 h.

Glucose : 1,21 %

Acidité : 4,96

pH : 2,9

Ether ++ CO₂ ++

Odeur d'éther un peu plus forte que dans l'échantillon n° 10, aromatique.

Aspect de la culture : pas de changement.

Acides gras dans les éthers.

	v. id. calculée	v. id. abaque
1	8,7	
2	17,1	15,6
3	25,4	23,9
4	33,6	32,9
5	42,3	41,4
6	51,5	50,9
7	61,2	61,1
8	72,1	72,2
9	84,7	
10	100,-	

Les v. id. abaque sont celles d'un mélange d'acide valérianique et d'acide acétique dans la proportion 1 : 99.—

On a ici certainement affaire à un mélange de trois acides ; les valeurs des prises 6, 7 et 8 indiquent que le mélange de base est celui indiqué ci-dessus.

La déformation des valeurs correspondant aux prises 1 jusqu'à 5, est

due à la présence d'une trace d'un des acides homologues supérieurs (caproïque, caprylique). Comme la quantité de ce dernier est extrêmement petite, nous l'avons laissé hors de calcul.

Acides gras dans les éthers en % du milieu nutritif :

Acide valérianique : 0,0008 gramme.

Acide acétique : 0,0452 gramme.

Proportion : 1,7 : 98,3.

Acides gras dans le milieu.

	v. id. calculée	v. id. abaque	
1	7,7		Les v. id. abaque sont celles d'un mélange d'acide valérianique et d'acide acétique dans la proportion 1 : 99.— Acides gras dans le milieu en % du milieu nutritif : Acide valérianique : 0,0004 gr. Acide acétique : 0,0256 gr. Proportion : 1,5 : 98,5.
2	15,8	15,6	
3	23,9	23,9	
4	32,5	32,5	
5	41,5	41,4	
6	51,0	50,9	
7	61,1	61,1	
8	72,2	72,2	
9	84,8		
10	100.—		

Echantillon n° 12.

après 288 h.

Glucose : 0,73 %

Acidité : 5,08

pH : 2,9

Ether ++ CO₂ ++

Aspect de la culture : pas de changement, dépôt environ 4 mm.

Echantillon n° 13.

après 312 h.

Glucose : 0,28 %

Acidité : 5,11

pH : 2,9

Ether ++ CO₂ ++

Aspect de la culture : pas de changement.

Echantillon n° 14.

après 336 h.

Glucose : —

Acidité : 5,44

pH. : 2,9

Ether ++

CO₂ —

Odeur d'éther aromatique.

Aspect de la culture : pas de changement, dépôt environ
5 mm.*Acides gras dans les éthers.*

	v. id. calculée	v. id. abaque
1	9,4	
2	18,5	18,0
3	27,0	26,9
4	35,7	35,7
5	44,3	44,5
6	53,3	53,7
7	62,8	63,3
8	73,0	73,9
9	84,9	
10	100,—	

Les v. id. abaque sont celles d'un mélange d'acide valérianique et d'acide acétique dans la proportion 7,5 : 92,5

Acides gras dans les éthers en % du milieu nutritif :

Acide valérianique = 0,0077 gr.

Acide acétique = 0,0561 gr.

Proportion = 1,2 : 98,8.

Acides gras dans le milieu.

	v. id. calculée	v. id. abaque
1	7,2	
2	14,8	14,8
3	22,4	22,8
4	31,2	31,3
5	40,2	40,1
6	49,8	49,6
7	59,9	59,7
8	71,1	71,1
9	84,1	
10	100.—	

Les v. id. abaque sont celles d'un mélange d'acide formique et d'acide acétique dans la proportion 13 : 87.

Acide formique = 0,0054 gr.

Acide acétique = 0,0405 gr.

Proportion = 11,8 : 88,2.

Récapitulation des résultats analytiques de la Série N° 2

Table N° 13

Echant. N°	Après heures	Glucose	Acidité	pH	Ether	CO ₂
1	0	5.15	3.13	4.5	—	—
2	24	4.86	3.39	3.9	+ ?	—
3	48	4.86	3.73	3.3	+ ?	—
4	72	4.58	3.99	3.3	+ ?	+
5	96	4.30	3.74	3.3	+ ?	+
6	120	3.94	3.94	3.2	+	+ +
7	144	3.59	4.08	3.1	+	+ +
8	168	3.14	4.24	3.0	+	+ +
9	216	2.29	4.52	2.9	+	+ +
10	240	1.80	4.81	2.9	+	+ +
11	264	1.21	4.96	2.9	+ +	+ +
12	288	0.73	5.08	2.9	+ +	+ +
13	312	0.28	5.11	2.9	+ +	+ +
14	336	—	5.44	2.9	+ +	—

Table N° 14

Echantillon N°	Après heures	Acides gras dans les éthers en % du milieu nutritif			Acides gras dans le milieu en % du milieu nutritif			
		Ac. val.	Ac. acét.	Proportion	Ac. form.	Ac. val.	Ac. acét.	Proportion
11	264	0.0008	0.0452	1.7 : 98.3	—	0.0004	0.0256	1.5 : 98.5
14	336	0.0077	0.0561	1.2 : 98.8	0.0054	—	0.0405	11.8 : 88.2

Série N° 3

Milieu : Solution de BEIJERINCK avec KNO_3 .

Matériel inoculé : 100 cm³ d'une culture d'*Hansenula anomala* var. *longa* DEKKER. Age 72 h.

Température de culture 25° C.

Echantillon n° 1.

Prélevé directement après l'inoculation.

Glucose : 5,06 %

Acidité : 2,83

pH. : 5,3

Ether — CO₂ —

Echantillon n° 2.

après 24 h.

Glucose : 5,06 %

Acidité : 3,23

pH. : 4,8

Ether — CO₂ —

Aspect de la culture : presque pas de développement.

Echantillon n° 3.

après 48 h.

Glucose : 5,00 %

Acidité : 3,44

pH. : 4,5

Ether — CO₂ —

Aspect de la culture : presque pas de changement.

Echantillon n° 4.

après 72 h.

Glucose : 4,85 %

Acidité : 3,47

pH. : 4,3

Ether — CO₂ —

Aspect de la culture : voile très mince.

Echantillon n° 5.

après 96 h.

Glucose : 4,54 %

Acidité : 3,47

pH. : 4,1

Ether + ? CO₂ —

Aspect de la culture : pas de changement.

Echantillon n° 6.

après 120 h.

Glucose : 4,00 %

Acidité : 3,52

pH. : 4,1

Ether + ? CO₂ +

Aspect de la culture : voile un peu plus épais.

Echantillon n° 7.

après 144 h.

Glucose : 3,36 %

Acidité : 3,81

pH. : 4,1

Ether + ? CO₂ ++

Aspect de la culture : pas de changement.

Echantillon n° 8.

après 168 h.

Glucose : 2,75 %

Acidité : 4,03

pH. : 4,1

Ether + CO₂ +++

Aspect de la culture : De petites boules de levure se formaient à la surface, liées ensemble par un voile mince ; liquide trouble, un peu de dépôt.

Echantillon n° 9.

après 192 h.

Glucose : 2,31 %

Acidité : 4,10

pH. : 4,0

Ether + CO₂ +++

Odeur de l'éther : aromatique, agréable.

Aspect de la culture : le voile est un peu plus épais ; dépôt environ 1 mm.

Echantillon n° 10.

après 216 h.

Glucose : 1,89 %

Acidité : 4,23

pH. : 4,0

Ether +++ CO₂ +++

Odeur de l'éther : Une forte odeur d'éther aromatique s'est développée assez brusquement.

Aspect de la culture : Voile pas très épais avec des boules de levure ; liquide trouble avec des boules de levure ; dépôt environ 3 mm.

Acides gras dans les éthers.

	v. id. calculée	v. id. abaque	
1	9,1		Les v. id. abaque sont celles d'un mélange d'acide valérianique et d'acide acétique dans la proportion 6 : 94 Acides gras dans les éthers en % du milieu nutritif : Acide valérianique : 0,0132 gr. Acide acétique : 0,1215 gr. Proportion : 9,8 : 90,2.
2	17,9	17,5	
3	26,4	26,2	
4	34,8	34,9	
5	43,6	43,8	
6	53,0	53,1	
7	62,8	62,8	
8	73,5	73,5	
9	85,5		
10	100.-		

Acides gras dans le milieu.

	v. id. calculée	v. id. abaque	
1	7,8		Les v. id. abaque sont celles d'un mélange d'acide valérianique et d'acide acétique dans la proportion 2 : 98. Acides gras dans le milieu en % du milieu nutritif : Acide valérianique = 0,0030 gr. Acide acétique = 0,0916 gr. Proportion = 3,3 : 96,7.
2	15,9	16,0	
3	24,3	24,3	
4	32,8	33,0	
5	41,8	41,9	
6	51,5	51,5	
7	61,8	61,3	
8	72,9	72,4	
9	85,3		
10	100.-		

Echantillon n° 11.

après 240 h.

Glucose	: 1,39 %	
Acidité	: 4,23	
pH.	: 4,0	
Ether	+++	CO ₂ +++
Aspect de la culture : pas de changement.		

Echantillon n° 12.

après 264 h.

Glucose	: 0,89 %	
Acidité	: 4,23	
pH.	: 4,0	
Ether	+++	CO ₂ +++
Aspect de la culture : pas de changement ; dépôt environ 4 mm.		

Echantillon n° 13.

après 288 h.

Glucose : 0,36 %
 Acidité : 4,26
 pH. : 4,0
 Ether + + + CO₂ + + +

Odeur d'éther nettement celle de l'éther acétique.

Aspect de la culture : pas de changement.

Acides gras dans les éthers.

	v. id. calculée	v. id. abaque	
1	8,1		Les v. id. abaque sont celles d'un mélange d'acide valérianique et d'acide acétique dans la proportion 3 : 97. Acides gras dans les éthers en % du milieu nutritif. Acide valérianique = 0,0114 gr. Acide acétique = 0,2180 gr. Proportion = 5 : 95.
2	16,4	16,3	
3	24,9	24,8	
4	33,5	33,5	
5	42,4	42,3	
6	51,9	51,8	
7	61,6	61,7	
8	72,5	72,7	
9	84,9		
10	100.-		

Acides gras dans le milieu.

	v. id. calculée	v. id. abaque	
1	7,8		Les v. id. abaque sont celles d'un mélange d'acide valérianique et d'acide acétique dans la proportion 1 : 99. Acides gras dans le milieu en % du milieu nutritif : Acide valérianique = 0,0011 gr. Acide acétique = 0,0800 gr. Proportion = 1,4 : 98,6.
2	15,5	15,6	
3	23,7	23,9	
4	32,4	32,5	
5	41,4	41,4	
6	51,0	50,9	
7	61,2	61,0	
8	72,2	72,2	
9	84,7		
10	100.-		

Echantillon n° 14.

après 312 h.

Glucose : traces
 Acidité : 4,35
 pH. : 4,1
 Ether + + + CO₂ + + +

Aspect de la culture : pas de changement.

Echantillon n° 15.

après 456 h.

Glucose : —
 Acidité : 5,68
 pH. : 4,3
 Ether +++ CO₂ —

L'odeur d'éther était nettement celle de l'éther acétique.
 Aspect de la culture : pas de changement.

Acides gras dans les éthers.

	v. id. calculée	v. id. abaque
1	7,6	
2	15,6	16,0
3	24,0	24,3
4	32,6	33,0
5	41,7	41,9
6	51,3	51,4
7	61,5	61,3
8	72,7	72,4
9	85,3	
10	100,-	

Les v. id. abaque sont celles d'un mélange d'acide valérianique et d'acide acétique dans la proportion 2 : 98.

Acides gras dans les éthers en % du milieu nutritif :

Acide valérianique = 0,0144 gr.
 Acide acétique = 0,4151 gr.
 Proportion = 3,4 : 96,6

Acides gras dans le milieu.

	v. id. calculée	v. id. abaque
1	7,7	
2	15,8	16,0
3	24,1	24,3
4	33,0	33,0
5	42,1	41,9
6	51,6	51,4
7	61,8	61,3
8	73,1	72,4
9	85,4	
10	100,-	

Les v. id. abaque sont celles d'un mélange d'acide valérianique et d'acide acétique dans la proportion 2 : 98.

Acides gras dans le milieu en % du milieu nutritif :

Acide valérianique = 0,0050 gr.
 Acide acétique = 0,1798 gr.
 Proportion = 2,7 : 97,3

Récapitulation des résultats analytiques de la série N° 3

Table N° 15

Echant. N°	Après heures	Glucose	Acidité	pH	Ether	CO ₂
1	0	5.06	2 83	5.3	—	—
2	24	5.06	3 23	4 8	—	—
3	48	5.00	3.44	4 5	—	—
4	72	4.85	3.47	4 3	—	—
5	96	4.54	3.47	4 1	+ ?	—
6	120	4.00	3.52	4.1	+ ?	+
7	144	3.36	3.81	4 1	+ ?	+ +
8	168	2 75	4.03	4.1	+	+ + +
9	192	2 31	4 10	4.0	+	+ + +
10	216	1 89	4 23	4.0	+ + +	+ + +
11	240	1 39	4 23	4.0	+ + +	+ + +
12	264	0 89	4 23	4.0	+ + +	+ + +
13	288	0 36	4 26	4.0	+ + +	+ + +
14	312	traces	4 35	4.1	+ + +	+ + +
15	456	—	5 65	4 3	+ + +	—

Table N° 16

Echantillon N°	Après heures	Acides gras dans les éthers en % du milieu nutritif			Acides gras dans le milieu en % du milieu nutritif		
		Ac. val.	Ac. acét.	Proportion	Ac. val.	Ac. acét.	Proportion
10	216	0 0132	0 1215	9 8 : 90 2	0 0030	0 0916	3 3 : 96 7
13	288	0 0114	0 2180	5 0 : 95 0	0 0011	0 0800	1 4 : 98 6
15	456	0 0144	0 4151	3 4 : 96 6	0 0050	0 1798	2 7 : 97 3

Série N° 4

Milieu : Solution de BEIJERINCK avec *asparagine*.

Matériel inoculé : 100 cm³ d'une culture de *Hansenula anomala* var. *longa* DEKKER. Age 66 h.

Température de culture 25° C.

Echantillon n° 1.

Prélevé directement après l'inoculation.

Glucose : 5,41 %

Acidité : 4,17

pH. : 4,3

Ether — CO₂ —Echantillon n° 2.

après 24 h.

Glucose : 5,29 %

Acidité : 4,01

pH. : 4,3

Ether — CO₂ —

Aspect de la culture : liquide trouble, quelques îlots très petits à la surface.

Echantillon n° 3.

après 48 h.

Glucose : 5,25 %

Acidité : 3,93

pH. : 4,3

Ether — CO₂ +

Aspect de la culture : grands îlots unis par un voile mince ; liquide trouble.

Echantillon n° 4.

après 72 h.

Glucose : 4,86 %

Acidité : 3,99

pH. : 4,3

Ether + ? CO₂ +

Aspect de la culture : pas de changement.

Echantillon n° 5.

après 96 h.

Glucose : 4,86 %

Acidité : 4,02

pH. : 4,3

Ether + CO₂ ++

Aspect de la culture : pas de changement.

Echantillon n° 6. après 120 h.

Glucose : 4,62 %
Acidité : 4,24
pH. : 4,2
Ether + (pas assez
pour dosage.) CO₂ ++

Aspect de la culture : voile très mince, blanc, sans plis ;
liquide trouble ; un peu de dépôt.

Echantillon n° 7. après 144 h.

Glucose : 4,14 %
Acidité : 4,50
pH. : 4,2
Ether + (pas assez
pour dosage.) CO₂ ++

Aspect de la culture : voile un peu plus épais.

Echantillon n° 8. après 168 h.

Glucose : 3,56 %
Acidité : 4,67
pH. : 4,2
Ether + (pas assez
pour dosage.) CO₂ ++

Aspect de la culture : pas de changement.

Echantillon n° 9. après 192 h.

Glucose : 3,08 %
Acidité : 4,72
pH. : 4,0
Ether ++ CO₂ ++

Odeur de l'éther : pas agréable, impur.

Aspect de la culture : pas de changement.

Acides gras dans les éthers.

	v. id. calculée	v. id. abaque	
1	10,7		
2	20,5	18,7	Acides dans les éthers en % du milieu nutritif :
3	28,7	27,9	Acide caproïque = 0,0077 gr.
4	36,9	36,6	Acide acétique = 0,0430 gr.
5	45,2	45,3	Proportion = 15,2 : 84,8
6	54,2	54,4	
7	63,9	63,8	
8	74,0	74,2	
9	85,8		
10	100.-		

La comparaison des v. id. calculées avec celles des tables de mélanges de DUCLAUX (voir la description de la méthode de DUCLAUX), montre qu'aucun de ces mélanges ne correspond aux v. id. calculées.

Les valeurs pour les prises 8 et 9 nous indiquent que le mélange présent doit avoir une assez grande quantité d'acide acétique. Les prises 1 et 4 montrent que le deuxième acide dans le mélange distille encore plus vite que l'acide valérianique.

Dans « Le lait » de DUCLAUX, nous avons trouvé les v. id. suivantes pour l'acide caproïque et l'acide caprylique :

Table N° 17

	Acide caproïque.	Acide caprylique.
1	33,5	55,5
2	56,0	78,0
3	75,5	91,0
4	86,0	93,0
5	92,5	95,0
6	96,5	96,8
7	97,5	97,8
8	98,4	99,0
9	99,3	99,5
10	100,0	100,0

Un abaque fait avec l'acide caproïque et l'acide acétique, nous a donné directement les v. id. concordantes.

Les v. id. abaque placées au-dessus à côté des v. id. calculées sont celles d'un mélange de ces deux acides dans la proportion 8,5 : 91,5. La concordance entre les chiffres n'est pas absolue, surtout en ce qui concerne les prises 2 et 3 ; mais comme la concentration des mélanges est très faible le résultat obtenu est très satisfaisant. Les valeurs des distillations des échantillons suivants montrent clairement, que notre détermination était juste.

Table N° 18

V. id. acide caproïque-acide acétique

Prise	0 : 100	10 : 90	20 : 80	30 : 70	40 : 60	50 : 50	60 : 40	70 : 30	80 : 20	90 : 10	100 : 0
2	15.2	19.3	23.4	27.4	31.5	35.6	39.7	43.8	47.8	51.9	56.0
3	23.4	28.6	33.8	39.0	44.2	49.5	54.7	59.9	65.1	70.3	75.5
4	32.0	37.4	42.8	48.2	53.6	59.0	64.4	69.8	75.2	80.6	86.0
5	40.9	46.1	51.2	56.4	61.5	66.7	71.9	77.0	82.2	87.3	92.5
6	50.5	55.1	59.7	64.3	68.9	73.5	78.1	82.7	87.3	91.9	96.5
7	60.6	64.1	68.0	71.7	75.4	79.1	82.7	86.4	90.1	93.8	97.5
8	71.9	74.6	77.2	79.9	82.5	85.2	87.8	90.5	93.1	95.8	98.4

Pour l'acide caproïque les valeurs f et f_1 sont : 0,065964 (voir page (33). *Description du calcul*).

Acides gras dans le milieu (Ech. n° 9).

	v. id. calculée	v. id. abaque
1	7,3	
2	15,0	15,2
3	23,3	23,4
4	32,0	32,0
5	40,9	40,9
6	50,9	50,5
7	61,4	60,6
8	72,5	71,9
9	85,5	
10	100,-	

Les v. id. abaque sont celles de l'acide acétique.

L'acide gras dans le milieu en % du milieu nutritif :

Acide acétique = 0,0319 gr.

Echantillon n° 10.

après 216 h.

Glucose : 2,76 %

Acidité : 4,63

pH. : 4,0

Ether ++

CO₂ ++

Aspect de la culture : pas de changement.

Echantillon n° 11.

après 264 h.

Glucose : 1,78 %

Acidité : 5,19

pH. : 4,0

Ether ++

CO₂ ++

Aspect de la culture : pas de changement.

Acides gras dans les éthers.

	v. id. calculée	v. id. abaque
1	11,5	
2	21,5	20,9
3	30,7	30,7
4	39,3	39,6
5	47,9	48,1
6	57,0	56,9
7	66,1	65,8
8	76,0	75,6
9	87,0	
10	100,-	

Les v. id. abaque sont celles d'un mélange d'acide caproïque et d'acide acétique dans la proportion 14 : 86.

Acides gras dans les éthers en % du milieu nutritif :

Acide caproïque = 0,0147 gr.

Acide acétique = 0,0467 gr.

Proportion = 23,9 : 76,1

Acides gras dans le milieu.

	v. id. calculée	v. id. abaque
1	7,5	
2	15,5	15,6
3	23,8	23,9
4	32,3	32,5
5	41,6	41,4
6	51,3	51,0
7	61,6	61,0
8	72,7	72,2
9	85,2	
10	100,-	

Les v. id. abaque sont celles d'un mélange d'acide caproïque et d'acide acétique dans la proportion 1 : 99.

Acides gras dans le milieu en % du milieu nutritif :

Acide caproïque = 0,0013 gr.

Acide acétique = 0,0864 gr.

Proportion = 1,5 : 98,5.

Echantillon n° 12.

après 336 h.

Glucose : 0,48 %
 Acidité : 5,29
 pH. : 4,0
 Ether ++ CO₂ ++

Odeur de l'éther : assez désagréable.

Aspect de la culture : Voile assez mince, plein de grandes bulles de CO₂, liquide absolument clair, dépôt 3 mm.*Acides gras dans les éthers.*

	v. id. calculée	v. id. abaque
1	9,6	
2	19,5	19,1
3	28,4	28,4
4	37,3	37,2
5	45,8	45,8
6	55,0	54,9
7	64,1	64,1
8	74,4	74,5
9	86,0	
10	100,-	

Les valeurs abaque sont celles d'un mélange d'acide caproïque et d'acide acétique dans la proportion 9,5 : 90,5.

Acides gras dans les éthers en % du milieu nutritif :

Acide caproïque = 0,0134 gr.
 Acide acétique = 0,0656 gr.
 Proportion = 17,0 : 83,0

Acides gras dans le milieu.

	v. id. calculée	v. id. abaque
1	7,6	
2	15,7	16,0
3	23,8	24,4
4	32,6	33,1
5	41,9	41,9
6	51,4	51,4
7	61,6	61,3
8	72,9	72,4
9	85,4	
10	100,-	

Les v. id. abaque sont celles d'un mélange d'acide caproïque et d'acide acétique dans la proportion 2 : 98.

Acides gras dans le milieu en % du milieu nutritif :

Acide caproïque = 0,0024 gr.
 Acide acétique = 0,0766 gr.
 Proportion = 3 : 97.

Echantillon n° 13.

après 432 h.

Glucose : —
 Acidité : 6,60
 pH. : 4,0
 Ether ++ CO₂ —

Odeur de l'éther : assez désagréable.

Aspect de la culture : Voile presque disparu ; liquide absolument clair ; dépôt environ 4 mm.

Acides gras dans les éthers.

	v. id. calculée	v. id. abaque
1	8,1	
2	16,6	16,4
3	25,1	25,0
4	33,8	33,6
5	42,4	42,4
6	51,4	51,9
7	61,5	61,7
8	72,2	72,7
9	84,6	
10	100.-	

Les v. id. abaque sont celles d'un mélange d'acide caproïque et d'acide acétique dans la proportion 3 : 97.

Acides gras dans les éthers en % du milieu nutritif :

Acide caproïque = 0,0047 gr.

Acide acétique = 0,0790 gr.

Proportion = 5,6 : 94,4.

Acides gras dans le milieu.

	v. id. calculée	v. id. abaque
1	7,6	
2	15,7	16,0
3	23,9	24,4
4	32,7	33,1
5	41,8	41,9
6	57,5	51,4
7	61,7	61,3
8	72,8	72,4
9	85,3	
10	100.-	

Les v.id. abaque sont celles d'un mélange d'acide caproïque et d'acide acétique dans la proportion 2 : 98.

Acides gras dans le milieu en % du milieu nutritif :

Acide caproïque = 0,0042 gr.

Acide acétique = 0,1335 gr.

Proportion = 3,1 : 96,9.

Récapitulation des résultats analytiques de la série N° 4

Table N° 19

Echantillon N°	Après heures	Glucose	Acidité	pH	Ether	CO ₂
1	0	5.41	4.17	4.3	—	—
2	24	5.29	4.01	4.3	—	—
3	48	5.25	3.93	4.3	—	+
4	72	5.18	3.99	4.3	+ ?	+
5	96	4.86	4.02	4.3	+	+ +
6	120	4.62	4.24	4.2	+	+ + +
7	144	4.14	4.50	4.2	+	+ + +
8	168	3.56	4.67	4.2	+	+ + +
9	192	3.08	4.72	4.0	+ +	+ + +
10	216	2.76	4.63	4.0	+ +	+ + +
11	264	1.76	5.19	4.0	+ +	+ + +
12	336	0.48	5.29	4.0	+ +	+ + +
13	432	—	6.60	4.0	+ +	—

Table N° 20

Echantillon N°	Après heures	Acides gras dans les éthers en % du milieu nutritif			Acides gras dans le milieu en % du milieu nutritif		
		Ac. caproïque	Ac. acét.	Proportion	Ac. caproïque	Ac. acét.	Proportion
9	192	0.0077	0.0430	15.2 : 84.8	—	0.0319	—
11	264	0.0147	0.0467	23.9 : 76.1	0.0013	0.0864	1.5 : 98.5
12	336	0.0134	0.0656	17.0 : 83.0	0.0024	0.0766	3.0 : 97
13	432	0.0047	0.0790	5.6 : 94.4	0.0042	0.1335	3.1 : 96.9

Observations partielles sur les recherches biologiques

Série N° 1 (Peptone)

La consommation de la quantité de sucre a duré environ 192 h.

La production des éthers a commencé à un pH de 4,3 ; la production maximum a eu lieu à un pH de 3,9.

Le mélange des acides gras issus des éthers se composait d'acide valérianique et d'acide acétique, lesquels acides commençaient par être dans la proportion de poids de 9,8 : 90,2 ; et se trouvaient à la fin dans celle de 3,3 : 96,7.

Le rendement maximum des acides gras combinés dans les éthers, et exprimé pour 100 cm³ de milieu nutritif, s'élève à 0,4199 gr. d'acides totaux. Il est constaté au moment où le sucre était complètement consommé.

Le mélange des acides gras dans le milieu se composait soit d'acide valérianique et d'acide acétique, soit d'acide formique et d'acide acétique ; et, dans un échantillon enfin, on n'a constaté que de l'acide acétique. Le rendement maximum de 0,0537 gr. d'acides totaux pour 100 cm³ de milieu nutritif, a été obtenu au moment où le sucre avait totalement disparu.

Série N° 2 (NH₄ Cl)

La consommation de la quantité de sucre a duré environ 325 h.

La production des éthers a commencé à un pH de 3,2, la production maximum a eu lieu à un pH de 2,9.

Le mélange des acides gras issus des éthers se composait d'acide valérianique et d'acide acétique, lesquels acides commençaient par être dans la proportion de 1,7 : 98,3 et se trouvaient à la fin dans celle de 1,2 : 98,8.

Le rendement maximum des acides gras combinés dans les éthers, et exprimé pour 100 cm³ de milieu nutritif, s'élève à 0,0638 gr. d'acides totaux. Il est obtenu au moment où le sucre était complètement consommé.

Le mélange des acides gras dans le milieu se composait soit d'acide valérianique et d'acide acétique, soit d'acide formique et d'acide acétique. Le rendement maximum de 0,0459 gr. d'acides totaux pour 100 cm³ de milieu nutritif a été obtenu au moment où le sucre avait totalement disparu.

Série N° 3 (KNO₃)

La consommation de la quantité de sucre a duré environ 305 h.

La production des éthers a commencé à un pH de 4,1 ; la production maximum a eu lieu à un pH de 4,0.

Le mélange des acides gras issus des éthers se composait d'acide valérianique et d'acide acétique, lesquels acides commençaient par être dans la proportion de 9,8 : 90,2 et se trouvaient à la fin dans celle de 3,4 : 96,6.

Le rendement maximum des acides gras, exprimé pour 100 cm³ de milieu nutritif est de 0,4295 gr. d'acides gras totaux ; cette valeur est constatée environ 140 heures après le moment de la consommation totale du sucre. Cette constatation demande une explication plus précise.

L'échantillon n° 13 accusait, au moment où le sucre était presque épuisé, une quantité totale d'acides gras dans les éthers de 0,2294 gr. Il nous restait à ce moment dans le flacon de culture juste la quantité nécessaire à une dernière analyse ; nous basant sur les résultats des séries 1 et 2, où le rendement était maximal au moment de la consommation totale du sucre, nous avons décidé de retarder de 5 à 6 jours la dernière analyse pour voir ce qui se passerait.

La grande quantité des acides gras issus des éthers, constatée après 456 heures, et la quantité élevée des acides gras du milieu simultanément mesurée, nous montrent clairement, que nous avons dépassé le moment du rendement maximum

en éther. Ce rendement a dû être sensiblement plus élevé que celui constaté après 456 heures.

Le mélange des acides gras dans le milieu se composait d'acide valérianique et d'acide acétique. Le rendement maximum de 0,1848 gr. d'acides gras pour 100 cm³ de milieu nutritif est constaté 140 heures après la consommation totale du sucre.

Série N° 4 (Asparagine)

La consommation de la quantité de sucre a duré environ 355 h.

Comme la quantité de sucre employée pour cette série a été un peu plus élevée que celle employée pour les autres recherches, la durée de consommation a été prolongée d'environ 6 %. Pour la *comparaison avec les autres séries* nous fixerons donc, pour cette série, à 335 heures, la durée de consommation totale du sucre.

La production des éthers a commencé à un pH de 4,3 ; la production maximum a eu lieu à un pH de 4,0.

Le mélange des acides gras issus des éthers se composait d'acide caproïque et d'acide acétique, lesquels acides commençaient par être dans la proportion de 15,2 : 84,8 (maximum éch. n° 11, 23,9 : 76,1), et se trouvaient à la fin dans celle de 5,6 : 94,4.

Le rendement maximum (0,0837 gr.) des acides gras dans les éthers est constaté environ 80 heures après la consommation totale du sucre. Le rendement maximum de la culture a dû être en réalité un peu plus élevé (voir l'explication *série n° 3.*)

Le mélange des acides gras dans le milieu se composait d'acide caproïque et d'acide acétique. Le rendement maximum de 0,1377 gr. d'acides totaux exprimé pour 100 cm³ de milieu nutritif, est obtenu environ 80 heures après la consommation totale du sucre.

Observations générales sur les recherches biologiques

Comme nous n'avons fait qu'une seule série de recherches avec chaque source d'azote, il est évident que nous ne pouvons pas tirer de conclusion ayant une portée générale. Nous donnerons sur l'ensemble des quatre séries, des observations qui peuvent être utiles pour des recherches futures.

L'influence de la source d'azote sur le développement de la culture

Comme mesure de l'influence de la source d'azote sur le développement de la culture, nous avons pris la durée de la consommation du sucre. Dans nos recherches avec le *Hansenula anomala* var. *longa* DEKKER, cette durée fut pour

Peptone	:	192 heures.
KNO ₃	:	305 »
NH ₄ Cl	:	325 »
Asparagine	:	335 »

Influence de la source d'azote sur le développement des éthers

Les rendements maxima des acides gras issus des éthers donnent des indications sur la source d'azote la plus favorable au développement des éthers. Ordonnés par grandeur décroissante, les rendements maxima sont :

KNO ₃	:	0,4295 (probablement plus
Peptone	:	0,4199 élevé)
Asparagine	:	0,0837
NH ₄ Cl	:	0,0638

On voit immédiatement que la source d'azote la plus favorable pour le développement de la culture n'est pas nécessairement celle qui provoque l'apparition de la plus grande quantité d'éther.

En admettant que les éthers produits sont des éthers éthyliques, nous avons obtenu dans la série avec KNO_3 , comme rendement maximum en % du milieu nutritif, 0,0184 d'éther valérianique et 0,6089 d'éther acétique, soit un total de 0,6273 d'éthers. En tenant compte du fait que ce rendement a été probablement plus élevé, ces recherches (ou plutôt la continuation de ces recherches) peuvent avoir un certain intérêt pour l'industrie. Il n'est pas en outre exclu, qu'en habituant les levures au milieu pendant une période plus longue que celle que nous avons adoptée, les résultats puissent être améliorés.

Il ressort de l'ensemble des mesures effectuées, que le *Hansenula anomala* var. *longa* DEKKER développe, dans des conditions favorables, un mélange d'éther valérianique et d'éther acétique dans la proportion 3,0 : 97,0 environ.

Il est d'autre part évident que la source d'azote agit non seulement sur la quantité des éthers développés, mais encore sur la qualité de ceux-ci. La série n° 4 nous a montré en effet que l'acide valérianique, dans certaines conditions, n'apparaît pas, mais qu'à sa place, de l'acide caproïque prend naissance.

Nous donnons ci-dessous une récapitulation des pH initiaux de culture ; nous y joignons les valeurs observées au moment où les éthers se manifestent et celles correspondant à la période de production maximale d'éther.

	pH initial.	au commencement du développement d'éther.	pendant la pro- duction maximale d'éther.
Peptone	4,7	4,3	3,9
$\text{NH}_4 \text{Cl}$	4,5	3,2	2,9
KNO_3	5,3	4,1	4,0
Asparagine	4,3	4,3	4,0

Exception faite pour les valeurs obtenues avec $\text{NH}_4 \text{Cl}$, les autres valeurs se ressemblent beaucoup. Cela semble indiquer que le pH de 3,9 à 4,0 est le plus favorable au développement des éthers.

Conclusions sur la vérification de la méthode analytique

Les recherches faites ont largement prouvé l'utilité de la méthode proposée.

Il est remarquable que la présence de 1,3 milligramme d'acide caproïque dans les éthers pour 100 cm³ de milieu nutritif (voir série n° 4, éch. n° 11, acides gras du milieu) n'échappe pas à l'analyse. A ce point de vue l'échantillon n° 13 (série n° 3) est unique. Dans les 100 cm³ de milieu où ne se trouve que 1,1 milligramme d'acide valérianique, les v. id. calculées sont parfaites.

C'est encore sur ces faits que nous basons la conclusion suivante, déjà mentionnée dans la description de la méthode :

Si l'un des deux éthers est représenté à une concentration telle que la quantité d'acide qu'il peut libérer soit de beaucoup inférieure à la quantité exigée par la limite inférieure de la méthode, l'analyse demeurera cependant juste à condition que le second des éthers soit en concentration suffisante pour l'analyse.

Avec ces constatations, nous avons atteint le but de notre présent travail.

Résumé et conclusions

- Les limites inférieures de la méthode de DUCLAUX pour le dosage des acides gras ont été établies : acide formique 0,009 gr., acide acétique 0,007 gr., acide propionique 0,023 gr., acide butyrique 0,025 gr. et acide valérianique 0,030 gr.
- Les valeurs de quantités DUCLAUX pour l'acide formique ont été rectifiées.
- Une méthode d'analyse pour les acides gras combinés dans les éthers produits par les microorganismes a été établie, mise au point et vérifiée.
- La vitesse de développement de *Hansenula anomala* var. *longa* est, dans le milieu de BEIJERINCK, très influencée par la source d'azote. Cette vitesse augmente quand on passe d'une source d'azote à l'autre dans l'ordre suivant : asparagine, chlorure d'ammonium, nitrate de potassium et peptone.
- Les sources d'azote les plus favorables au développement des éthers avec le même milieu et la même levure sont, par ordre croissant : chlorure d'ammonium, asparagine, peptone et nitrate de potassium.
- La quantité et la qualité des éthers varient avec la source d'azote.
- Le pH optimum pour la production des éthers semble être, dans nos conditions de travail, de 3,9 à 4,0.

Monsieur le Professeur Robert Chodat nous a proposé le sujet de ce travail et nous a guidé sur la voie à suivre ; Monsieur le Docteur Fernand Chodat nous a, à maintes reprises, accordé son appui et soutenu de ses conseils. Qu'ils soient l'un et l'autre assurés de la reconnaissance profonde que nous leur vouons.

Nous remercions très vivement Monsieur Feller, préparateur, pour le soin qu'il a mis à l'exécution des photographies qui accompagnent cette thèse.

Bibliographie

1. ABDERHALDEN, E. — Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden. Berlin (1910).
2. BEIJERINCK, M.W. — Verzamelde Geschriften. Delft (1921).
3. BERTRAND, G. et THOMAS, P. — Guide pour les manipulations de Chimie Biologique.
4. CALMETTE, A., NEGRE, L. et BOQUET, A. — Manuel technique de Microbiologie et Sérologie. Paris (1926).
5. DUCLAUX, E. — Le Lait. Paris (1887).
6. DUCLAUX, E. — Recherches sur les vins. Annales de Chimie et de Physique. V^{me} série, Tome II (1874). Deuxième mémoire : Sur les acides volatils du vin (p. 289).
7. DUCLAUX, E. — Traité de MICROBIOLOGIE. Paris (1898).
8. FODOR, A. — Das Fermentenproblem.
9. GUILLIERMOND, A. — Les Levures.
10. HENRIQUES, O.M. — Om Brintionmaalinger. Copenhague (1924).
11. JANKE, A. — Allgemeine technische Mikrobiologie. Dresden (1924).
12. JANKE, A. und ZIKES, H. — Arbeitsmethoden der Mikrobiologie.
13. JÖRGENSEN, A. — Die Mikroorganismen der Gärungsindustrie. Berlin (1909).
14. KAYSER, ED. — Microbiologie. Paris (1931).

15. KLEIN G., STREBINGER, R. — Fortschritte der Mikrochemie.
 16. KOLTHOFF, I.M. — Der Gebrauch von Farbindicatoren. Berlin (1926).
 17. MICHAELIS, L. — Die Wasserstoffionenkonzentration. Berlin (1922).
 18. NORD, F.-F. — Mechanism of enzyme action and associated cell phenomena. London (1929).
 19. NORD, F.-F. und WEIDENHAGEN, R. — Ergebnisse der Enzymforschung. Leipzig (1932).
 20. OPPENHEIMER, C. — Die Fermente und ihre Wirkungen. Leipzig (1924).
 21. PFISTER, V. — (Thèse). Etude bactériologique d'une vinaigrerie employant le procédé allemand. Genève (1929).
 22. PRAGER, B. und JACOBSEN, P. — Beilsteins Handbuch der organischen Chemie. Berlin (1920).
 23. SCHOPFER, W.H. — (Thèse). Recherches sur la sexualité des champignons. Genève (1928).
 24. ULLMANN, F. — Enzyklopädie der technischen Chemie. Berlin (1932).
-

Table des Matières

	Pages
INTRODUCTION	35
CHAPITRE I. La Méthode analytique	38
Principe de la méthode (Duclaux)	41
Valeurs de quantités (Duclaux)	42
Valeurs d'identification (Duclaux)	44
Tables des mélanges d'acides (Duclaux)	48
Valeurs de quantités (Nielsen) Acide formique ..	51
Valeurs d'identification (Nielsen) Acide formique	52
Acide formique (limite approximative)	55
» acétique » »	56
» propionique » »	57
» butyrique » »	58
» valérianique » »	58
Appareil à distiller et autres instruments	59
Eau distillée	61
La titration	62
Description de la méthode analytique pour l'ana- lyse des éthers	63
Calcul des résultats	66
L'appareil à distiller (éthers)	70
Conclusion du chapitre I	78
CHAPITRE II. La Méthode de culture	78
Milieu de culture	80
Inoculation	81
CHAPITRE III. La vérification de la méthode analytique	81
Série n° 1 : Influence du peptone	83
Récapitulation des résultats analytiques de la sé- rie n° 1	89
Série n° 2 : Influence du chlorure d'ammonium ..	90

Récapitulation des résultats analytiques de la série n° 2	95
Série n° 3 : Influence du nitrate de potasse	95
Récapitulation des résultats analytiques de la série n° 3	101
Série n° 4 : Influence de l'asparagine	101
V. id. acide caproïque	104
» » » caprylique	104
V. id. mélanges acides caproïque et acétique	105
Récapitulation des résultats analytiques de la série n° 4	109
OBSERVATIONS PARTIELLES SUR LES RECHERCHES BIOLOGIQUES	110
OBSERVATIONS GÉNÉRALES SUR LES RECHERCHES BIOLOGIQUES	113
CONCLUSIONS SUR LA VÉRIFICATION DE LA MÉTHODE ANALYTIQUE	115
RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS	116
BIBLIOGRAPHIE	117

Explication des Tables

	Pages
TABLE n° 1 : Acides gras : Constantes diverses	40
PREMIÈRE TABLE (DUCLAUX) : V. q. D.	42
DEUXIÈME TABLE (DUCLAUX) : V. id. D.	44
TABLES NON NUMÉROTÉES (DUCLAUX)	
Mélanges d'acide valérianique et d'acide acétique	48
» » butyrique » » acétique	48
» » propionique » » acétique	49
» » valérianique » » butyrique	49
» » valérianique » » propionique	49
» » butyrique » » propionique	50
TABLE N° 2 : V. q. (Nielsen) : Acide formique	51
» » 3 : V.id. (Nielsen) : Acide formique	52
» » 4 : Acide formique (limite approximative)	55
» » 5 : » acétique » »	56
» » 6 : » propionique » »	57
» » 7 : » butyrique » »	58
» » 8 : » valérianique » »	58
» » 9 : Récapitulation des limites inférieures ..	59
» » 10 : Durée de culture jusqu'à l'apparition de l'éther	82
» » 11 : Résultats analytiques de la série n° 1 (peptone)	89

	Pages
TABLE N° 12 : Résultats analytiques de la série n° 1 (peptone)	89
» » 13 : Résultats analytiques de la série n° 2 (NH ₄ Cl)	95
» » 14 : Résultats analytiques de la série n° 2 (NH ₄ Cl)	95
» » 15 : Résultats analytiques de la série n° 3 (KNO ₃)	101
» » 16 : Résultats analytiques de la série n° 3 (KNO ₃)	101
» » 17 : V. id. acides caproïque et caprylique ..	104
» » 18 : V. id. mélanges acides caproïque et acé- tique	105
» » 19 : Résultats analytiques de la série n° 4 (asparagine)	109
» » 20 : Résultats analytiques de la série n° 4 (asparagine)	109