

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

Artikel: Contribution à l'étude de l'hypovitaminose B1 chez une levure
Autor: Dalphin, Charlotte
Kapitel: Méthodes analytiques
DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-1099460>

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>

- 3) sous-famille des *Mycotoruloïdeae*.
- 4) genre *Candida Berkhout 1923*.
- 5) groupe *Krusei*.
- 6) espèce *Candida krusei*.
- 7) variété : *Candida krusei affinis* (Duclaux) Dalphin 1943.

MÉTHODES ANALYTIQUES

1. Milieu synthétique de culture

Le milieu dans lequel nous cultivons notre levure est composé de 2 solutions préparées et stérilisées séparément, puis mélangées stérilement à parties égales, à froid.

Les deux solutions sont les suivantes :

1) Solution S :	Glucose	100,0 g
	Nitrate d'ammonium crist.	4,00
	Sulfate de magnésium crist.	1,00
	Sulfate de fer crist.	0,050
	Sulfate de zinc crist.	0,050
	Sulfate de manganèse crist.	0,050
	Eau distillée q. s. pour	1000,0 cc
2) Solution P :	Phosphate monopotassique	1,00 g
	Eau distillée q. s. pour	1000,0 cc

Le simple mélange de ces deux solutions constitue le liquide nutritif ordinaire sans vitamine. La vitamine B₁ est ajoutée à raison de 10⁻⁶ mol./1000 cc à la solution P. La stérilisation de ces liquides s'effectue à 110° pendant 20 minutes. La levure est cultivée habituellement dans le milieu ordinaire sans vitamine. On la repique au moins une fois par semaine. Elle est très bien accoutumée à ce milieu nutritif artificiel où elle subsiste déjà depuis très longtemps.

Les cultures sont faites à l'obscurité à la température de 25°. Tout notre travail a été fait au moyen de levures âgées

de 5 jours, c'est-à-dire en pleine fermentation ; ainsi toutes les expériences sont placées, en ce qui concerne l'état physiologique de la levure au moment de l'ensemencement, dans les mêmes conditions. Ces levures employées sont comprises entre celles du 100^{me} passage au 165^{me} passage sur ce même milieu synthétique.

2. Poids sec

L'établissement du poids de la levure nous permet de connaître la croissance de la levure en fonction du temps ou du glucose consommé.

On prépare une série de flacons de culture contenant chacun un volume connu de liquide nutritif, additionné ou non de vitamines B₁.

A des temps donnés, on filtre le contenu d'un flacon sur des filtres compensés tarés (Filtres Schleicher et Schüll No 575, diamètre 9 cm).

On lave les filtres chargés de levures à plusieurs reprises avec de l'eau distillée, puis on les sèche dans un four électrique à 110° pendant deux heures. On laisse refroidir dans un dessiccateur sur H₂SO₄, puis on pèse rapidement.

La différence entre le poids final et la tare nous donne le poids sec de la récolte.

3. Dosage du glucose

Le glucose a été dosé par iodométrie selon la méthode de KOLTHOFF (10).

La réaction est la suivante : l'iode en présence de NaOH est transformé en NaOI qui à son tour fixe son oxygène sur la fonction aldéhydique du glucose le transformant ainsi en acide gluconique. Dans cette réaction, 2 atomes d'iode correspondent à une molécule de glucose d'où, 1 cc d'iode 0,01-n correspond à 0,9 mg de glucose. Il suffit donc de multi-

plier le nombre de cc d'iode utilisé dans le dosage par 0,9 pour connaître en mg la quantité de glucose contenue dans la prise d'essai.

Réactifs employés :

- 1) Solution d'iode 0,01-n fraîchement préparée à partir d'une solution 0,1-n.
- 2) Solution de thiosulfate 0,01-n fraîchement préparée à partir d'une solution 0,1-n.
- 3) Solution de NaOH 0,1-n.
- 4) Solution de HCl 0,1-n.

Toutes ces solutions sont préparées avec de l'eau distillée bouillie.

Technique :

A 10 cc de solution à analyser, ne contenant pas plus de 11 mg de glucose, on ajoute 25 cc d'iode 0,01-n et 5 cc de NaOH 0,1-n. On abandonne le mélange à l'obscurité à la température du laboratoire. Après 10 minutes, on acidifie par 10 cc de HCl 0,1-n et on titre l'iode libéré par le thio-sulfate 0,01-n.

Ce dosage nous permet de déterminer très exactement la quantité des sucres aldéhydiques présents et semble très favorable à notre cas, à cause de sa grande sensibilité. Il permet également de faire le dosage du glucose sur un petit volume du liquide à analyser. Cependant, en traitant le chapitre réservé au dosage de l'acide pyruvique, nous verrons que selon WIELAND (11) l'acide pyruvique peut être aussi dosé par iodométrie et de ce fait, nous avons pu prévoir qu'en dosant le glucose par la méthode de KOLTHOFF, nous dosions également une certaine quantité de l'acide pyruvique présent.

Comme il nous était impossible d'adopter une autre technique de dosage du glucose, nous avons cherché à connaître la quantité d'acide pyruvique dosée et ainsi apporter une rectification à nos résultats.

4. Dosage du glucose en présence d'acide pyruvique (12)

I) Dosage de l'acide pyruvique.

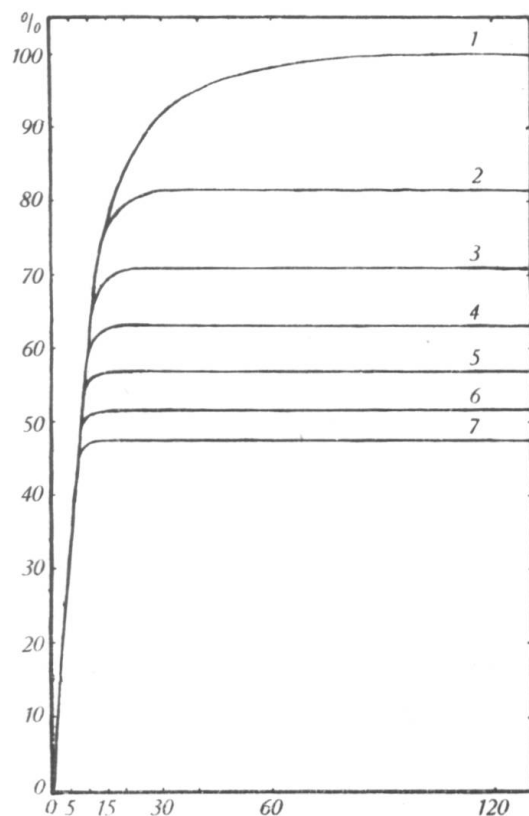
Notre première recherche a porté sur le dosage de l'acide pyruvique en employant la méthode de KOLTHOFF, c'est-à-dire, avec de l'iode 0,01-n au lieu de 0,1-n selon WIELAND. Notre but était de déterminer le temps et la concentration maximum permettant de doser quantitativement l'acide pyruvique.

Les résultats sont indiqués dans le tableau suivant et le graphique N° 1.

Temps de réaction en minutes	Acide pyruvique dosé %						
	mg acide pyruvique mis						
	1,05	1,58	2,10	2,63	3,16	3,68	4,21
5	34,0	27,0	35,5	34,0	28,5	34,0	29,0
10	58,0	57,5	60,0	56,5	57,0	51,0	46,5
15	73,0	70,0	71,0	61,0	55,5	50,5	47,5
20	85,0	78,0	71,0	63,0	56,5	51,5	48,0
30	93,0	78,5	70,0	64,5	55,5	51,0	48,0
40	96,5	82,5	71,5	62,5	57,5	52,5	46,5
60	97,0	79,0	69,5	65,0	57,0	51,5	47,5
120	101,0	83,0	71,0	63,0	56,0	52,0	47,0

Quoiqu'il y ait eu pour chaque concentration en acide pyruvique plus que la quantité stœchiométrique d'iode, la réaction n'est quantitative que pour la concentration la plus faible. Il faut donc un grand excès d'iode si on veut que la réaction aille jusqu'à son terme. Si l'excès d'iode est insuffisant, la réaction s'arrête après un temps déterminé. Cet arrêt se fait à une valeur bien déterminée du % d'acide

pyruvique dosé. Cette valeur est caractéristique de la concentration en acide pyruvique. Elle est atteinte après des temps variables, également caractéristiques de la concentration en acide pyruvique, pour rester ensuite constante.



GRAPHIQUE N° 1 (*)

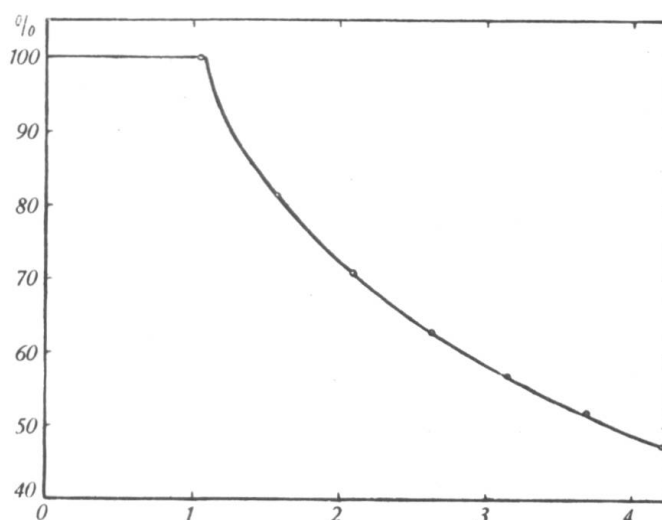
Axe des abscisses : Temps de réaction en minutes.

Axe des ordonnées : Acide pyruvique dosé %.

1 :	Acide pyruvique présent	=	1,05	mg
2 :	»	»	1,58	»
3 :	»	»	2,10	»
4 :	»	»	3,63	»
5 :	»	»	3,16	»
6 :	»	»	3,68	»
7 :	»	»	4,21	»

(*) *Helv. Chim. Acta* 1942, 26, p. 247, 248.

Les résultats ci-dessus permettent de tracer pour chaque temps la courbe de l'« Acide pyruvique dosé % » en fonction de la concentration en acide pyruvique. Le graphique No 2 représente la courbe pour une durée de réaction de 90 minutes.



GRAPHIQUE N^o 2 (*)

Axe des abscisses : mg acide pyruvique présent.
Axe des ordonnées : Acide pyruvique dosé %.

Il résulte du graphique No 2 que l'on dose quantitativement l'acide pyruvique en employant la technique que KOLTHOFF a indiquée pour le glucose, si la quantité d'acide pyruvique est inférieure à 1,1 mg. Puisque 1 cm³ d'iode 0,01-n correspond à 0,1467 mg d'acide pyruvique, on est certain d'avoir un résultat quantitatif si le nombre de cm³ de thiosulfate lors du titrage de l'excès d'iode après acidification est supérieur à $(25 - 1.1 / 0,1467) = 17,5$. Par conséquent, s'il faut moins de 17,5 cm³ de thiosulfate, il faut refaire le dosage avec une solution plus diluée d'acide pyruvique.

Notons que la forme mathématique de la courbe du graphique No 2 est $y = p \times x^{-1/3} + c$ si x représente le nombre de mg d'acide pyruvique et y l'« Acide pyruvique dosé % », p est égal à 144,9 et c à - 47,4.

(*) Helv. Chim. Acta 1942, 26, p. 247, 248.

II. — Dosage du glucose

D'après ce qui précède, il faut un temps de réaction de 90 minutes pour obtenir un résultat quantitatif dans le dosage de l'acide pyruvique. Si on désire que la correction due à la présence de l'acide pyruvique, lors du dosage du glucose dans des mélanges glucose-acide pyruvique corresponde à un dosage quantitatif de l'acide pyruvique, il faut envisager pour ces mélanges, une durée de réaction de 90 minutes. La question se pose alors de savoir si la réaction de l'hypoiodite avec le glucose ne va pas plus loin qu'au stade acide gluconique lorsqu'on prolonge la durée d'expérience de 10 minutes — prescrite par KOLTHOFF — à 90 minutes. En d'autres termes, il faut vérifier s'il y a encore une consommation d'iode lorsqu'on abandonne le mélange réactionnel plus longtemps que 10 minutes.

Nous avons donc fait la cinétique de cette réaction. La concentration en glucose a été d'environ 4 mg pour 10 cm³. Nous servant des résultats des titrages nous avons calculé le « Glucose dosé % » en posant arbitrairement 100% le résultat obtenu après 15 minutes.

Le tableau suivant résume les résultats obtenus.

Temps	Glucose dosé %
4 minutes	87,1
8 »	95,7
10 »	97,9
15 »	100,0
20 »	100,6
30 »	100,6
40 »	100,6
60 »	99,4
90 »	101,8
120 »	98,8

Les écarts constatés n'étant pas supérieurs aux erreurs d'expériences (une erreur de mesure de 0,05 cm³ d'iode ou

de thiosulfate entraîne une erreur de 1,1% sur la valeur « Glucose dosé % »), nous en déduisons qu'on peut abandonner le mélange réactionnel jusqu'à 2 heures sans risque d'erreur.

III. — Dosage du glucose en présence d'acide pyruvique.

Les résultats ci-dessus acquis, nous avons procédé au dosage de mélanges de glucose et d'acide pyruvique. La technique a été la même, le temps pendant lequel on abandonne le mélange réactionnel étant de 90 minutes. Les calculs ont été faits en admettant que le glucose est dans tous les cas quantitativement dosé. Ceci permet de calculer les valeurs de l'« Acide pyruvique dosé % ».

Dans le tableau suivant qui résume les résultats obtenus, nous avons également noté le nombre de cm³ de thiosulfate nécessaires pour titrer l'excès d'iode libéré après acidification.

Glucose mis	Acide pyruvique mis	Thiosulfate ¹	Acide pyruvique dosé %
5,63 mg	1,307 mg	13,55 cm ³	58,0
5,63 »	0,980 »	14,35 »	65,5
5,63 »	0,653 »	15,05 »	82,5
5,63 »	0,327 »	16,60 »	95,0
3,75 »	1,307 »	15,10 »	64,5
3,75 »	0,980 »	15,80 »	75,5
3,75 »	0,653 »	16,55 »	96,0
3,75 »	0,327 »	18,55 »	101,5
1,88 »	1,307 »	16,45 »	72,5
1,88 »	0,980 »	17,45 »	82,0
1,88 »	0,653 »	18,45 »	100,5
1,88 »	0,327 »	20,65 »	101,0

L'examen de ce tableau fournit la solution pratique du problème posé dans ce travail.

¹ Calculé en thiosulfate 0,01-n. à partir des mesures expérimentales faites avec du thiosulfate approximativement 0,01-n.

En effet, si on abandonne le mélange réactionnel 90 minutes et si le nombre de cm^3 de thiosulfate nécessaires au titrage de l'excès d'iode est supérieur à 18, on est certain que les deux constituants du mélange sont dosés quantitativement. Connaissant la quantité d'acide pyruvique présent et sachant qu'une molécule d'acide pyruvique consomme 6 atomes d'iode, on peut calculer la quantité d'iode consommée par le glucose et partant, la quantité de glucose présente dans le mélange.

Pratiquement nous voyons qu'il est possible de calculer exactement la quantité de glucose présente, cependant, nous n'avons pas fait intervenir de correction dans le présent travail. Les corrections sont en effet très faibles, les quantités de glucose étant généralement plusieurs dizaines de fois plus élevées que celles de l'acide pyruvique présent. Ces légères erreurs en excès n'entachent pas les résultats généraux de notre travail.

5. Dosage des phosphates

Nous employons pour doser les phosphates la méthode colorimétrique de BELL-DOISY-BRIGGS (13), en suivant les indications de BARAC (14).

Le principe de la méthode est le suivant : le phosphate réagit avec le molybdate d'ammonium pour donner du phosphomolybdate d'ammonium qui, en présence d'hydroquinone forme un composé bleu : le bleu de molybdène. La mesure de l'extinction d'une solution de ce colorant permet de trouver à l'aide d'une courbe d'étalonnage la quantité de phosphate présent.

Réactifs employés :

Solution I : On dissout dans 300 cc d'eau distillée 25,0 g de molybdate d'ammonium et on ajoute 200 cc d'une solution aqueuse contenant 75 cc de H_2SO_4 concentré.

Solution II : 20,0 g de sulfite de sodium cristallisé et 0,50 g d'hydroquinone sont dissous dans E.D.Q.S. 100 cc. Cette solution devient inutilisable lorsqu'elle se colore.

Technique :

On ajoute à 7 cc de liquide à doser 2 cc de solution I et 1 cc de solution II. Le volume total doit toujours être de 10 cc. Peu à peu, il se développe une couleur bleue, stable après une heure et demie que l'on dose colorimétriquement au photomètre de Pulfrich avec l'écran S 72 en mettant dans la deuxième cuve le liquide d'une expérience à blanc.

La courbe d'étalonnage de l'appareil a fourni la constante suivante qu'il suffit de multiplier par l'extinction lue pour obtenir la quantité de γ de phosphore dans la prise d'essai : constante = 7,02.

6. Dosage des nitrites

Les nitrites sont dosés selon la méthode de ENDRES et KAUFMANN (15).

Le principe de la méthode repose sur la réaction de P. GRIESS : les nitrites réagissent avec l'acide sulfanilique pour former un sel de diazonium. Ce sel en présence de α -naphtylamine donne une coloration rose (acide benzène sulfonique-1,4-azo-4 - α -naphtylamine-1).

Réactifs employés :

Solution I : On ajoute à 200 cc d'eau distillée chaude 2,62 g d'acide sulfanilique et 50 cc d'acide acétique glacial.

Solution II : A 250 cc d'eau distillée bouillante on ajoute 1,50 g de α -naphtylamine. On porte à ébullition quelques minutes, on filtre à chaud et on ajoute au filtrat 12,5 cc d'acide acétique glacial.

Technique :

A 10 cc de liquide à analyser, on ajoute 2 cc de la solution I et 2 cc de la solution II. Il se forme une coloration rose dont l'intensité est évaluée au photomètre du Pulfrich après 15 à 20 minutes. Les lectures colorimétriques se font avec l'écran S 53 en utilisant des cuves d'épaisseurs quelconque

mais en rapportant les résultats à la cuve de 10 mm. La seconde cuve est remplie avec le liquide d'une expérience à blanc.

L'intensité de la coloration étant directement proportionnelle aux lectures colorimétriques, l'étalonnage de l'appareil a fourni la constante 4,80 par laquelle il suffit de multiplier les extinctions pour obtenir en γ la quantité d'azote nitreux contenu dans la prise d'essai.

7. Dosage des nitrates

Nous dosons les nitrates colorimétriquement par la méthode de LEMOIGNE, MONGUILLON et DESVEAUX (16).

Cette méthode est basée sur la transformation des nitrates en nitrites et sur l'application aux nitrites formés de la réaction de GRIESS. La transformation de l'ion nitrate en ion nitrite est obtenue par l'action du zinc.

Dans la première étape de la réaction, on ajuste le liquide à doser à un pH de 2,5 à 3 puis on le refroidit à 0°. On fait agir à ce moment et pendant un temps défini de la poudre de zinc. En observant ces conditions, on évite une réduction de l'ion nitrique en ammoniac et on obtient un mélange de nitrites et d'hydroxylamine.

La deuxième étape de la réaction consiste à transformer l'hydroxylamine du mélange en nitrites au moyen de l'iode en solution acétique.

Réactifs employés :

Solution I : Ajouter à 400 cc d'eau distillée chaude 5,25 g d'acide sulfanilique et 100 cc d'acide acétique glacial.

Solution II : A 500 cc d'eau distillée bouillante, ajouter 3,00 g d' α -naphtylamine. Amener à ébullition pendant quelques minutes, filtrer à chaud et ajouter au filtrat 25 cc d'acide acétique glacial.

Cette solution est inutilisable dès qu'il se forme un dépôt.

Solution III : Dissoudre dans 100 cc d'acide acétique cristallisable 1,3 g d'iode.

Solution IV : Dissoudre dans 100 cc d'eau distillée 2,5 g de thiosulfate de sodium.

Technique :

Pour nos filtrats de levures, la technique suivante s'est montrée favorable :

Dans une fiole jaugée de 20 cc, on introduit un volume connu de liquide à doser. On ajoute 1 goutte de HCl 0,1-n et 5 cc d'une solution de sulfate d'ammonium à 20%. On complète à 20 cc avec de l'eau distillée. On refroidit le liquide à 0°, puis on y ajoute 1,00 g de poudre de zinc, on mélange immédiatement et on maintient la suspension constante pendant 3 minutes. Ce temps écoulé, on filtre pour séparer le zinc et 10 cc du filtrat sont mis dans une fiole jaugée de 50 cc. On y ajoute 1 cc de la solution I et 1 cc de la solution III. Après trois minutes, le liquide est décoloré par l'addition de solution IV sans excès. On termine la réaction en ajoutant 1 cc de la solution II puis on complète immédiatement à 50 cc par de l'eau distillée.

L'intensité de la coloration rose qui se forme est dosée colorimétriquement au photomètre de Pulfrich avec l'écran S 53 en mettant dans la deuxième cuve le liquide d'une expérience à blanc. On rapporte toutes les lectures à la cuve de 10 mm.

Le dosage des nitrates exécuté strictement selon les indications de LEMOIGNE, MONGUILLON et DESVEAUX ne nous a pas entièrement satisfait. En effet, nous n'obtenions pas toujours des résultats constants. Dans le but de découvrir d'où venait l'erreur, nous avons entrepris systématiquement l'étude des réactions de réductions et d'oxydation.

La recherche suivante nous a permis de voir si le dosage était quantitatif. 1 cc d'une liqueur nitratée contenant environ 0,200 g de NH₄NO₃ % est diluée à 100 cc avec de l'eau distillée. Des quantités variées de cette solution sont com-

plétées à 10 cc par de l'eau distillée et nous dosons l'azote nitrique en observant strictement les données des auteurs ci-dessus.

Voici les résultats que nous avons obtenus :

Azote nitrique	Temps d'action du zinc	Temps d'action de l'iode	Lectures colorimétriques (cuve 10 mm) pour 3,5 γ d'azote nitrique
3,5 γ	3 minutes	3 minutes	0,067
7,0	3 »	3 »	0,055
10,5	3 »	3 »	0,053

Ainsi plus la solution est concentrée, plus la lecture colorimétrique est faible.

Ces résultats acquis, nous avons éprouvé au moyen de la même liqueur que précédemment la durée de l'oxydation puis celle de la réduction.

I. — Durée variable de l'oxydation par l'iode, le temps de la réduction par le zinc étant constant et de 3 minutes.

Azote nitrique	Temps d'action du zinc	Temps d'action de l'iode	Lectures colorimétriques (cuve 10 mm)
10,5 γ	3 minutes	1 minute	0,208
10,5	3 »	3 minutes	0,207
10,5	3 »	5 »	0,205

Il ressort de ces valeurs que la durée d'action de l'iode n'intervient aucunement au cours de cette réaction.

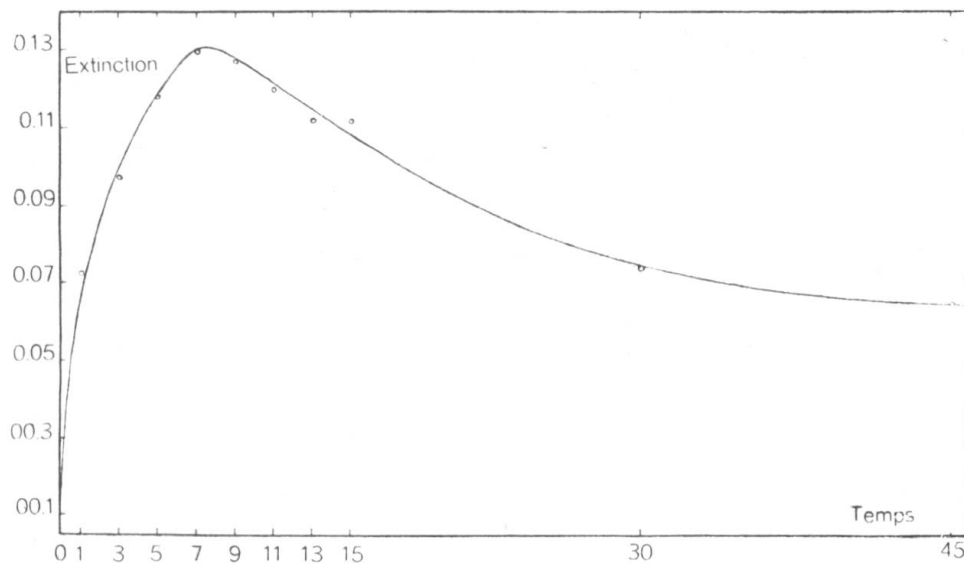
II. — Durée variable de la réduction par le zinc, le temps d'oxydation par l'iode étant constant et de trois minutes.

Azote nitrique	Temps d'action du zinc	Temps d'action de l'iode	Lectures colorimétriques (cuve 10 mm)
10,5 γ	1 minute	3 minutes	0,132
10,5	3 minutes	3 »	0,194
10,5	5 »	3 »	0,235

Ainsi il est clairement démontré que toute l'exactitude quantitative du dosage repose sur la durée de la réduction par le zinc. Après 5 minutes d'action, la réaction ne semble pas encore terminée, alors que les auteurs de la méthode indiquent une durée de réduction de 3 minutes seulement. Nous avons entrepris alors des dosages en vue de connaître le moment où la réduction est complètement achevée.

Nous avons utilisé une solution de nitrate de sodium exempte de nitrites. Nous avons fait varier la durée de contact avec le zinc de 1 à 45 minutes, le temps de réaction de l'iode étant toujours de 3 minutes.

Azote nitrique	Temps d'action du zinc	Lectures colorimétriques (cuve 10 mm)
4,97 γ	1 minute	0,072
»	3 minutes	0,097
»	5 »	0,118
»	7 »	0,130
»	9 »	0,127
»	11 »	0,120
»	13 »	0,112
»	15 »	0,112
»	30 »	0,074
»	45 »	0,065



GRAPHIQUE N° 3

Axe des abscisses : Temps d'action du zinc en minutes.

Axe des ordonnées : Lectures colorimétriques (cuve de 10 mm).

Il résulte des valeurs obtenues et du graphique que le temps minimum nécessaire pour obtenir une réduction totale par le zinc est de 7 minutes.

En observant strictement ces nouvelles données, nous avons établi pour le photomètre de Pulfrich une courbe d'étalonnage au moyen de l'écran S 53.

Voici les résultats que nous avons obtenus, la durée de réduction étant de 7 minutes et celle de l'oxydation de 3 minutes :

Azote nitrique	Extinctions cuve de 10 mm	Extinctions pour 1 γ d'azote nitrique
9,94 γ	0,253	0,0255
8,94	0,218	0,0243
7,95	0,197	0,0247
6,96	0,155	0,0229
5,96	0,146	0,0245
4,97	0,117	0,0236
3,97	0,090	0,0225
2,98	0,071	0,0238
1,99	0,045	0,0237
0,99	0,022	0,0222

L'extinction moyenne pour 1 γ d'azote nitrique étant 0,0238, la constante par laquelle il suffit de multiplier l'extinction lue pour obtenir en γ la quantité d'azote nitrique de la prise d'essai sera : 43,0. Pour nos expériences, nous avons adopté cette valeur ainsi que la rectification apportée à la méthode originale de dosage.

8. Dosage de l'azote ammoniacal

On introduit dans un appareil de micro-kjeldahl 5 cc de liquide à analyser et 5 cc de solution contenant 30% de KOH et 5% de thiosulfate.

On distille et on reçoit le distillat dans 10 cc d'une solution de HCl 0,02-n.

L'excès d'acide est titré à chaud en présence de rouge de méthyle par une solution de NaOH 0,02-n, et la quantité d'acide employée est calculée. Sachant que 1 cc de HCl 0,02-n correspond à 0,28 mg d'azote, on calcule en mg la quantité d'azote ammoniacal contenu dans 100 cc de liquide à analyser.

9. Dosage de l'acidité formée

L'acidité est dosée par une solution de NaOH 0,1-n en présence de phénolphaléine comme indicateur.

Nous avons déterminé ainsi l'acidité actuelle et nous avons calculé l'acidité formée en déduisant l'acidité initiale de l'acidité actuelle. L'acidité formée est exprimée en cc NaOH 1,0-n pour 1000 cc de liquide.

10. Détermination du pH

Nous avons déterminé le pH par colorimétrie au moyen du photomètre de Pulfrich d'après la méthode décrite par A. JANKE et F. SEKERA (17). Les indicateurs proposés par ces auteurs permettent de déterminer des pH compris entre 2,5 et 10,0.

Dans nos expériences, le pH se trouvant souvent inférieur à 2,5, nous avons tenté de trouver un nouvel indicateur. Malheureusement, aucun des indicateurs à notre disposition n'avait un virage à une seule couleur, condition indispensable pour l'obtention d'une courbe d'étalonnage droite.

Nous avons alors adopté les papiers indicateurs LYPHAN (Medicina S. A. — Vaduz) pour ces pH inférieurs à 2,5.

11. Dosage de l'acide pyruvique

Nous avons adopté pour nos dosages la méthode LU (18) car elle est spécifique et permet de doser exactement de très petites quantités d'acide pyruvique.

La méthode s'applique au dosage de l'acide pyruvique dans le sang. Nos déterminations se faisant dans des liquides aqueux exempts de protides, il est bien entendu que nous laissons de côté le traitement à l'acide trichloracétique servant à déféquer le sang.

Le principe de la méthode de LU consiste à convertir l'acide pyruvique contenu dans une solution aqueuse en 2,4-dinitrophénylhydrazone, celle-ci est extraite de la solution aqueuse par l'acétate d'éthyle. L'hydrazone de l'acide pyruvique est séparé des autres hydrazones des dérivés cétoniques et aldéhydiques et de l'excès d'hydrazine par une extraction au carbonate de sodium où elle est seule soluble. Finalement, l'adjonction de NaOH à la solution de Na_2CO_3 contenant la 2,4-dinitrophénylhydrazone de l'acide pyruvique fait apparaître une coloration rouge, stable après 10 minutes, que l'on dose colorimétriquement. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration en acide pyruvique.

Réactifs employés :

- 1) 2,4-dinitrophénylhydrazine à 0,1% dissoute à chaud dans HCl 2,0-n.
- 2) Acétate d'éthyle pur, redistillé.

3) NaOH 1,0-n.

4) Na₂CO₃ à 10%.

Technique :

Dans un tube à essai contenant 2 cc de liquide à doser (pas plus de 50 à 60 γ d'acide pyruvique) on ajoute 1 cc de solution de 2,4-dinitrophénylhydrazine. Ce mélange est abandonné à la température du laboratoire pendant 10 minutes. On extrait une première fois par 2 cc d'acétate d'éthyle. On transporte la couche supérieure quantitativement dans un deuxième tube à essai et on répète 2 fois encore l'extraction de l'acétate d'éthyle, en employant seulement 1 cc. Après chaque extraction on transporte l'acétate d'éthyle dans le deuxième tube à essai. Le liquide aqueux restant qui doit être incolore est jeté. L'extrait d'acétate d'éthyle contient toutes les hydrazones formées et l'excès d'hydrazine. On sépare alors l'hydrazone de l'acide pyruvique par trois extractions successives de 2 cc chacune de Na₂CO₃ en transportant les trois fois quantitativement le Na₂CO₃ dans le premier tube à essai bien égoutté. On enlève les hydrazones dissoutes dans l'acétate d'éthyle qui ont été entraînés avec le Na₂CO₃, par une dernière extraction de 1 cc d'acétate d'éthyle. L'extrait de Na₂CO₃ est coloré plus ou moins fortement en jaune suivant la concentration en hydrazone. On en prélève exactement 5 cc auxquels on ajoute 4 cc de NaOH 1,0-n. On ajoute les 4 cc de soude à la totalité de l'extrait carbonaté. Notre manière de procéder a fourni des résultats plus précis¹. Après 10 minutes, on fait les lectures au photomètre de Pulfrich : écran S 43, cuve de 1 cm.

Nous avons établi la courbe d'étalonnage du photomètre de Pulfrich au moyen de pyruvate de sodium dont la pureté en pyruvate a été exactement déterminée. Nous avons trouvé que 1 γ d'acide pyruvique correspond à une extinction de

¹ Elle nous a été proposée par le Dr E. Haag.

0,0177. Le nombre de γ d'acide pyruvique de la prise d'essai sera donc égale à : $\frac{\text{extinctions lues}}{0,0177}$ ou à 56,46 multiplié par les extinctions lues.

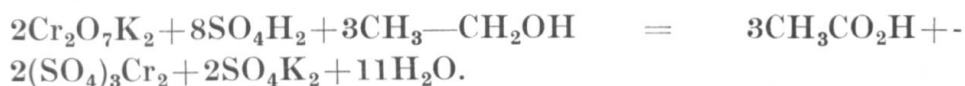
Pour déterminer la pureté du pyruvate de sodium (F. Hoffmann-La Roche), nous avons employé la méthode de dosage de l'acide pyruvique de WIELAND. Cette méthode s'applique à des échantillons contenant environ 0,01 g d'acide pyruvique. Ce dosage se fait par iodométrie, l'acide pyruvique est oxydé par l'hypoiodite en iodoforme et en acide oxalique. Dans cette réaction, une molécule d'acide pyruvique consomme 6 atomes d'iode d'où 1 cc d'iode 0,1-n correspond à 0,001467 g d'acide pyruvique.

Technique :

Au liquide à doser, on ajoute 5 cc de NaOH 1,0-n puis 20 cc d'iode 0,1-n. On abandonne ce mélange à la température du laboratoire pendant 1 heure et demie. On acidifie par H_2SO_4 1,0-n, l'iode est libéré et on titre l'excès d'iode au moyen de thiosulfate 0,1-n en présence d'empois d'amidon.

12. Dosage de l'éthanol

L'éthanol est dosé selon la méthode de Martin modifiée par Boidin (19). Le principe de la méthode est basé sur le fait que l'éthanol à l'état de vapeur est oxydé en acide acétique par un mélange de bichromate de potassium et d'acide sulfurique. La quantité de bichromate utilisée, déterminée iodométriquement par différence, mesure la quantité d'éthanol présente. D'après la réaction :



1 cc de biochromate 0,1-n correspond à 1,15 mg d'éthanol.

Réactifs :

- 1) Solution de bichromate de K 0,1-n.
- 2) Acide sulfurique conc.

- 3) Solution de thiosulfate 0,1-n.
- 4) Solution de iodure de potassium 5%.

Technique :

On introduit dans un ballon à fond rond de 50 ou 100 cc, 10 cc de liquide à analyser ne contenant pas plus de 23 mg d'éthanol. Le ballon est muni d'un tube recourbé d'une longueur de 30 cm environ dont l'extrémité effilée plonge jusqu'au fond d'un tube incliné (diamètre 20 à 25 mm, longueur 20 à 25 cm) muni de 3 ou 4 renflements. Dans ce tube, on met 20 cc de bichromate et 10 cc d'acide sulfurique. Aussitôt ce mélange fait, on commence à distiller les $\frac{2}{3}$ environ du contenu du ballon. Cette opération doit être exécutée lentement, sa durée devrait être de 10 minutes au minimum. La distillation finie, on transvase le mélange réactionnel dans une fiole conique de 1000 cc et on lave largement le tube et le réfrigérant de manière à obtenir un volume total de 200 à 300 cc. On ajoute finalement 10 cc de solution de KI à 5%. L'iode mis en liberté est dosé par le thiosulfate.

Cette méthode nous donne des résultats très précis, mais elle dose n'importe quelle substance oxydable et volatile. Nous devons en particulier compter avec la présence d'aldéhyde acétique. Cette substance peut être détruite par un traitement à la soude à chaud :

A 10 cc de liquide à analyser, on ajoute 3 cc de NaOH 4,0-n et on distille sous reflux pendant 30 minutes au bain-marie de 80 degrés. Après refroidissement du liquide, on procède au dosage décrit ci-dessus.

13. Recherche et dosage des acides volatils

La méthode employée est celle de DUCLAUX (20). Le principe de cette méthode est le suivant : un volume de 110 cc d'un liquide, contenant des acides volatils à l'état libre, est distillé par fraction de 10 cc. Chacune des prises est saturée à part avec une solution alcaline. Les chiffres ainsi obtenus

sont notés successivement. Les rapports de ces valeurs avec la quantité totale de solution alcaline employée pour le dosage (c'est-à-dire pour 100 cc de distillat) sont caractéristiques de l'acide volatil présent. Il existe également un rapport constant entre la quantité d'acide du liquide à analyser et la quantité qui a distillé à un moment quelconque. S'il existe un mélange de plusieurs acides dans le liquide, chaque acide se comporte comme s'il était seul et suit les lois de sa distillation propre. Cette méthode permet donc au moyen d'une seule distillation d'identifier et de doser les acides volatils.

14. Dosage de l'acidité volatile

Le dosage de l'acidité volatile se fait en distillant le liquide à analyser acidifié au besoin par un acide fixe et en entraînant par de la vapeur d'eau les acides volatils. Le distillat est saturé par de la soude. Les résultats sont exprimés en cc de NaOH 1,0-n pour 1000 cc de liquide.

15. Sur le dosage des lipides

L'examen des méthodes d'extraction et de dosage des lipides ne nous a pas satisfait, car en général, les auteurs ne motivent ni leur mode d'extraction, ni les solvants qu'ils emploient. Ces lacunes nous ont conduit à une étude systématique de l'extraction des lipides d'une levure. Pour ce faire, nous nous sommes limité à trois solvants : l'éthanol, l'éther et le benzène.

I. — Préparation des solvants

Alcool absolu : L'alcool 95° est mis en présence d'un excès de chaux vive. On chauffe pendant 2 heures sous reflux au bain-marie bouillant. On recueille l'alcool absolu par distillation.

Ether anhydre : On met de l'éther pur du commerce en présence de CaCl₂ pendant 8 jours, à l'obscurité. On dis-

tille l'éther et on ajoute au distillat du sodium métallique et avant l'emploi, on filtre l'éther.

Benzène : benzène pur du commerce redistillé.

II. — Préparation du matériel d'extraction.

Les levures obtenues par culture pure sont séchées dans le vide sur H₂SO₄ et pilées une première fois dans un mortier en porcelaine non poli. On termine le broyage au moyen d'un mortier en agate afin d'obtenir une poudre de levure aussi fine que de la farine. Ce second broyage doit être très minutieusement exécuté, car, plus le matériel est finement divisé, plus l'action des solvants est rapide et régulière.

Description de l'appareil extracteur.

Nous avons employé un micro-extracteur de Slotta (de Greiner et Friedrichs, Stützerbach) qui se compose de trois pièces munies de rodages : un ballon de forme quelconque, une pièce intermédiaire dans laquelle on introduit soit un creuset filtrant (63a G2 de Schott, Iéna), soit une cartouche à extraction (n° 603, Schleicher et Schüll, Düren), et un réfrigérant ascendant de Dimroth.

III. — Principe d'extraction.

Le principe d'extraction consiste à faire distiller sur bain-marie le solvant qui tombe et baigne la substance à extraire placée dans le creuset ou la cartouche d'extraction. Le solvant dissout les graisses de la substance, il retombe dans le ballon en entraînant les graisses. Le solvant continue à distiller. Il se fait ainsi un passage continu de solvant au travers de la substance. Le temps d'extraction terminé, on évapore le solvant et on obtient un résidu que l'on sèche dans le vide sur H₂SO₄ jusqu'à poids constant (24 heures). Ce résidu est appelé extrait brut.

Nous divisons nos expériences en deux parties.

Le but de la première partie est de déterminer au bout de combien de temps l'extraction devient totale pour chacun des trois solvants, celui de la deuxième, de trouver un mode d'extraction court et quantitatif.

Pour cette première partie, nous avons introduit dans une cartouche à extraction 999,5 mg de levure.

Après une extraction de 4 heures par l'éthanol, nous déterminons l'extrait brut. Nous continuons cette extraction éthanolique en faisant agir ce solvant 2 heures, puis 1 heure et enfin 2 heures sur ce même échantillon de levure. Nous déterminons chaque fois l'extrait brut. La levure ainsi traitée est extraite suivant le même procédé trois fois par l'éther durant une heure chaque fois, puis trois fois par le benzène. Les extraits bruts de ces dix extractions successives ont eu des poids qui sont consignés dans le tableau ci-dessous. (Le poids des extraits est obtenu par la différence entre le poids du ballon contenant les extraits bruts et la moyenne des tares du ballon avant et après chaque extraction).

Temps d'extractions	Poids de l'extrait
<i>Alcool :</i>	
4 heures	45,9 mg.
2 heures	10,3 »
1 heure	2,0 »
2 heures	3,6 »
<i>Ether :</i>	
1 heure	10,3 mg.
1 heure	0,0 »
1 heure	0,8 »
<i>Benzène :</i>	
1 heure	0,4 mg.
1 heure	1,8 »
1 heure	0,0 »

Ces résultats nous montrent que l'extraction par l'alcool est lente. En effet, après 9 heures d'extraction, la substance n'est pas encore épuisée par l'éthanol. L'extraction subsé-

quente par l'éther est terminée après une heure. Enfin, le solvant suivant — le benzène — n'extrait plus que des traces.

Nous constatons ainsi que cette extraction : 9 heures d'alcool, 3 heures d'éther et 3 heures de benzène peut être considérée comme totale. Cependant, si cette extraction est totale, elle est longue. Il faut compter environ 4 jours (séchage compris) pour une seule extraction. Comment écourter cette durée d'extraction ? C'est pour élucider cette question que nous avons entrepris la deuxième partie de notre expérience.

La manipulation de cette deuxième expérience est différente de celle de la première. En place de la cartouche d'extraction, nous employons un creuset filtrant et nous utilisons pour chaque essai seulement 500 mg de levure.

Ajoutons que pour toutes les extractions suivantes, nous avons employé des échantillons de levure provenant de la même récolte. D'autre part, nous ne décomposons plus l'analyse. Lorsque nous employons deux ou trois solvants, nous évaporons entre chaque temps d'extraction et nous continuons l'extraction suivante dans le même ballon sur le même échantillon de levure. En fin d'expérience, nous évaporons le solvant, le résidu est séché pendant 12 heures dans le vide sur H₂SO₄. Ce résidu sec, appelé extrait brut, est repris par de l'éther anhydre, et filtré dans un autre ballon taré. Le résidu d'évaporation est séché dans le vide sur H₂SO₄ jusqu'à poids constant. Ce résidu, exempt de toute impureté, est appelé lipides bruts.

Après notre première expérience, nous avons admis que la quantité totale des lipides bruts est obtenue par l'extraction de 9 heures alcool, 3 heures éther et 3 heures benzène. La moyenne de trois essais (chaque fois 9 heures alcool, 3 heures éther, 3 heures benzène) rapportée à 500,0 mg de levure a été de 40,6 mg de lipides bruts. Nous considérons, pour la suite des expériences, cette quantité comme maximale ou 100%.

Cette base établie, nous avons éprouvé la qualité de chacun des solvants employés. Comme temps d'extraction, nous avons choisi neuf heures. Voici les résultats obtenus :

Mode d'extraction			Lipides mg	% dosé (40,6 mg = 100%)
Alcool	Ether	Benzène		
9 h.	—	—	38,4	94,6
—	9 h.	—	8,6	21,2
—	—	9 h.	22,7	55,9

Ici, l'importance de l'alcool comme « extracteur » des graisses s'accuse nettement. On sait que l'éther et le benzène sont de meilleurs solvants des lipides que l'éthanol, mais on sait aussi que l'éthanol dépasse de loin en efficacité l'éther et le benzène en temps qu'« extracteur » de la plupart des substances biologiques.

Nous n'avons pas l'intention de nous étendre sur ce paradoxe apparent. Notons cependant que ce fait est dû à une des deux possibilités suivantes :

1) Une partie des lipides est liée à d'autres substances qui les rendent insolubles dans les solvants des graisses, seul l'alcool serait capable de rompre ces liaisons.

2) Une partie des lipides est protégée par des substances qui ne sont pas mouillées ni par l'éther, ni par le benzène. Ces solvants ne pouvant pas « atteindre » les lipides, ne les peuvent par conséquent pas extraire.

L'alcool par contre mouillerait ces substances protectrices et les extrairait lentement, parce qu'il est un mauvais solvant des graisses. Il serait intéressant de savoir si la substance protectrice hypothétique est un film d'eau.

Nous pouvons aussi déduire de ce tableau que l'éther est, seul, un très mauvais « extracteur » et que le benzène lui est supérieur. Cependant, les résultats suivants, mentionnés ci-dessous, nous montrent qu'une courte extraction (3 h.) préalable par l'éthanol ne rend pas plus efficaces les qualités extractives de l'éther et du benzène.

Mode d'extraction			Lipides mg	% dosé (40,6 mg = 100%)
Alcool	Ether	Benzène		
3 h.	3 h.	3 h.	35,5	87,0
3 h.	1 h.	1 h.	36,5	88,0
3 h.	1 h.	—	34,5	84,5

Par contre, si l'on double le temps d'extraction par l'alcool, les résultats sont sensiblement augmentés :

Mode d'extraction			Lipides mg	% dosé (40,6 mg = 100%)
Alcool	Ether	Benzène		
6 h.	3 h.	—	39,5	97,0
6 h.	1 h.	—	38,5	95,0

Là encore nous avons la preuve que l'extraction par l'alcool joue le principal rôle.

Afin de savoir s'il serait avantageux d'intercaler une extraction par l'éther entre deux extractions par l'alcool, ou bien d'établir une succession d'extractions : alcool, éther, alcool, éther, nous avons fait deux essais dont voici les résultats :

Mode d'extraction				Lipides mg	% dosé (40,6 mg = 100%)
Alcool	Ether	Alcool	Ether		
3 h.	3 h.	3 h.	—	34,0	84,0
2 h.	2 h.	2 h.	2 h.	35,5	88,0

D'après ces chiffres, les changements de solvants n'écourtent pas le temps d'extraction. C'est seulement la durée d'action de l'éthanol qui intervient. Ce mode d'extraction est d'autre part désavantageux en ce qui concerne la mani-

pulation : changement trop souvent répété de solvant. Enfin, puisque dans toutes nos extractions nous constatons que l'alcool est le solvant le plus important, nous avons encore augmenté la durée de l'extraction dans l'essai suivant :

Mode d'extraction		Lipides mg	% dosé (40,6 mg = 100%)
Alcool	Ether		
9 h.	1 h.	40,4	99,5

Le résultat favorable de cette expérience termine notre étude. Il suffit d'extraire 9 heures par l'alcool et ensuite 1 heure par l'éther pour aboutir à une extraction totale. D'un seul coup, nous avons ainsi écourté la durée d'extraction et simplifié les manipulations.

C'est ce mode d'extraction qui sera employé dans les expériences de ce travail.

16. Analyse des lipides

Les lipides bruts obtenus par l'extraction décrite ci-dessus sont analysés de la façon suivante :

I. — Saponification.

La saponification se fait au moyen de potasse alcoolique. On ajoute aux lipides bruts 25 cc d'alcool contenant 9,2 g de KOH. Le ballon est ensuite appliqué à un réfrigérant ascendant de Dimroth, on porte cet appareil au bain-marie bouillant. La saponification s'opère ainsi sous reflux pendant 3 heures. La saponification achevée, on refroidit le liquide. Ce liquide est transvasé dans une ampoule à décantation, on y ajoute de l'éther de pétrole et, après avoir agité fortement, on sépare la couche d'éther de pétrole. Cette extraction est répétée deux fois au moins. On obtient ainsi une couche aqueuse contenant l'hydrosoluble et des acides gras et une couche d'éther de pétrole contenant l'insaponifiable.

II. — Analyse des acides gras.

Les acides gras contenus dans la couche aqueuse sont libérés par acidification par HCl dilué. On les extrait par trois fois avec de l'éther. L'éther est lavé à l'eau puis, chassé dans le vide. Le résidu ainsi obtenu est séché jusqu'à poids constant, ce poids représente la quantité d'acides gras.

On titre les acides gras en les chauffant pendant 15 minutes avec 20 cc de NaOH 0,1-n. Après refroidissement, on titre l'excès de soude par une solution de HCl 0,1-n en présence de phénolphthaléine.

L'acidité des acides gras est exprimée en mg d'acide oléique. On calcule également le poids moléculaire moyen des acides gras.

III. — Analyse de l'insaponifiable.

On acidifie par l'acide chlorhydrique concentré la solution d'éther de pétrole puis on la lave jusqu'à disparition complète de l'acidité. L'éther de pétrole est alors chassé dans le vide. Le résidu obtenu est séché jusqu'à poids constant et pesé. Il représente l'insaponifiable.

IV. — Hydrosoluble.

On déduit de la quantité des lipides bruts la somme des quantités d'acides gras et d'insaponifiable. Ce chiffre obtenu par différence représente la quantité d'hydrosoluble.

17. Identification et dosage de l'ergostérol

On identifie les stérols contenus dans l'insaponifiable au moyen de la méthode de TORRELLI et JAFFE (21).

A une solution chloroformique de l'insaponifiable, on ajoute 2 cc d'huile d'olive, 0,4 cc d'acide acétique et 1 cc de solution chloroformique de brome. Si on est en présence d'ergostérol, il se forme une coloration vert-mousse qui est spécifique de cette substance.

Le dosage de l'ergostérol se fait colorimétriquement par la méthode de LIEBERMANN-BURCHARD (22).

Réactif : on ajoute à 25 cc d'anhydride acétique 1,5 cc de H_2SO_4 concentré pur (densité = 1,840).

Technique : On reprend le résidu sec de l'insaponifiable par du benzène. On amène la solution benzénique à une température de 18° et 5 cc de cette solution sont mélangés à 2 cc de réactif ayant une température de 18° . On abandonne à 18° pendant 2 minutes, on dose colorimétriquement au photomètre de Pulfrich avec l'écran S 66. La coloration est stable entre 2 et 4 minutes.

La courbe d'étalonnage fournit une constante de 0,3737. On multiplie donc l'extinction lue rapportée à la cuve d'épaisseur de 10 mm par la constante pour obtenir la quantité de mg d'ergostérol contenue dans la prise d'essai.

18. Sur le dosage des protéides

La détermination de l'azote de nos levures se fait au moyen du micro-dosage de KJELDAHL, selon les indications de PREGL (1935) (23). Cette méthode consiste à attaquer la substance à analyser par de l'acide sulfurique concentré et transformer ainsi l'azote organique en azote ammoniacal sous forme de sulfate d'ammonium. Après la destruction, on libère l'ammoniaque par alcalinisation. On entraîne alors l'ammoniaque libérée par de la vapeur d'eau et on la reçoit dans une solution d'acide chlorhydrique titrée. Lorsque toute l'ammoniaque a été entraînée, on titre l'acide restant. Par différence entre la quantité d'acide initial et la quantité d'acide restant, on obtient la quantité d'acide employé pour fixer l'ammoniaque. Sachant que 1000 cc de HCl N correspondent à 14 g d'azote, on calcule la teneur en azote de la prise d'essai.

I. — Attaque de la substance.

Dans un matras de 50 cc, on introduit environ 50 mg de levure pesée à 0,1 mg près, 1,00 g de sulfate de potassium et 0,200 g d'acétate de mercure. On verse sur le tout

10 cc d'acide sulfurique concentré et on place le matras sur une plaque chauffante. Le liquide devient brun, puis noir presque instantanément ; puis, de noir il se décolore progressivement pour devenir incolore. Dans une expérience d'essai, nous avons tenté de supprimer les sels de potassium et de mercure ; mais la décoloration au lieu de se faire au bout de trois ou quatre heures s'effectuait après une dizaine de jours seulement. Il n'est donc pas avantageux, quoique les résultats finaux soient les mêmes, de supprimer les catalyseurs.

Cependant, l'attaque de la substance est-elle totalement terminée au moment de la décoloration ?

Pour éclaircir cette question non mentionnée dans la description de PREGL, nous avons fait l'expérience suivante :

Une fois les liquides devenus incolores (après environ trois heures de chauffe), nous avons continué à chauffer. Après des temps déterminés, nous avons prélevé des échantillons pour y doser l'azote ammoniacal formé. Cette étude systématique nous fournit des mesures, en fonction du temps, de la destruction après la décoloration. Voici les résultats obtenus :

Durée de l'attaque à partir de la décoloration	Azote %	% dosé
0 heure (moment de la décoloration)	7,85	94,6
2 heures	8,10	96,4
4 heures	8,22	99,1
6 heures	8,29	99,9
8 heures	8,30	100,0

Le résultat obtenu après une durée de chauffage de 8 heures représente 100% car une expérience préliminaire où nous avons prolongé la durée de l'attaque jusqu'à 36 heures après la décoloration ne nous a pas fourni des chiffres plus élevés.

L'expérience que nous venons de décrire montre qu'il faut encore chauffer longtemps une fois le liquide décoloré. En résumé, la durée de chauffage après décoloration devrait être au moins deux fois plus longue que celle de la décoloration.

II. — Dosage

Le dosage se fait au moyen de l'appareil décrit par PARNAS et WAGNER (1921) (24).

Solutions employées :

1) — HCl 0,01-n fraîchement préparé à partir d'une solution 0,1-n, avec de l'eau distillée bouillie.

2) — NaOH 0,01-n fraîchement préparée à partir d'une solution 0,1-n avec de l'eau distillée bouillie.

3) — KOH 30% contenant 5% de thiosulfate qui a pour but de détruire les combinaisons éventuelles entre l'ammonium et le mercure du catalyseur.

4) — Liquide à doser transvasé après l'attaque dans une fiole jaugée de 25 cc et complétée jusqu'au trait de jauge par de l'eau distillée. Les dosages se font sur 5 cc de cette liqueur.

5) — Indicateur rouge de méthyle en solution saturée dans NaOH 0,1-n.

Technique :

Dans le vase à distiller de l'appareil de micro-Kjeldahl, on introduit les 5 cc de prise d'essai, on ajoute 15 cc de KOH et on entraîne l'ammoniaque libérée par de la vapeur d'eau. On reçoit le distillat dans 10 cc de HCl 0,01-n contenant une micro-goutte d'indicateur.

On laisse distiller pendant six minutes au total, puis on retire la solution acide que l'on fait bouillir pour éloigner le gaz carbonique qui fausse l'exactitude du virage de l'indicateur. On titre immédiatement, à chaud, la solution d'acide par de la soude 0,01-n.

Le pourcentage d'azote obtenu, on peut calculer la teneur en protides de la substance en supposant que les protides contiennent 16% d'azote.

MÉTABOLISME EXOGÈNE

1. Étude de la croissance de la levure en présence et en absence de vitamine B₁

Pour connaître l'effet de la vitamine B₁ sur la croissance de la levure, nous avons déterminé son poids sec pendant un certain temps de culture. Nous avons préparé pour cette expérience un lot de flacons cylindriques de 100 cc contenant chacun 75 cc de liquide nutritif. Une partie des flacons contenait de la vitamine, l'autre en était exempte. Nous avonsensemencé chacun des milieux de culture avec une très petite quantité de levures, rigoureusement égales¹. Cette expérience a duré 18 jours, mais seuls les résultats obtenus jusqu'au 11^{me} jour valent la peine d'être relatés. Voici pourquoi, à ce moment, le glucose est totalement consommé, la levure ne se développe plus en surface, elle commence sa vie en anaréobiose et comme l'a déjà montré Duclaux elle n'augmente presque plus de poids et présente même certaines irrégularités. C'est pourquoi, nous ne tenons pas compte des résultats obtenus après 11 jours de culture.

I. — Étude de la croissance en fonction du temps.

Nos résultats sont consignés dans le tableau et le graphique suivants :

¹ Pour les conditions de culture et la signification de l'inoculation voir : partie analytique, chap. I.