

Notes de

PÈRE BELVAL -

I. D. E. R. T. - Bondy

Laboratoire

PHYSIOLOGIE VÉGÉTALE

(revus par Helle Chollety en 1957)

- SUCRES CHEZ LES VEGETAUX -

- MANUEL TECHNIQUE -

- Paris, ORSTOM, 1957 -

RECHERCHE, DOSAGE, EXTRACTION

des HOLOSIDES.

I. Recherches et dosage/

1°/ Fixation des organes -

a/ Aussitôt après la récolte, nettoyer, peser et projeter dans l'alcool bouillant. Maintenir l'ébullition environ une demi-heure, dans ballon muni d'un réfrigérant ascendant. Employer de l'alcool fort, à cause de l'eau contenue dans les tissus. Conserver en flacon jusqu'au moment de l'analyse, après avoir noté : nature des organes ; poids fixé ; date de la récolte.

b/ Prélever 5 gr. du matériel sec pour la recherche du poids frais.

2°/ Epuisement des organes -

Décanter l'alcool de fixation ; broyer le plus finement possible ; épuiser à deux reprises, avec de l'alcool neuf chaque fois et en essorant bien. Employer de l'alcool à 80° - 85° et maintenir l'ébullition environ 20 minutes chaque fois. Réunir tous les alcools. Conserver les tissus épuisés, qui contiennent l'amidon et les principes insolubles dans l'alcool.

Dans certains cas, il est préférable de ne pas broyer trop finement, de manière à diminuer l'entraînement d'impuretés qui pourraient par la suite gêner l'extraction.

En principe : broyer quand on a en vue seulement l'analyse ; ne pas broyer quand on veut ensuite extraire les sucres.

Donc : traitement de l'extrait alcoolique ; traitement des tissus épuisés.

3°/ Traitement de l'extrait alcoolique -

Cet extrait contient tous les holosides (amidon excepté) et souvent aussi des hétérosides.

A. Distiller l'alcool sous pression réduite, sans dépasser 50°. Pratiquement il faut pouvoir tenir la main sur le ballon sans éprouver de sensation de brûlure et on estime que la distillation est terminée quand apparaissent des gouttelettes de vapeur d'eau sur le col du ballon. Si le milieu est acide, ce qui est fréquent, il est

bon d'ajouter une pincée CO_3Ca précipité pour éviter l'hydrolyse. Le résidu aqueux de la distillation est versé dans un verre et on y ajoute les eaux de lavage du ballon.

B. Déféquer la solution aqueuse. Y verser goutte à goutte et en agitant, de l'extrait de Saturne (sous-acétate de plomb). Quand le précipité qui se produit tombe bien et que la liqueur qui surnage est limpide, la défécation est terminée. Vérifier qu'une goutte d'extrait de Saturne ajoutée ne provoque plus aucune précipitation. Ceci est important car dans certains cas on a une bonne floculation et un milieu limpide bien que la défécation ne soit que partielle. Filtrer et laver le précipité qui retient toujours des sucres : le mieux est de le remettre en suspension dans de l'eau tiède et de l'essorer à la trompe. Réunir tous les filtrats. Ajouter goutte à goutte une solution saturée de CO_3Na_2 , en présence de phtaléine ; l'excès de plomb est ainsi éliminé sous forme de CO_3Pb .

L'élimination du Pb en CO_3Pb n'est possible que dans les solutions devant servir uniquement aux dosages. Si on doit ensuite extraire les sucres, éliminer le Pb en SO_4Pb ou SPb .

Pour la précipitation du Pb en SO_4Pb , prendre SO_4H_2 au 1/5 ou au 1/10. Introduire doucement en suivant le pH. Il faut toujours demeurer en pH alcalin. Ainsi le SO_4Pb est presque parfaitement insoluble et on peut l'éliminer sans descendre trop le pH de la solution (vers 4-4,5). Si on veut aller trop vite, on se met en pH franchement acide, ce qui rend le SO_4Pb moins insoluble, et il faut descendre plus bas le pH du milieu pour éliminer tout le Pb : d'où fabrication des sels car, après filtration du SO_4Pb , il faut ramener le pH \neq 7 avec HONH_4 .

Pour la précipitation du Pb en SPb , faire passer un courant de SH_2 (ordinairement quand tout Pb est transformé en SPb , celui-ci précipite bien et se sépare vite au milieu).

Filtrer. (vérifier que tout le Pb a été précipité). Chauffer jusqu'à ébullition pour chasser SH_2 restant (ceci est dangereux car on est en milieu nettement acide). Compléter la précipitation par SO_4H_2 si besoin est, puis ajuster le pH avec HONH_4 .

Filtrer, laver.

La solution qui est rouge, à cause de la phtaléine, est décolorée par 1 ou 2 gouttes d'acide acétique dilué au demi. Noter le volume : il est bon de combiner le poids et le volume pour simplifier les calculs ultérieurs ; par exemple : poids 100 grammes, volume 100 ou 200 cmC.

Remarque : les hétérosides sont généralement entraînés dans le précipité plombique, où on les recherchera s'il en est besoin. Pour cela, mettre le précipité en suspension dans l'eau, le décomposer par SO_4H_2 dilué au dixième, filtrer le SO_4Pb , et sur la liqueur limpide faire agir l'émulsine et les différentes diastases des hétérosides.

On a souvent intérêt à utiliser l'acétate neutre de Pb comme déféquant. Il ne précipite pas les hétérosides, ou même l'acide phosphotungstique qui les précipite partiellement.

C. Procéder aux dosages. Les traitements ci-dessus fournissent une solution limpide, incolore ou plus ou moins jaune, sur laquelle on dose les sucres par voie chimique (Bertrand) et par voie optique. On détermine donc :

- a. Rotation et réduction initiale : α_1 et R₁
- b. Rotation et réduction après action de la sucrase : α_2 et R₂
- c. Rotation et réduction après hydrolyse acide : α_3 et R₃
- d. au besoin, rotation et réduction après action de l'émulsine, en se rappelant que ce ferment agit très lentement : α_4 et R₄.

Sucrase, acide, émulsine sont employés dans la proportion de 1 %. La sucrase est peu active en milieu neutre, et totalement inactive en milieu alcalin ; le pH optimum est voisin de 4,5. L'émulsine agit bien en milieu neutre.

D. Interprétation des résultats. Ces données permettent d'établir la composition glucidique de la liqueur et de se faire une idée de la nature des sucres en présence. On calcule pour cela ; le pouvoir rotatoire global des sucres avant et après hydrolyse totale (par acide) ; et les indices de réduction.

a. Pouvoir rotatoire global

On l'obtient par l'emploi de la formule

$$[\alpha]_D = \frac{100}{l \pi}$$

dans laquelle :

- α : rotation initiale ou finale lue au polarimètre
 π : concentration en sucre (en grammes dans 100 cc). Celle-ci est obtenue par hydrolyse acide.
 l : longueur du tube polarimétrique en décimètres.
 et $[\alpha]_D$: pouvoir rotatoire
 $[\alpha]_D$: pouvoir rotatoire initial du mélange des sucres tels qu'ils existent dans la solution (glucose-fructose-saccharose-etc..)

$[\alpha_3]_D$: pouvoir rotatoire final après hydrolyse acide.

b. Indice de réduction. On le définit : la quantité de réducteur, exprimée en milligrammes de glucose, produite dans 100 cc. de la liqueur, pour un changement de rotation de 60 minutes observé au tube de 2 dm. Les indices de réduction étant des constantes renseignent sur la nature des sucres transformés ; ainsi : l'indice de réduction du saccharose est voisin de 600 (il varie avec la température, puisque le pouvoir rotatoire du fructose et donc sa rotation varie avec la température), celui des fructosides est voisin de 1200. (900 - 1000).

E. Application à deux exemples d'analyses.

- a. Analyse de Rhizomes de Chiendent (facile)
b. Analyse de graines de Soja (difficile)

Rhizomes de Chiendent

Poids : 100 grs. Volume : 200 cc

1. Liqueur primitive :

$$\alpha_1 = 0^{\circ}59' \quad (b=2)$$

$$R_1 = 0,5 \quad \% \text{ cc.}$$

2. Après action de la sucrase :

P = 50 cc. Sucrase : 0,5 cc. Durée : 5 heures.

$$\alpha_2 = - 3^{\circ}31'$$

$$R_2 = 2,00 \% \text{ cc.}$$

D'où $R_2 - R_1 = 1,5 \% \text{ cc}$: saccharose (en sucre interverti)
Indice de réduction : 592

3. Après hydrolyse par l'acide : Bain-Marie bouillant.

P = 50 cc HCl (au demi) : 1 cc. Durée : 15 minutes
Solution neutralisée et ramenée au volume primitif.

$$\alpha_3 = - 5^{\circ}59'$$

$$R_3 = 5,00 \% \text{ cc.}$$

D'où : $R_3 - R_2 = 3 \% \text{ cc}$. sucre hydrolysable (en réducteur).
Indice de réduction : 1200

D'autre part, on a :

Pouvoir rotatoire initial : $(\alpha_1) = -10^\circ$ (avec α_1 et R_3)

Pouvoir rotatoire final : $(\alpha_2) = -60^\circ$ (avec α_3 et R_3)

On peut donc conclure avec certitude qu'il existe, à côté des sucres réducteurs et du saccharose, un glucide lévogyre donnant par hydrolyse une grande quantité de fructose. C'est donc un fructoside qu'il reste à extraire pour en déterminer la nature.

N.B. La sucrase n'est pas toujours sans action sur les fructosides. On s'en aperçoit en calculant les indices de réduction dont les valeurs sont alors nettement supérieures à 600 et inférieures à 1200. Néanmoins, l'hydrolyse de ces fructosides est toujours notablement plus lente que celle du saccharose, en sorte que en 5 heures on n'atteint guère que le saccharose. Mais il est toujours nécessaire de contrôler en suivant une hydrolyse pendant plusieurs jours et en faisant la courbe de l'hydrolyse : on aperçoit alors très distinctement les deux phases.

Contrôle de la teneur en saccharose : $\frac{\alpha_1 - \alpha_2}{1.763}$ à 15°

Graines de Soja

Poids : 100 grs. Volume : 500 cc.

1. Liqueur primitive :

$$\alpha_1 = + 10^\circ 52' \quad (l=2)$$

$$R_1 = 0,5 \% \text{ cc.}$$

2. Après action de la sucrase :

P = 50 cc. Sucrase : 0,5 cc. Durée : 5 heures

$$\alpha_2 = + 8^\circ 20'$$

$$R_2 = 2,00 \% \text{ cc.}$$

D'où : $R_2 - R_1 = 1,5 \% \text{ cc} : \text{saccharose (en sucre interverti),}$

Indice de réduction : 592

Mais, l'action de la sucrase se prolonge pendant plusieurs jours. Quand elle n'agit plus, on a :

$$\alpha_3 = + 5^{\circ}18'$$

$$R_3 = 3,52 \% \text{ cc.}$$

$$\text{D'où : } R_3 - R_2 = 1,52 \% \text{ cc.}$$

Indice de réduction : 500

3. Après hydrolyse par l'acide

Après essais préliminaires, on constate qu'il faut plusieurs heures au Bain-Marie, ou une demi-heure à l'autoclave à 120° , avec HCl dans la proportion de 2 %. On a alors :

$$\alpha_4 = + 1^{\circ}20'$$

$$R_4 = 5,20 \% \text{ cc.}$$

$$\text{D'où : } R_4 - R_2 = 3,20 \% \text{ cc. sucre hydrolysable}$$

Indice entre les résultats obtenus après action totale de la sucrase et action de l'acide : 423

D'autre part, on a :

$$\text{Pouvoir rotatoire initial : } (\alpha_1) = + 104^{\circ} \text{ (avec } \alpha_1 \text{ et } R_4)$$

$$\text{Pouvoir rotatoire final : } (\alpha_2) = + 12^{\circ} \text{ (avec } \alpha_4 \text{ et } R_4)$$

On peut donc conclure à la présence d'un sucre fortement dextrogyre, subissant sous l'action de la sucrase une hydrolyse partielle, et possédant un pouvoir rotatoire supérieur à $\longrightarrow + 104^{\circ}$. Le stachyose ou le raffinose répondent à ces conditions. Il reste à isoler le sucre pour identifier le stachyose.

La sucrase n'agit pas que sur le saccharose. Elle agit sur toute liaison fructofuranose/glucose en décrochant le fructose. C'est ainsi qu'elle hydrolyse partiellement le raffinose et le stachyose. Les résultats inscrits pour l'hydrolyse acide sont théoriques. En effet, on ne peut agir ainsi, car il y a toujours dans ces conditions destruction de fructose.

En fait, après la sucrase contenue dans l'autolysat septique de levure de Boulangerie, il faut faire agir l' α galactosidase contenu dans un autolysat antiseptique de levure basse (levure de Brasserie). Cette α galactosidase achève l'hydrolyse du raffinose et du stachyose. Son action est assez lente (ordinairement deux jours).

Dans l'émulsine, c'est la β galactosidase ou lactase qui existe en petite quantité à côté de la β glucosidase .

4. Traitement des tissus épuisés par l'alcool. - Ils peuvent renfermer de l'amidon, des hétérosides, des gommes, mucilages, etc... Toutefois on n'y peut doser avec exactitude que l'amidon qui seul est absolument insoluble dans l'alcool.

Dosage de l'amidon. Après les épuisements alcooliques, traiter les tissus par l'eau bouillante pour transformer l'amidon en empois. Après refroidissement, ajouter une diastase (poudre de Mucor, taka-diastase, poudre de pancréas) et laisser agir à l'étuve à 35° jusqu'à ce que la réaction à l'acide soit négative. A ce moment, l'amidon est complètement solubilisé. Eliminer la pulpe par filtration, laver et déféquer : gommes, mucilage et matières azotées sont ainsi éliminées. On peut achever alors l'hydrolyse par l'acide (autoclave à 120°, une demi-heure, acide : 2 %). Neutraliser et doser par réduction et au polarimètre. On doit trouver le pouvoir rotatoire du glucose.

Cette méthode est la plus sûre.

II. Extraction.

Il n'existe aucune méthode générale. On se rappellera pourtant que jusqu'aux tétraholosides inclusivement on peut obtenir des produits cristallisés ; au delà, on n'obtient que des produits amorphes.

1°- Sucres cristallisables. En principe, il faut se débarrasser des réducteurs et du saccharose par fermentation en utilisant une race de levure qui ne touche pas au sucre cherché. Cette fermentation étant inutile si le réducteur et le saccharose sont en petite quantité par rapport au sucre à obtenir. Déféquer ensuite et éliminer le plomb en excès, soit par H^2S , soit aussi bien par SO_4H^2 , afin d'éviter d'introduire dans la liqueur des sels solubles. Concentrer à sirop. Si le sirop ne cristallise pas, épuiser par l'alcool en essayant différents titres.

2°- Fructosides. Epuiser la plante par l'eau ou l'alcool, selon les cas. Déféquer et éliminer le plomb par H^2S ou SO_4H^2 . Sans même filtrer le sulfate de plomb, si on a employé SO_4H^2 , ajouter de la baryte (environ le poids de fructoside, en solution saturée à chaud) ; la baryte se combine avec les glucides pour former des complexes, d'autant plus solubles, en général, que la molécule du glucide est plus petite. Parfois, le complexe barytique de fructoside est insoluble dans l'eau et se dépose immédiatement : on décante, lave à l'eau. D'autres fois, il demeure en solution ; il faut alors le précipiter par l'alcool ; dans ce cas, ne pas chercher une précipitation totale, mais fractionner : les premières fractions contiennent surtout le fructoside, les dernières fractions peuvent renfermer du saccharose et même des sucres réducteurs. De plus, les diverses fractions peuvent contenir divers fructosides. Quoi qu'il en soit, tous ces complexes sont lavés à l'alcool faible.

Les complexes, insolubles ou solubles, bien lavés, sont remis en suspension dans l'eau, puis décomposés soit par CO_2 d'abord, puis par SO_4H^2 , soit directement par SO_4H^2 , jusqu'au virage de l'hélianthine. Filtrer les sels de baryum ; neutraliser par NH_3 , en présence de bleu de bromo-thymol et concentrer à sirop épais à douce température. Précipiter ce sirop par l'alcool fort et sécher dans le vide sulfurique.

Parfois, le fructoside étant peu soluble dans l'alcool, on peut additionner d'alcool la solution encore peu concentrée et obtenir le produit sous forme de poudre. On en juge d'après un essai.

3°- Gommes, mucilages, etc... Traiter des tissus bien secs par l'alcool fort, pour les désucrer. Les sucres solubles enlevés, épuiser par l'eau. Concentrer et précipiter par l'alcool fort : on obtient

ainsi un produit brut très impur, riche en sels divers et en azote. On peut éliminer les sels par diffusion à travers des sacs de collodion ; pour les autres impuretés, l'azote en particulier, il faut opérer par dissolution et précipitation successives, en milieu légèrement acide. Il faut toujours se résigner à des pertes importantes.

III. Défécation.

Le défécant classique est le sous-acétate de plomb. Il n'est pas toujours utile ; souvent aussi il est insuffisant.

1°- Acétate neutre de plomb. Défèque moins bien que le sous-acétate de plomb et introduit dans la liqueur des sels de soude. Ne peut donc pas être employé si on veut préparer un produit pur, mais convient bien dans le cas de solutions renfermant des hétérosides. Les solutions après son action restent le plus souvent colorées, mais les hétérosidés ne sont pas éliminés.

2°- Sulfate Hg.

A. Préparation. Faire dissoudre au bain-marie 350 grs de sulfate de mercure dans 120 cc. SO_4H_2 concentré et 750 cc. d'eau. Compléter à 1000 cc.

B. Emploi. Verser goutte à goutte jusqu'à ce que le précipité tombe bien. Neutraliser par de la lessive de soude, en présence de phtaléine et décolorer par l'acide acétique. Filtrer et laver le précipité. Au filtrat limpide ajouter une pincée de Zn en poudre pour éliminer toute trace de mercure. Agiter et laisser en contact 10 à 15 minutes. On reconnaît que tout le mercure est éliminé quand une goutte de la liqueur déposée sur une lame de cuivre rouge fraîchement décapée ne laisse pas de taches grisâtres. Filtrer. La liqueur est prête pour tous les dosages.

3°- Acide phosphotungstique. Défèque encore plus à fond que le sulfate mercurique. Ne laisse pas de sels et permet d'essayer la cristallisation de produits purs.

A. Préparation. Dissoudre 10 grs d'acide phosphotungstique pur dans 100 cc d'eau additionnés de 5 grs de SO_4H_2 concentré (soit 2,9 cc. d'acide à $d = 1,83$).

B. Emploi. Ajouter le réactif goutte à goutte jusqu'à ce que le précipité se dépose bien et que la liqueur qui surnage soit très limpide et même incolore. Filtrer et laver le précipité. Eliminer l'excès de réactif par la baryte saturée à froid et pousser jusqu'à réaction franchement alcaline. Filtrer le précipité jaunâtre. Revenir à neutralité par SO_4H_2 dilué, jusqu'au virage de l'hélianthine ; puis neutraliser par CO_3Ba , ou par NH_3 . Parfois le précipité de tungstate de Ba ne se forme que lentement et il faut souvent un grand excès de baryte. Il est important d'éliminer tout le tungstène ; sa présence se décèle par la réaction suivante : à 0,5 cc de la liqueur, ajouter un petit fragment de Zn et une goutte d'acide fort ; s'il y a encore du tungstène, l'hydrogène, naissant développe une coloration bleue.

IV. Préparation des diastases usuelles.

I. SUCRASE.

A. Procédé Bourquelot.- Delayer 100 grs de levure dans de l'alcool à 95° (opérer dans un grand mortier) ; verser dans un flacon et laisser en contact 24 heures avec 1000 cc d'alcool à 95°. Décanter, essorer à la trompe, laver sur le filtre, d'abord avec de l'alcool, puis avec de l'éther. Dessécher dans le vide sulfurique. On obtient ainsi une poudre très légère, que l'on conserve à l'abri de la lumière.

Pour l'emploi, on peut en faire un macéré : laisser en contact sous toluène 20 grs de poudre avec 100 cc d'eau ; filtrer et conserver la liqueur additionnée de toluène. On peut utiliser directement la poudre a raison de 0,5 gr pour 100 ; l'avantage en ce cas est qu'on ne dilue pas les solutions à analyser.

Cette préparation est la plus pure en sucrase ; elle est en général moins active que les préparations suivantes.

B. Procédé Colin.- Abandonner à la putréfaction 25 grs de levure dans 150 cc d'eau. Arrêter avant que le milieu ne soit devenu alcalin au tournesol ; Si on avait trop tardé, il suffit de rendre le milieu acide par quelques gouttes d'acide acétique. Filtrer, ce qui est toujours très long. Dэфéquer légèrement par acétate neutre, ou avec précaution par sous-acétate : en fait il suffit d'obtenir une solution limpide. Conserver la liqueur sous toluène.

On peut employer la levure de brasserie ou la levure de boulangerie ; à poids égal, la première fournit des préparations plus actives, mais plus colorées.

Ces préparations renferment peu de diastases autres que la sucrase surtout si elles sont vieilles ; elles conviennent donc au dosage du saccharose en milieu glucidique complexe.

C. Autolysats aseptiques.- Mêmes proportions que pour les autolysats putrides, ou bien 1 partie de levure et 1 partie d'eau, mais on évite la putréfaction en ajoutant assez de toluène pour couvrir la liqueur et en agitant fréquemment. Les diastases diffusent dans l'eau ; on filtre, défèque, et conserve sous toluène.

Ces autolysats sont très riches en diastases : sucrase, fructosidase, galactosidase. Ils sont donc moins spécifiques que les précédents.

Les autolysats antiseptiques de levures basses (lev. de brasserie) seuls, possèdent l' α galactosidase. Ils hydrolysent à fond raffinose et stachyose et tous les fructosido-glucosido-galactosides. On ne doit pas les utiliser pour la recherche du saccharose en milieu complexe. Chauffés 24 hrs. à 50°, ces autolysats deviennent inactifs sur les fructosides, mais demeurent actifs sur le saccharose.

Remarques. La sucrase n'agit qu'en milieu acide.

On peut se faire une idée de l'activité d'une préparation diastatique de la façon suivante : faire une solution de saccharose, par exemple 3 % ; ajouter 1 ou 2 cc. de sucrase et lire immédiatement la rotation au polarimètre ; on lit au tube de 2 dm. : + 4° ; l'hydrolyse sera achevée quand la rotation sera - 1° 8'. On note le temps nécessaire pour atteindre ce résultat.

2. EMULSINE.

Se prépare à partir des amandes douces. Il est avantageux, malgré le prix plus élevé, d'acheter les amandes écorcées et de bonne qualité. Traitement pour 1 kg.

Les plonger par fraction de 200 grs pendant une minute dans de l'eau bouillante ; essorer et tremper dans l'eau froide ; la pellicule se détache alors très facilement. Broyer finement et mettre à macérer dans de l'eau chloroformée : 2 litres additionnées de quelques gouttes de chloroforme, pendant 48 heures. Egoutter sur linge assez serré : on obtient un liquide blanc laiteux. Précipiter la caséine par l'acide acétique cristallisable : la quantité à verser est variable, en général, il faut 8 à 10 cc pour 1 kg d'amandes ayant fourni 1500 cc de liqueur. Laisser reposer quelques heures, puis décanté sur filtre mouillé. Précipiter le filtrat par 3 volumes d'alcool à 95° ; laisser reposer 12 heures ; décanté l'alcool et filtrer sur Buchner. Laver à l'alcool, puis à l'éther, finalement sécher dans le vide sulfurique.

Le rendement est de 15 grs par kg d'amandes de bonne qualité.
Conserver à l'abri de la lumière.

3° *Aspergillus niger* : cf page 27

4° *Aspergillus oriz* : cf page 29

5° Suc d'Escargot : cf page 29

V. Caractérisation des sucres.

Pour déterminer la nature des glucides présents dans un mélange on utilise : les réactions furfuriques ; l'action de la phénylhydrazine, à froid ou à chaud ; l'oxydation nitrique.

I. Réactions furfuriques.

Sauf indications contraires, on opère avec des produits secs. Il faut donc avant tout concentrer et amener à sec un certain volume de solution, de façon à obtenir, si possible, 2 grs environ de sucre. Quelques milligrammes suffiront pour les réactions furfuriques ; le reste sera utilisé pour les oxydations nitriques.

A. Réaction de Bertrand. Verser dans un tube à essai 2 à 3 cc de HCl concentré, y ajouter quelques milligrammes de sucre et quelques paillettes d'orcine. Chauffer doucement sans dépasser 50°. Il se produit d'abord une teinte jaunâtre, puis apparaît une coloration bleue, rouge ou bleu-rouge. Finalement un précipité se forme. Coloration rouge-orangé, sans mélange de bleu : Hexoses. Coloration violet-bleu : Pentoses.

En cas de doute, faire un témoin avec du glucose pur et comparer les colorations obtenues. En général, la coloration bleue des Pentoses est facilement perceptible, même dans un mélange où dominent les Hexoses.

B. Réaction de Séliwanoff. Basée sur le fait que seuls les sucres cétoniques (le lévulose est le principal) donnent des colorations avec HCl étendu de son volume d'eau. On opère comme ci-dessus, en prenant la résorcine comme phénol. En milieu ClH concentré, les sucres aldéhydiques et les sucres cétoniques réagissent et donnent une coloration rouge avec la résorcine. Il est donc essentiel d'opérer en milieu ClH dilué (1/5).

Coloration rouge : lévulose.

Coloration jaunâtre : pas de lévulose.

Remarque. Non seulement les sucres réducteurs présents dans les liqueurs donnent ces réactions, mais aussi tous les principes hydrolysables formés d'Hexoses et de Pentoses, car dans les conditions de l'expérience il y a toujours hydrolyse.

II. Action de la Phénylhydrazine.

1°- Mode opératoire ordinaire. Mélanger 10 gouttes de phénylhydrazine et 10 gouttes d'acide acétique cristallisable ; verser dans 10 cc de liqueur sucrée contenant environ 1 à 2 % de sucres.

A. Agiter sans chauffer : s'il se forme un dépôt cristallin, en forme de sphéro-cristaux fusibles à 198 - 199° : Mannose.

L'Hydrazone du Mannose est en effet la seule insoluble.

B. Préparer un nouveau tube à essai ; tièdir 2 à 3 minutes au bain-marie ; il se produit généralement un trouble dû aux impuretés du réactif ; filtrer de façon à obtenir une liqueur jaune limpide, puis maintenir une demi-heure au bain-marie bouillant. Filtrer la liqueur immédiatement :

a. sur le filtre : osazones des hexoses à peu près insolubles à chaud : glucosazone et galactosazone.

b. dans la liqueur : osazones des pentoses très solubles à chaud et qui cristallisent par refroidissement : ainsi que les osazones des polysaccharides réducteurs : arabinosazone, xylosazone, maltosazone, lactosazone, accompagnées toujours de glucosazone ordinairement cristallisée en petits oursins.

Remarque. On n'obtient d'osazones caractéristiques que si la solution sucrée est suffisamment concentrée. Sinon, toutes les osazones se présentent sous forme de petits sphérules jaunes à peu près tous semblables. Dans ce cas les redissoudre dans l'eau et tenter une nouvelle séparation.

2°- Autre mode opératoire. Dans un mélange contenant des réducteurs du saccharose et divers sucres hydrolysables, si l'on veut éviter l'hydrolyse et donc la production d'une grande quantité de glucosazone (ce qui se produirait toujours avec le réactif précédent), on utilise le chlorhydrate de phénylhydrazine. Préparer la solution suivante :

chlorhydrate de phénylhydrazine : 3 grs.
acétate de sodium : 4 grs.
eau, qs. pour 30 cc.

et l'employer à raison de 3 cc pour 0,1 gr. de sucre. Chauffer une heure au bain-marie bouillant. Dans ces conditions, on n'obtient que les osazones des sucres réducteurs : Pentoses, Hexoses, Maltose, Lactose.

3°- Caractéristiques des osazones.

A. Osazones peu solubles dans l'eau bouillante et l'alcool méthylique :

- a. Glucosazone : cristaux groupés en pinceaux ; F. 230 - 232°
- b. Galactosazone : lamelles étroites, libres ou groupées ; F. 214°

B. Osazones solubles dans l'eau bouillante et dans l'alcool méthylique.

- a. Arabinosazone : fins et longs filaments courbés et enchevêtrés, tout au moins pour le produit pur ; F. 143°
- b. Xylosazone : longues aiguilles droites ; F. 166°
- c. Maltosazone : larges tablettes ; F. 206°
- d. Lactosazone : aiguilles groupées autour d'un centre ; F. 200°

Les points de fusion indiqués ont été pris au bloc Maquenne. Ils ne valent que pour des produits très purs.

III. Oxydation nitrique.

Il n'est pas toujours facile d'arriver à une certitude par le seul examen des osazones, surtout si le milieu est complexe.

L'oxydation nitrique fournit un supplément d'information.

Chauffer avec de l'acide nitrique dilué, les sucres aldéhydiques s'oxydent aux deux extrémités de la chaîne en donnant des acides bibasiques : le glucose, de l'acide saccharique ; le mannose, de l'acide mannosaccharique ; le galactose, de l'acide mucique.

Le mannose étant suffisamment bien caractérisé par son hydrazone, il reste à caractériser le glucose et le galactose.

1°- Recherche du galactose : Acide mucique.

Il faut environ 2 grs de sucre. Placer dans une capsule 2 grs de sucre et 10 cc d'acide nitrique de densité 1,2 (2 parties d'acide à 36° B, et 1 partie d'eau, en poids) ; chauffer doucement jusqu'à dégagement de vapeurs rutilantes. Retirer du feu pour laisser la réaction se calmer, puis évaporer pour chasser l'excès d'acide : on s'arrête quand le poids du résidu est environ le double du poids du sucre initial. Reprendre alors par 4 - 5 cc d'eau, verser dans un verre, laver la capsule et amener à 10 cc environ. L'acide mucique insoluble se dépose rapidement sous forme de petits prismes courts.

Il se forme toujours dans ces conditions de l'acide oxalique et si le milieu renferme du calcium, il se produit de l'oxalate de calcium, lui aussi insoluble dans l'eau. On contrôle en essayant la solubilité dans l'ammoniaque : l'oxalate est insoluble ; l'acide mucique se dissout en totalité.

Toute substance s'hydrolysant en libérant du galactose fournit de l'acide mucique par oxydation nitrique : lactose, raffinose, stachyose, certaines gommes et mucilages.

2°- Recherche du glucose : Saccharate acide de K.

Opérer comme ci-dessus. Après avoir repris par l'eau, saturer à chaud par du carbonate de potassium sec et pulvérisé ; verser dans un verre et ajouter 3 à 4 cc d'acide acétique cristallisable : Par refroidissement et agitation, il se forme un dépôt cristallin de saccharate acide de K. très peu soluble, se présentant sous forme d'aiguilles transparentes et pointues, libres ou groupées en rosaces.

Résumé.

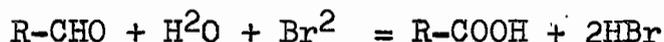
- 1° Orcine + HCl concentré :
Coloration bleue : Pentoses
Coloration rouge : Hexoses.
- 2° Résorcine + HCl à 50 % :
Coloration rouge : Levulose
Coloration jaune : Pas de lévulose.
- 3° Phénylhydrazine et oxydation nitrique :
 - A. Osazones solubles à chaud :
 - a. Pentosazones : dans ce cas, réaction à l'orcine positive.
 - b. Maltosazone : très caractéristique.
 - c. Lactosazone : par oxydation nitrique, acide mucique.
 - B. Osazones insolubles à chaud :
 - a. Galactosazone : par oxydation nitrique, acide mucique.
 - b. Glucosazone : peut provenir du glucose, lévulose, mannose.
Glucose : oxydation nitrique : saccharate acide de K.
Levulose : Résorcine + HCl à 50 % : positive.
Mannose : mannosehydrazone.

Dosage du glucose dans un mélange de glucose et Fructose.

Trois méthodes : Oxydation par le brome en milieu neutre.
 Oxydation par l'iode en milieu alcalin.
 Dosage électif du fructose par liqueur d'Ost.

1. Oxydation par le brome en milieu neutre.

En présence de brome, les sucres aldéhydiques sont transformés en acides monobasiques.



Dans les mêmes conditions, les fonctions cétoniques ne sont pas touchées. Il est donc possible de doser le glucose dans un mélange de glucose et de fructose.

Mode opératoire.

1°- Doser la solution sucrée, exactement neutralisée, par la méthode de Bertrand. On a le sucre total, soit R_1 .

2°- Prélever le même volume que pour le Bertrand ; ajouter quelques gouttes de brome et agiter jusqu'à dissolution complète : la solution doit être franchement jaune. En général, après 48 heures, la réaction est terminée. Chasser le brome en excès en portant à ébullition jusqu'à décoloration. Doser par la méthode de Bertrand : le glucose étant disparu, on ne dose ainsi que le fructose, soit R_2 .

La différence $R_1 - R_2 = \text{glucose}$

Si l'on dispose d'une quantité de solution suffisante, il est bon de préparer plusieurs prises d'essai ; on les dose à 24 heures d'intervalle et s'assure ainsi que l'oxydation est terminée. Ou bien, on prend 20 cc de solution qu'on additionne de brome et on dose de 24 heures en 24 heures sur une portion aliquote.

Bien entendu, au terme de l'oxydation, les liqueurs sont devenues très acides ; impossible donc de faire ce dosage en présence de sucres hydrolysables ; ceux-ci seraient transformés quand on chauffe pour chasser le brome.

Etant donné les erreurs possibles dans les dosages par la méthode de Bertrand, il ne paraît pas possible de donner avec exactitude une proportion de glucose inférieure à 4 - 5 % dans un mélange.

II. Oxydation par l'iode en milieu alcalin.

La méthode est délicate et exige des solutions sucrées très pures, aussi bien déféquées que possible, car l'iode se fixe sur nombre d'impuretés, et exactement neutralisées, car l'alcalinité a ici une grande importance.

1° Solutions nécessaires.

- A. Solution d'iode N/10.
- B. Solution d'hyposulfite de sodium N/100
- C. Liqueur alcaline
- D. Empois d'amidon, comme indicateur.

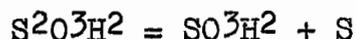
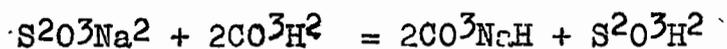
A. Solution d'iode.- Dissoudre 25 grs de KI dans environ 30 cc d'eau ; y ajouter 13 grs d'iode rapidement pesés au trébuchet ; après dissolution, qui est très rapide, étendre à 1000 cc. Théoriquement, la solution N/10 d'iode doit contenir 12,7 grs pour 1000, mais comme il est impossible de peser exactement l'iode très volatil, on fait la solution à peu près N/10 et on la titre par l'hyposulfite.

B. Solution d'hyposulfite de sodium.- Dans les cas qui nous occupent les dosages se font avec des solutions N/100, ou voisines de ce titre. Mais ces solutions se conservent mal. Mieux vaut donc faire une solution N/10, qui sera étendue à N/100 au moment de l'emploi.

La formule de réaction de l'hyposulfite sur l'iode étant :



il s'ensuit que I d'iode correspond à I d'hyposulfite. Le poids moléculaire de l'hyposulfite étant 248,22, la solution N/10 aura pour titre 24,83 g. pour 1000. En pratique, on pèse 25 grs de sel, on dissout et étend à 1000. Cette solution s'altère au début par suite du CO² contenu dans l'eau :



mais quand celui-ci est neutralisé, après 8 à 15 jours, la solution se conserve parfaitement.

C. Liquueur alcaline. - On la prépare au moment des essais en mélangeant volume à volume : une solution de soude N/10 (4 p. 1000) et une solution de phosphate de sodium bibasique N/5 (71,6 p. 1000 avec le sel hydraté $\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}_2\text{O}$). Ce mélange fournit une solution équimoléculaire de $\text{PO}_4\text{Na}_3 + \text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}$.

D. Empois. - Broyer 0,5 grs d'amidon dans un peu d'eau ; verser cette bouillie lentement et en agitant dans 100 cc d'eau à l'ébullition et maintenir l'ébullition quelques minutes. Laisser refroidir et filtrer.

Il est important d'utiliser la même quantité d'empois dans toutes les opérations et de ne l'ajouter que lorsque l'iode est presque décoloré.

2° Dosage des solutions.

A. Titration en iode de la solution d'hyposulfite. Dans une solution de KI libérer au moyen d'un oxydant une certaine quantité d'iode ; la formule :



permet, connaissant le poids d'oxygène, de calculer le poids d'iode libéré. On verse alors la solution d'hyposulfite jusqu'à décoloration, en présence d'empois : n cc d'hyposulfite = p d'iode.

En pratique, utiliser comme oxydant la solution de MnO_4K à 5 p. 1000 qui sert pour le dosage des sucres ; 1 cc. de cette liqueur fournit 1,257 mgr d'oxygène.

Faire une solution de KI à 1 % environ (elle contient 765 mgrs d'iode) et acidifier par quelques gouttes de SO_4H_2 1/2.

Prélever 20 cc., y verser 5 cc de MnO_4K , soit $1,257 \times 5 = 6,285$ mgrs d'oxygène qui libèrent 99,774 mgrs d'iode.

Faire couler l'hyposulfite à titrer sur cette liqueur. Noter le volume versé. Faire un second, puis un troisième essai et prendre la moyenne. Soit : 9,5 cc. Le titre de l'hyposulfite en iode est :

$$1 \text{ cc.} = \frac{99,774}{9,5} = 10,50 \text{ mgrs d'iode}$$

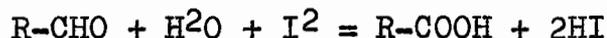
Pour les dosages de glucose, on prendra 10 cc de cette liqueur et on l'étendra à 100.

B. Titration de la solution d'iode. - Se fait avec l'hyposulfite (N/10) titré en iode. Prélever 10 cc de la solution d'iode, verser l'hyposulfite jusqu'à décoloration en présence d'empois. Répéter 3 fois la même opération et prendre la moyenne. Soit 11 cc d'hyposulfite versés. Ces 11 cc. = $10,5 \times 11 = 115,5$ mgrs d'iode. Ces 115,5 mgrs d'iode étant contenus dans 10 cc de la solution d'iode, 1 cc de cette solution renferme 11,55 mgrs d'iode.

Les solutions d'iode se modifient vite, l'iode étant très volatil. Il faudrait donc titrer la solution chaque fois qu'on procède à des dosages. En fait, ce n'est pas nécessaire si l'on opère comme il sera indiqué plus loin.

3° Dosage du glucose.

Plus exactement, des sucres aldéhydiques. Ceux-ci sont oxydés par l'iode en milieu faiblement alcalin et transformés en acides monobasiques selon l'équation :



Une certaine proportion d'iode se transforme en acide iodhydrique. Si l'on connaît le poids d'iode fourni au milieu (I_1), le poids d'iode restant au terme de l'oxydation (I_2), la différence $I_1 - I_2$ donne le poids d'iode qui a disparu par suite de l'oxydation. Or, la formule montre que 127×2 d'iode oxydent 180 de sucre, ou plus simplement que 127 d'iode oxydent 90 de sucre.

En pratique il faut observer les proportions suivantes :

a. le poids de sucre (aldéhydique) ne doit pas dépasser 100 mgrs
 b. le poids d'iode au début doit être sensiblement le triple de la quantité théoriquement nécessaire. Cela pour être sûr qu'il y en a une quantité suffisante pour l'oxydation, une bonne partie étant perdue sous forme d'iodate.

c. Le volume du mélange alcalin doit être le double de celui de solution d'iode employée.

On laisse agir pendant 20 minutes. On prélève pour le dosage de l'iode résiduel 10 cc ; on acidifie par quelques gouttes de HCl, pour libérer l'iode combiné sous forme d'iodate. Finalement, on dose par l'hyposulfite amené sensiblement à N/100.

EXEMPLES.1° Dosage d'une solution de glucose pur.

Solution de glucose à 0,9 %

Titre de l'hyposulfite : 1 cc = 1,27 mgr d'iode (N/100)

Titre de la solution d'iode : 1 cc = 12,7 mgrs d'iode (N/10)

On prépare le mélange suivant, dans l'ordre indiqué :

Solution de glucose : 10 cc = 90 mgrs
 Solution d'iode : 30 cc = 381 mgrs (quantité théorique 127)
 Mélange alcalin : 60 cc

On dose l'iode résiduel de 5 en 5 minutes, sur des prises d'essai de 10 cc. Chaque prise d'essai contient donc à l'origine : 9 mgrs d'iode. Le volume d'hyposulfite versé et les calculs sont inscrits dans le tableau suivant :

	$S^{2}O_3^{2-}Na^2$ versé	Iode correspondant	Iode utilisé	Glucose correspondant
:5 minutes	:20, 7 cc	: 26, 29 mgrs	:11, 81 mgrs	: 8,35 mgrs
:10 "	:20, 4 "	: 25, 90 "	:12, 20 "	: 8,61 "
:15 "	:20, 2 "	: 25, 65 "	:12, 45 "	: 8,80 "

Iode correspondant est donné par $1,27 \times n$ cc. hyposulfite.Iode utilisé est donné par : $38,1 - \text{Iode correspondant}$.Glucose correspondant est donné par : $\text{Iode utilisé} \times 90/127$ 2° Dosage du glucose en présence du fructose.

C'est le cas le plus délicat et celui que l'on rencontre le plus souvent, en particulier dans l'étude des fructosides. Il convient d'opérer par comparaison : sur un témoin sans sucre, sur du fructose pur, sur un mélange de glucose et fructose connu, enfin sur la liqueur à analyser.

La solution à titrer exactement est l'hyposulfite.

Soit les solutions suivantes :

A. Solutions sucrées.

- Solution d'élymoside, hydrolysée et neutralisée, à 5,8 %
- Solution de fructose à 1,3 %
- Solution de glucose à 1,52 %

B. Solution d'iode de l'ordre de N/10, qui se trouvera titrée au cours de la recherche.

C. Solution d'hyposulfite de l'ordre de N/100 ; ici,
1 cc = 1,331

On prépare les liqueurs suivantes :

	Témoin	Fructose	Mélange G.F.	N° 1	Elymoside N° 2	N° 3
Sol. sucrée:	0	10 cc	(G. 1 cc (F. 10 cc	1 cc	2 cc	5 cc
Iode :	5 cc	5 cc	5 cc	5 cc	5 cc	5 cc
Mél. alcal:	10 cc	10 cc	10 cc	10 cc	10 cc	10 cc

Chaque solution est étendue à 50 cc, et en dose sur 10 cc, après 20 minutes. Bien entendu les liqueurs sont préparées successivement, à 5 - 10 minutes d'intervalle de façon à avoir le temps d'effectuer les dosages.

Les résultats sont groupés dans le tableau suivant :

Sucre dans 10 cc	Hypo. versé	I Corresp. mgrs	I Utilisé mgrs	Glucose corresp.	Glucose %
Témoin : eau	11,7	15,56			
F. : 26mgrs	11,3	15,03	0,53	0,37	1.42
M { G: 3 "	8.5	11.30	4.26	3.01	10.3
(F: 26 "					
(I: 11,6 mg	11,0	14,63	0,93	0,66	5,68
E { 2: 23,2 "	10,3	13,69	1,87	1,32	5,68
(3: 58 "	8,3	11,03	4,83	3,13	5,53

On conclut de ces résultats que l'élymoside contient dans les produits d'hydrolyse 5 % environ de glucose, ce qui est confirmé par le dosage après oxydation par le brome, par le dosage à la liqueur d'Ost, et ce qui correspond au pouvoir rotatoire obtenu - 84°.

Remarque - On peut notablement abrégé les calculs, comme on le voit par l'exemple suivant :

	Hypo. versé	Iode utilisé, en mgrs	Glucose correspondant
Témoin: eau	11,7		
F. : 26mgrs	11,3	$11,7 - 11,3 = 0,4$; $0,4 \times 1,33 = 0,53$	$0,53 \times 0,7 = 0,37$

III. Dosage électif du fructose ; liqueur d'Ost.

Basé sur ce fait que la liqueur cupro-alcaline d'Ost n'est réduite que par le fructose, si la température ne dépasse pas 50°. L'oxydule de cuivre est filtré et le reste des opérations se fait comme dans la méthode de Bertrand. Pour passer du poids de cuivre au poids de fructose, on utilise une table spéciale.

1° Liqueur d'Ost.

$\text{SO}^4\text{Cu} \cdot 5\text{H}^2\text{O}$	15	grs
CO_3^2K	250	"
CO_3^2KH	100	

Dissoudre à chaud le carbonate dans 700 cc d'eau environ ; y ajouter le bicarbonate par petites fractions ; la dissolution est facile. Dissoudre à part le sulfate de cuivre et verser cette solution dans la solution carbonatée par petites fractions et en agitant. Après refroidissement, compléter à 1000.

2° Technique.

- A. La prise d'essai ne doit pas contenir plus de 55 mgrs de fructose.
- B. Étendre cette prise d'essai à 20 cc et introduire dans 50 cc de la liqueur d'Ost, préalablement chauffés au bain-marie, réglé à 49°, pendant 5 minutes. On opère donc toujours sur 70 cc. Bien mélanger les deux solutions.

C. Placer la fiole contenant les 70 cc au bain-marie réglé à 48,5 - 49° et laisser 2,30 heures. La fiole doit être immergée jusqu'à 3 cm. environ du sommet. Une grande bassine chauffée par une veilleuse avec un thermomètre plongeant jusqu'au niveau du liquide en réaction, convient très bien et se règle facilement.

Dans ces conditions, glucose, galactose, mannose, saccharose, lactose, maltose ne donnent pas d'oxydule de cuivre.

3° Pour calculer le rapport G/F :

- A. Doser la sucre total par méthode de Bertrand.
- B. Doser le fructose par méthode d'Ost.

La différence entre les deux résultats donne le glucose.

Table pour passer du Cuivre au Fructose.

F	Cu : F	Cu : F	Cu : F	Cu : F	Cu :
5	11,5 : 15	44 : 25	76,5 : 35	120 : 45	150
6	15 : 16	47,5 : 26	80 : 36	123,5 : 46	153
7	18 : 17	51 : 27	84 : 37	127 : 47	156
8	21,5 : 18	54 : 28	87,5 : 38	120,5 : 48	159
9	25 : 19	57,5 : 29	91 : 39	134 : 49	162
10	28,5 : 20	61 : 30	95 : 40	137 : 50	164,5
11	32 : 21	64 : 31	99 : 41	140 : 51	167
12	35 : 22	67 : 32	104 : 42	142,5 : 52	169
13	38 : 23	70 : 33	109 : 43	145 : 53	172
14	41 : 24	73 : 34	114,5 : 44	147 : 54	175
	:	:	:	: 55	178
	:	:	:		

Cuivre et fructose en milligrammes.

Caractérisation du Glucose à l'état de Méthylglucoside

sous l'action de l'émulsine.

Cette réaction étant une réaction réversible, l'équilibre dépend des conditions de l'expérience. C'est avec l'alcool méthylique, qui doit être très pur, à 70 % en poids que l'on obtient le meilleur rendement : théoriquement il est de 82,6 %.

A cause des pertes inévitables au cours des nombreuses manipulations la solution doit contenir environ 1 gramme de glucose. C'est dire que dans le cas de fructosides contenant peu de glucose dans les produits d'hydrolyse, il faut en sacrifier de 10 à 15 grs. En traitant 15 grs d'élymoside, à 5 % de glucose, le méthylglucoside a pu être obtenu sans difficulté.

1° Synthèse du méthylglucoside.

A. Peser un poids convenable du produit dans lequel on cherche le glucose. Dissoudre dans 300 cc. d'eau. Ajouter 1 cc. SO_4H_2 concentré (soit 1,8 gr., ce qui fait dans 300 cc une concentration en acide de 0,6 %). Hydrolyser au bain-marie bouillant pendant 15 minutes.

B. Neutraliser exactement ; théoriquement, il faut 1,92 gr de baryte cristallisée. Filtrer.

C. Evaporer à sec, sous pression réduite.

D. Reprendre le résidu par l'alcool à 95° bouillant : 250 cc. Laisser refroidir. Le lendemain, décantier l'alcool et achever la dissolution avec 50 cc d'alcool. Réunir les alcoolset distiller à sec sous pression réduite. Bien entendu, si la solution alcoolique est trouble, ce qui arrive souvent, il faut la filtrer.

E. Dissoudre le résidu dans l'alcool méthylique à 70 % de façon à obtenir 100 cc. Doser le réducteur sur 0,5 cc.

F. Ajouter 1 gr d'émulsine et abandonner à la température du laboratoire en agitant de temps en temps.

G. Après 20 jours : doser le réducteur. S'il y a eu synthèse, on en trouve moins que en E. Laisser encore une huitaine de jours : doser de nouveau, on juge alors si la réaction est terminée.

2° Isolement du méthylglucoside.

A. Filtrer la liqueur, évaporer à sec sous pression réduite et reprendre le résidu par l'eau.

B. Ajouter de la levure de boulangerie (environ 1 gr) pour se débarrasser des sucres réducteurs restants (fructose et reste de glucose). La fermentation terminée, la liqueur ne doit plus être réductrice et la rotation est lévogyre. Filtrer et évaporer à sec sous pression réduite.

C. Reprendre le résidu par un mélange à parties égales d'alcool à 95° et d'éther acétique anhydre, à l'ébullition. Après refroidissement, décanter le liquide et l'additionner de son volume d'éther sulfurique, ce qui amène la formation d'un précipité cristallin.

D. Reprendre ce précipité par l'eau ; filtrer la solution aqueuse et concentrer à sirop. Ce sirop laisse déposer le méthylglucoside bien cristallisé.

E. S'il y en a suffisamment, recueillir ces cristaux, les sécher à l'air et prendre le pouvoir rotatoire : théoriquement, il est égal à $-32^{\circ}28$.

Aspergillus niger.

Les liquides fermentaires et les poudres fermentaires préparées à partir des cultures d'*Aspergillus niger* sont toujours très riches en diastases ; sucrase, glucosidases, fructosidases, tréhalase, etc ... On est donc amené à préparer ces milieux diastasiques.

1° Culture de l'*Aspergillus* sur Raulin.

Le liquide de Raulin a la composition suivante :

Eau : 1500 cc

Sels minéraux		Produits organiques
Nitrate d'ammonium	4,00 grs	Saccharose 70 grs
Phosphate d'ammonium	4,00 "	Acide tartrique 4 "
Carbonate de magnésium	0,40 "	
Carbonate de potassium	0,60 "	
Sulfate d'ammonium	0,25 "	
Sulfate de zinc	0,07 "	
Sulfate de fer	0,07 "	
Silicate de potassium	0,07 "	

On prépare à l'avance la solution de sels minéraux qui se conserve très bien ; on ajoute les produits organiques, dans les proportions voulues, au moment de l'emploi seulement.

Pour avoir une quantité suffisante de mycélium, on opère ainsi :

A. Dissoudre dans 250 cc de la solution saline : 11,66 grs de saccharose et 0,66 grs d'acide tartrique. Verser dans une cuvette à photographie (13 x 18).

B. Ensemencer avec des spores d'*Aspergillus* provenant d'une culture pure. Le mieux est de faire une suspension de spores dans un peu d'eau et de répartir cette suspension dans le milieu de culture.

C. Placer à l'étuve à 30-35° ; couvrir d'une lame de verre pour éviter une trop grande évaporation, en laissant toutefois un petit espace pour faciliter l'aération.

D. En 4-5 jours, on obtient une couche épaisse de mycélium blanc. On arrête à ce moment, avant la sporulation : les produits sont plus actifs qu'avec le mycélium sporulé.

2° Liquide fermentaire.

A. Enlever le liquide nutritif, le remplacer par un volume égal d'eau distillée et abandonner 12 heures à la température du laboratoire. Le but est de laver la face inférieure du mycélium.

B. Enlever cette eau, la remplacer par un volume égal de nouvelle eau et abandonner 2 à 3 jours : les ferments diffusent et on obtient un liquide actif, qui, après filtration, est très limpide.

C. A la solution à traiter, ajouter un volume de liquide fermentaire égal au volume de la solution. Les solutions se trouvant ainsi diluées de moitié, ce peut être un inconvénient ; dans ce cas, il est préférable d'utiliser la poudre fermentaire.

Exemple d'un essai (Neyron)

Solution d'asphodéloside à 9 %	:	20 cc
Liquide fermentaire	:	20 cc

Un dosage rapide montre que l'hydrolyse sera terminée quand la rotation atteindra - 5°46' environ.

Temps	Rotation
0	- 1°38'
5 heures	- 3°10'
24 heures	- 4°46'
3 jours	- 5°42'
4 jours	- 5°40'

L'hydrolyse est donc terminée en 3 jours. La vitesse d'hydrolyse dépend évidemment des substances traitées, ici, il s'agit d'un fructoside facilement hydrolysable.

3° Poudre fermentaire.

Le mycélium lavé, comme il est indiqué ci-dessus, est pulvérisé et haché aussi bien que possible, puis placé dans 4 fois son poids d'alcool à 95°. Après 12 heures, on filtre sur Buchner et sèche. On l'utilise dans la proportion de 1 % environ.

"On obtient de bons résultats en préparant la poudre fermentaire de la façon suivante : le mycélium, soigneusement séché au papier filtre, est trituré dans un mortier avec de l'alcool à 90-95°.

On essore, triture à nouveau avec un peu d'éther qui déplace l'alcool. On sèche sur vide sulfurique. On obtient ainsi une masse dure, cornée, que l'on pulvérise finement". (Féron : thèse).

Aspergillus Orizae.

La culture de cette mucédinée ne réussit pas bien sur Raulin. Le mieux est de cultiver sur milieu de Czapek glucosé.

Formule de Czapek. Préparer les solutions suivantes :

Nitrate de sodium	200 grs p. litre
Phosphate bipotassique	100 " " "
Chlorure de potassium	50 " " "
Sulfate de magnésium	50 " " "

Pour préparer un litre de milieu de Czapek, on mélange 10 cc de chacune des solutions ci-dessus, on ajoute 20 grs de glucose et on étend à 1 litre avec de l'eau distillée.

Au bout de 4 - 5 jours, quand le mycélium commence à sporuler, on décante le liquide de culture et on le remplace par de l'eau.

On opère ensuite comme pour l'*Aspergillus niger*.

Le liquide fermentaire et la poudre fermentaire sont riches en "taka-diaastase" ; ils hydrolysent à fond le raffinose et le mélézitose.

Suc d'Escargot.

1° Obtention (d'après Giaja).

"On découpe avec de forts ciseaux 2 spires et demi de la coquille et on s'arrête à ce niveau en coupant la columelle. L'animal ainsi débarrassé d'une partie de sa coquille est saisi d'une main par son pied et de l'autre par le reste de la coquille ; par une légère traction on détache le muscle columellaire et le tube digestif apparaît sur une partie comprise entre le bulbe buccal et l'hépatopancreas. On le soulève à l'aide d'une sonde cannelée et par une légère traction il se rompt toujours au niveau de l'hépatopancreas. Avec un peu d'adresse on arrive facilement à égoutter le suc digestif dans une éprouvette surmontée d'un entonnoir sans qu'il ne soit souillé par le mucus ou par le sang.

Pour avoir du suc pur, il est nécessaire de laisser les animaux à jeun pendant quelques jours et de les laver tous les jours, pour les débarrasser de leurs excréments dont ils ingèrent de nouveau les particules qui ont résisté à la digestion. Lorsque les Helix sont en hibernation, ils ne contiennent que très peu de suc ; afin d'en augmenter les quantités, nous débarrassons les animaux de l'épiphragme qui ferme leur coquille et nous les plaçons dans une atmosphère humide à la température de 20° environ. Dans ces conditions, les animaux ne tardent pas à se réveiller et à sortir de leur coquille ; ils se mettent aussitôt à sécréter du suc, dont le rendement est ainsi 3-4 fois plus grand que chez les animaux en hibernation".

On obtient un résultat aussi bon en les plongeant dans de l'eau tiède.

Il faut compter une centaine d'escargots pour obtenir 3-4 cc de suc.

Le suc d'Escargot renferme de la β glucosidase (comme l'émulsine).

Il est capable de décrocher une molécule de glucose β , partout où elle se trouve engagée (en particulier dans bon nombre d'hétérosides).

Il renferme aussi une α glucosidase (ou maltase) capable de décrocher le glucose α (en particulier d'hydrolyser le maltose)

décroche le β galactose (en particulier du lactose) β galactosidase (ou lactase) qui

α galactosidase qui décroche l' α galactose (hydrolyse du raffinose-stachyose) etc....

C'est donc un milieu riche en diastases.

Détermination du poids moléculaire.

On détermine facilement le poids moléculaire, ou mieux l'ordre de grandeur du poids moléculaire, par cryoscopie.

1° Principe. L'abaissement du point de congélation d'un liquide dans lequel on dissout une petite quantité de substance non électrolysable est : A) proportionnel à la concentration de cette solution, et B) inversement proportionnel à la masse moléculaire de la substance dissoute.

Soit p le poids de la substance, P le poids du solvant, M la masse moléculaire, on a :

$$\Delta = K \times \frac{p}{P} \times \frac{1}{M}$$

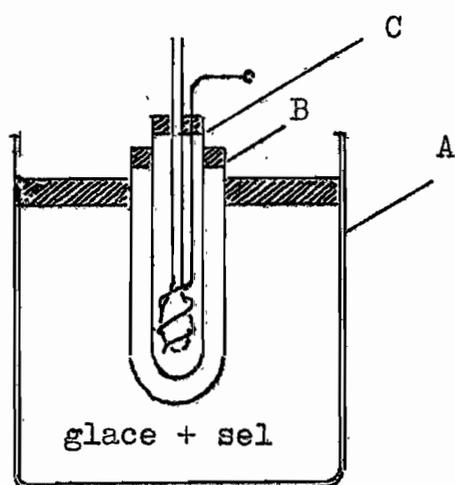
formule dans laquelle K est une constante, qui, pour un même dissolvant, est indépendante du corps dissous. Pour $K = 1850$

En pratique on prend $P = 100$, la formule devient alors :

$$\Delta = 1850 \times \frac{p}{100} \times \frac{1}{M} = 18,50 \times \frac{p}{M}$$

d'où : $M = \frac{18,50 p}{\Delta}$

2° Appareil. On construit facilement soi-même un appareil à cryoscopie. Dans un grand vase en verre (A), fermé par un bouchon de liège, on place un mélange réfrigérant :



glace pilée + sel. On fixe dans le bouchon un tube assez large (B) dans lequel on peut verser un mélange à parties égales de glycérine et d'eau ou de l'alcool ou tout autre liquide incongelable ; on peut aussi le laisser vide. Le but de ce tube est d'assurer un refroidissement plus lent et plus régulier du liquide à congeler. Dans ce tube B, on fixe un tube plus petit (C), tube à essai de 180 x 18 par exemple, destiné à recevoir le liquide à congeler ; on y introduit un thermomètre gradué en $1/50$ de degré au moins ; en vérifiant que le réservoir plonge en entier dans le liquide, puis une tige en fil de fer enroulée en spirale autour du réservoir

du thermomètre ; cette tige servira d'agitateur et assurera l'homogénéité thermique du liquide pendant le refroidissement.

Mélanges réfrigérants : 2 parties de glace + 1 partie de sel produisent un abaissement de température de -20° . Il n'est pas nécessaire de descendre si bas ; on combine donc des mélanges formés de 1 partie de sel + 3, 4, 5 ... parties de glace, en se rappelant que l'abaissement de température est d'autant moindre que la proportion de glace est plus forte.

3° Marche d'une détermination. On commence par déterminer le 0° du thermomètre, on opérant sur de l'eau distillée : soit $+0^{\circ}03$ ($\triangle 0$). On détermine ensuite le point de congélation de la solution à étudier soit $-0^{\circ}26$ ($\triangle 1$). Le point de congélation exact est alors :

$$\triangle 0 \triangle 1 = +0^{\circ}03 + 0^{\circ}26 = 0^{\circ}29$$

Il est très utile, à titre de contrôle, d'opérer sur une solution de saccharose, ou mieux encore sur une solution de glucose.

Pendant le refroidissement, on suit la descente du mercure, tout en agitant fortement le liquide. Par suite de la surfusion, qui se produit toujours, le mercure descend trop bas ; mais dès que la congélation commence, il remonte brusquement, atteint un maximum et y demeure fixe pendant quelque temps. Ce maximum est le point cherché.

Quand on a plusieurs déterminations à faire, il est commode de disposer les solutions dans une série de tubes que l'on place dans un vase contenant de l'eau et de la glace : les solutions étant ainsi dès le début au voisinage de 0° , on gagne beaucoup de temps.

4° Exemple d'une détermination. Recherche du poids moléculaire du fructoside extrait de l'Iris foetidissima, et considéré comme un difructoside.

	: Poids dans :	\triangle	:	\triangle	:	$M = \frac{18,5 \times p}{\triangle}$:
	: 100 grs :	lu	:	exact	:		:
Eau	:	+	$0^{\circ}05$:			:
Glucose	: 6,00	:-	$0^{\circ}63$:	$0^{\circ}68$:163 (théorique :180):	:
Saccharose	: 6,00	:-	$0^{\circ}32$:	$0^{\circ}35$:317 (théorique :342):	:
Fructoside	: 5,46	:-	$0^{\circ}11$:	$0^{\circ}16$:631	:
	:	:		:			:

On en conclut que le fructoside n'est certainement pas un difructoside, mais que selon toute vraisemblance c'est un tétrafructoside, puisque $163 \times 4 = 652$.

Elimination des sels.

La nature et la quantité de sels qu'on peut trouver dans une liqueur ou un produit dépend évidemment de la matière première et du mode de traitement.

Il est possible d'éliminer la totalité ou la presque totalité des sels solubles par diffusion à travers des sacs de celloidine, ou en utilisant les zéolithes.

1° Diffusion à travers les sacs de celloidine.

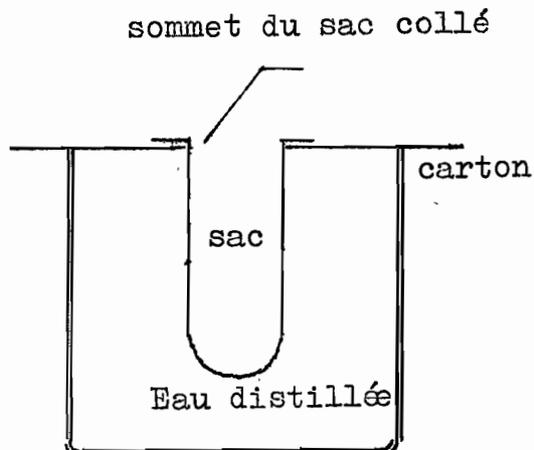
A. Préparer une solution de celloidine dans les proportions suivantes :

Celloidine sèche	10 grs.
Alcool à 95°	24 cc
Ether	48 cc

Cette solution est assez fluide.

B. Dans un tube à fond rond de grandeur convenable (par exemple 10 x 3 cm) verser quelques centimètres cubes de la solution de celloidine et vider aussitôt en faisant couler la solution tout autour des parois du tube. Laisser sécher. Décoller doucement la pellicule ainsi formée en dégageant d'abord le sommet du tube, ce qui se fait très facilement. Le sommet dégagé, tout le reste se détache et se décolle.

Avec un peu de celloidine, coller le sommet du sac ainsi obtenu sur une rondelle de carton percée d'un trou au centre. Vérifier que le sac ne fuit pas. Y verser la solution à purifier et plonger dans un verre contenant de l'eau distillée, que l'on renouvelle toutes les 12 heures, ou même plus souvent. Les sels diffusent dans l'eau ; mais celle-ci pénètre aussi dans le sac diluant la solution et augmentant le volume ; il faut éviter de remplir les sacs.

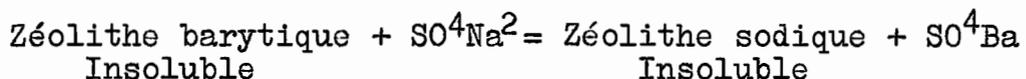
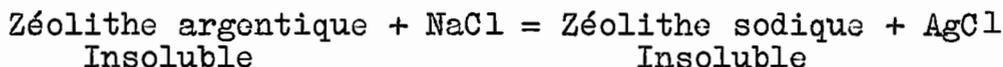


Cette méthode convient très bien pour les produits peu solubles, visqueux et diffusant difficilement, tels que les gommes. Il n'est pas à conseiller,

par contre, pour les substances plus solubles, en raison des pertes importantes impossibles à éviter.

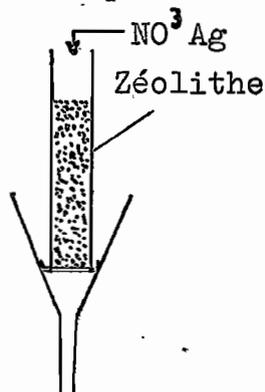
2° Purification au moyen des zéolithes.

Les zéolithes sont des silicates d'aluminium et de métaux alcalins ou alcalino-terreux. On les emploie pour éliminer totalement les chlorures et les sulfates solubles, en engageant anion et cation dans des combinaisons insolubles.



A. Zéolithe argentique.

a. Préparation.— On part de la zéolithe du commerce qui est une zéolithe sodique. On la dispose dans un tube de 15 - 20 mm de diamètre, placé verticalement sur un entonnoir; un peu de papier filtre supporte la colonne de zéolithe. On mouille avec de l'eau distillée et on fait couler très doucement d'abord, une solution de NO_3Ag à 5 %.



La quantité de métal nécessaire pour saturer la zéolithe varie avec l'origine de celle-ci (préparer pour essai 75 grs de zéolithe et 10 grs de NO_3Ag).

On vérifie de temps en temps que la liqueur sortante ne contient plus ou presque plus d'argent. Lorsque la réaction de ce métal devient nettement positive, on lave à fond la zéolithe à l'eau distillée. Enfin, si on ne l'emploie pas de suite, on la met à sécher dans une assiette et on conserve à l'obscurité.

b. Emploi.— Pour l'emploi, on agite fortement la zéolithe au contact de la liqueur à purifier, dans un verre. On filtre sur Buchner et on répète l'opération jusqu'à élimination complète des chlorures. A la fin, on cherche si la solution contient de l'argent en combinaison soluble; si oui, il faut s'en débarrasser surtout si la liqueur renferme des sucres réducteurs.

Lorsque les chlorures sont très abondants, il est presque indispensable d'en éliminer d'abord la plus grande partie par cristallisation dans l'alcool ou en solution aqueuse concentrée. On termine par la zéolithe.

B. Zéolithe plombique.

On la prépare et on l'emploie comme la précédente, mais en remplaçant dans la préparation le NO_3Ag par un sel soluble de Pb. Elle permet d'éliminer les chlorures et revient à moins cher que la zéolithe argentique. Dans le cas où les chlorures très abondants ne peuvent pas être éliminés par cristallisation, on peut commencer à déchlorurer par la zéolithe plombique et on termine par la zéolithe argentique.

C. Zéolithe barytique.

On l'utilise pour éliminer les sulfates solubles. Elle se prépare et s'emploie comme les précédentes, mais en remplaçant dans la préparation les sels d'argent ou de plomb par BaCl_2 . Elle fixe peu de baryum, assez cependant pour éliminer la petite quantité de sulfates solubles qui existe souvent dans les produits préparés par les méthodes indiquées dans les pages précédentes.
