

**Centre
de
Montpellier**

LES SUCRES NEUTRES
DANS LES SOLS :
OPPORTUNITÉ ET TENTATIVES
D'AMÉLIORATION
DE LEUR DÉTERMINATION

Marc PANSU

Document ORSTOM Montpellier, 1992, n° 4

Marc PANSU

LES SUCRES NEUTRES DANS LES SOLS :
OPPORTUNITÉ ET TENTATIVES D'AMÉLIORATION
DE LEUR DÉTERMINATION

Montpellier ORSTOM 1992

Les opinions exprimées dans ce document
n'engagent que la responsabilité de leurs auteurs

LES SUCRES NEUTRES DANS LES SOLS :
OPPORTUNITE ET TENTATIVES D'AMELIORATION
DE LEUR DETERMINATION

M.Pansu

TABLE DES MATIERES

| | |
|---|-----------|
| I - LES POLYSACCHARIDES DANS LES SOLS | 4 |
| II - L'ANALYSE DES POLYSACCHARIDES DES SOLS | 6 |
| 1) Hydrolyse acide des polysaccharides | 6 |
| 2) Purification éventuelle des hydrolysats avant analyse | 8 |
| 3) Dosage colorimétrique des sucres | 8 |
| Colorimétrie des sucres totaux | 8 |
| Colorimétrie des hexoses | 9 |
| Colorimétrie des pentoses | 9 |
| Colorimétrie des déoxyhexoses | 10 |
| 4) Dosage des sucres par chromatographie liquide | 10 |
| 5) Dosage des sucres par chromatographie gazeuse | 11 |
| III. BUT DE L'ETUDE | 12 |
| IV. ESSAIS D'OPTIMISATION DES CONDITIONS D'HYDROLYSE | 12 |
| V. ESSAIS D'AMELIORATION DU DOSAGE CHROMATOGRAPHIQUE | 15 |
| 1 - Chromatographie gazeuse | 15 |
| Séparation chromatographique | 15 |
| Préparation des hydrolysats avant injection | 15 |
| 2 - Chromatographie liquide (HPLC) | 17 |
| CONCLUSION | 18 |
| BIBLIOGRAPHIE | 19 |
| ANNEXES, PROTOCOLES DE DOSAGE | 22 |
| Methode de Dubois par colorimétrie au phénol | 23 |
| Colorimétrie à l'antrone | 23 |
| Chromatographie en phase gazeuse des acétates d'alditol | 23 |

I - LES POLYSACCHARIDES DANS LES SOLS

Les hydrates de carbone représentent 5 à 25% de la matière organique des sols (STEVENSON, 1982 ; CHESHIRE, 1979) et proviennent, dans leur majorité de polysaccharides.

On distingue dans les sols huit sucres neutres répartis en hexoses, déoxyhexoses et pentoses, deux sucres acides (acides uroniques) et deux sucres basiques (hexosamines).

Par ordre d'importance, les hexoses représentent 4 à 12% de la matière organique et comprennent le glucose, le galactose et le mannose. Les acides uroniques arrivent ensuite avec 1 à 5% de la matière organique répartis approximativement à part égale entre les acides galacturonique et glucoronique. Les pentoses représentent des teneurs plus faibles avec surtout l'arabinose et le xylose ainsi que des traces de ribose. Les deoxyhexoses, fucose et rhamnose, sont trouvés à une concentration sensiblement égale à celle des pentoses.

On identifie ensuite les hexosamines essentiellement réparties entre galactosamine et glucosamine avec des teneurs encore inférieures.

Enfin, d'autres sucres ont été trouvés à l'état de trace dans les sols : quatre sucres méthyles, deux sucres alcools (inositol et manitol), deux hexoses (fructose et sorbose), un pentose (deoxyribose) et une hexosamine (N-acétyl glucosamine).

A part des traces de sucres libres qui peuvent être extraites du sol par l'eau, les sucres des sols sont les constituants des polysaccharides. CHESHIRE (1979) rappelle en introduction, qu'il n'a pas été possible d'isoler des fractions solubles de polysaccharides à fin d'identification. Ainsi, on ne peut pas dire si les sucres proviennent d'un mélange hétérogène de polysaccharides ou bien d'un seul polysaccharide particulièrement complexe.

De nombreux auteurs ont tenté de caractériser les sols par le dosage des sucres provenant de l'hydrolyse acide des polysaccharides. FOLSOM et al. (1974) ont trouvé une relation *quasi* linéaire entre la teneur totale en hydrates de carbone et le carbone organique des sols avec cependant une courbure et une proportion moins forte de sucres dans les horizons très organiques. Ils observent que les sols de prairie contiennent plus de pentoses et moins d'hexoses que les sols de forêt et aussi que la proportion de mannose augmente avec la profondeur du sol indiquant une stabilité plus grande de ce sucre.

SINGHAL et SHARMA (1985) ont également observé que sur des sols de forêt le contenu total en hydrates de carbone varie comme celui du carbone organique, quel que soit le couvert végétal. Par contre, ils n'observent pas de différence dans les proportions relatives de ces sucres. MAC GRATH (1973) trouve aussi une composition relative en sucres très constante sur 38 sols de prairie irlandaise.

CHESHIRE et ANDERSON (1975) observent une quantité totale de sucres plus importante dans les sols cultivés que dans les sols non cultivés mais toujours dans des proportions relatives identiques.

Un autre aspect du problème concerne la répartition des polysaccharides dans les fractions de la matière organique des sols. Les solutions alcalines diluées constituent les meilleurs solvants bien que la plus grande partie reste associée à l'humine. L'acidification des extraits alcalins précipite les acides humiques alors que la majorité des polysaccharides sont retrouvés dans les acides fulviques (CHESHIRE, 1979 ; BARRIUSO et al., 1985). BAGAUDINOV et al. (1984) arrivent à séparer de ces derniers une fraction contenant majoritairement des polysaccharides avec un poids moléculaire de 27 000 à 28 000.

De nombreux auteurs ont cherché à déterminer l'origine microbienne ou végétale des sucres dans les sols. Ce travail n'est pas simple car aucun des principaux sucres n'a été identifié comme exclusivement végétal ou microbien (CHESHIRE, 1979). Les similarités en sucres des acides humiques et des mélanines fongiques sont plus proches que leurs différences (COELHO et al., 1988). Des incubations en présence de glucose marqué conduisent à un marquage de tous les sucres et dans une moindre mesure des acides aminés, les sucres synthétisés identifiés comme les plus stables étant les déoxyhesoses (CHESHIRE, 1971) ; une proportion de plus en plus grande de carbone marqué se retrouve dans l'humine avec l'augmentation du temps d'incubation (GUCKERT, 1971) ; Les hexoses sont les sucres dominants synthétisés par les microorganismes du sol (OADES, 1974).

L'étude récente de FRANÇOIS (1988) et les travaux de MURAYAMA (1983 ; 1984 ; 1987) indiquent qu'il n'est pas possible d'attribuer au glucose, galactose et ribose une origine spécifique mais que xylose et arabinose seraient essentiellement d'origine végétale alors que rhamnose, mannose et fucose sont très souvent synthétisés par les microorganismes mais sont aussi présents dans les exsudats racinaires de diverses plantes.

Effectuant un fractionnement granulométrique, C. FRANÇOIS (1988) montre que les sucres totaux sont essentiellement concentrés d'une part dans les racines fraîches, d'autre part dans la fraction 5-25 microns. Dans les fractions plus fines, elle mesure une forte diminution relative de xylose en même temps qu'une augmentation de mannose et rhamnose. Ceci indiquerait une concentration des polysaccharides microbiens dans ces fractions mais cette indication est tempérée par l'augmentation corrélative inexplicée d'arabinose et aussi par un doute sur la qualité des analyses.

Toutefois, ces recherches sur la répartition des sucres dans les fractions de la matière organique, sur l'étude de leur origine microbienne ou végétale, paraissent plus prometteuses dans la compréhension du fonctionnement organique des sols que les études comparatives de leur contenu glucidique. Elles sont pourtant fortement freinées par des protocoles analytiques assez longs et fastidieux et sujets à critique en ce qui concerne la justesse et la précision.

II - L'ANALYSE DES POLYSACCHARIDES DES SOLS

Elle nécessite trois grandes étapes :

- l'hydrolyse acide des polysaccharides pour libérer les hydrates de carbone ;
- la purification éventuelle des hydrolysats ;
- le dosage de ces derniers selon deux types de techniques :
 - méthodes colorimétriques globales des sucres réducteurs ;
 - méthodes chromatographiques permettant la détermination individuelle de chaque sucre.

1) Hydrolyse acide des polysaccharides

L'hydrolyse complète de beaucoup de polysaccharides est réalisable par les acides dilués chauds mais dans la plupart des sols, ils ne peuvent en hydrolyser qu'environ les trois quarts.

Pour l'hydrolyse complète des polysaccharides comme la cellulose ou ceux des sols, un traitement préalable avec un acide plus concentré est nécessaire (CHESHIRE, 1979). Lors de l'hydrolyse par les acides dilués, la libération des hexoses augmente avec la concentration de l'acide et ces acides dilués seuls semblent peu appropriés au dosage quantitatif des hexoses.

Les pentoses sont plus facilement libérés que les hexoses mais ils sont aussi plus facilement détruits durant l'hydrolyse acide et selon les sols ils pourront être mieux dosés par une hydrolyse en milieu plus dilué.

IVARSON et SOWDEN (1962) ont, les premiers, préconisé un prétraitement à froid avec H_2SO_4 12 M (72%) suivi d'une dilution de l'acide à 0,5 M et d'un chauffage à reflux. Avec des échantillons de litière, cette attaque libère presque trois fois plus d'hexoses que la seule hydrolyse sans prétraitement, mais environ 20% de pentoses en moins dans le cas d'une litière de conifères.

GUPTA et SOWDEN (1965) ont confirmé sur quatre sols un effet des prétraitements très positif pour le dosage des hexoses mais aussi souvent pour le dosage des pentoses et deoxyhexoses sauf dans certains cas où ces derniers semblent en partie détruits.

CHESHIRE et MUNDIE (1966) ont optimisé sur un sol le temps de préattaque à froid à l'acide sulfurique 12 M : les sucres mesurés par l'orcinol passent par un maximum vers 16 h puis décroissent ensuite alors que ceux mesurés à l'anthrone (hexoses) continuent d'augmenter jusqu'à 40 h. Cette durée du prétraitement influe ensuite sur le temps d'attaque à l'acide sulfurique 0,5 M à reflux nécessaire à la libération maximum de sucres. Avec une préattaque à froid de 16 h, 5 h d'attaque à chaud semblent suffisantes pour arriver à ce maximum alors qu'avec une préattaque de 2 h, il faut près de 20 h d'attaque. Finalement, les auteurs concluent qu'il n'existe pas de méthode d'hydrolyse parfaite permettant de libérer complètement le glucose sans détruire les pentoses ou deoxyhexoses. Le traitement de 16 h à H_2SO_4 12 M à 20° suivi de 5 h à reflux avec H_2SO_4 0,5 M était préconisé car il conduit aux meilleurs taux de glucose dans

plusieurs cas. Cette raison paraît peu convaincante dans le cas de recherches sur l'origine des sucres dans les sols où le glucose est peu caractéristique d'une provenance végétale ou microbienne (Cf. ci-dessus).

OADES et al. (1970) ont particulièrement fouillé le problème de l'hydrolyse dans le dosage chromatographique des sucres. Sur un sol sans fragment de plantes, ils trouvent les meilleurs taux de sucres extraits par attaque directe à reflux avec H_2SO_4 5N pendant 1 h. Cette attaque libère pourtant moins de glucose qu'une autre très proche de celle de Cheshire et Mundie (16 h dans H_2SO_4 26N (13 M) à froid suivi d'un reflux de 2 h dans H_2SO_4 N (0,5 M). Mais, elle libère plus des autres sucres, particulièrement le xylose, rhamnose et fucose. Elle induit pourtant des risques que ne présente pas la méthode avec préattaque : une importante dégradation des sucres lorsque la durée d'hydrolyse excède 20 minutes pour le xylose, 40 minutes pour l'arabinose et environ une heure pour les autres sucres dans un sol sablo-limoneux.

En fait, la méthode à reflux de 20 mn dans H_2SO_4 5N fournit un contenu total en sucres pas très différent de celui avec préattaque à froid excepté pour les échantillons riches en matériaux végétaux où cette dernière semble la plus appropriée. Dans le détail, elle fournit plus de pentoses et deoxyhexoses mais beaucoup moins de glucose. Pour libérer ce dernier, il faudrait une attaque à l'acide 5N plus longue qui détruit alors les pentoses et deoxyhexoses. Pour obtenir des taux maximum à la fois en glucose et en autres sucres Oades et al. préconisent donc un reflux de 20 mn avec H_2SO_4 5N suivi d'une filtration puis d'une macération de 16 h dans H_2SO_4 26N à froid et d'un reflux de 5 h dans H_2SO_4 N. Le seul traitement à H_2SO_4 5N 20 mn pourra être suffisant pour les sols peu organiques avec une sous estimation pour le glucose.

La plupart des expérimentateurs récents n'ont pas repris l'optimisation des conditions d'hydrolyse ; COELHO et al.(1988), MURAYAMA(1987), CHESHIRE et GRIFFITHS (1989) utilisent la méthode d'hydrolyse en deux étapes de OADES et al.(1970) en distinguant parfois les sucres libérés par le reflux de 20 mn avec H_2SO_4 5M appelés non-cellulosiques et les sucres libérés par l'hydrolyse ultérieure (reflux 5 h avec H_2SO_4 1N précédé d'une macération avec H_2SO_4 26N) qui sont appelés sucres cellulosiques.

ARSCHAD et SCHNITZER (1987) ainsi que BALDOCK et al.(1987) utilisent la méthode mise au point par SPITELER (1980) qui n'est autre que celle de CHESHIRE et MUNDIE(1966) en ce qui concerne les conditions d'hydrolyse soit une macération pendant 16 h avec H_2SO_4 26N suivie d'un reflux de 5 h avec H_2SO_4 N. SINGHAL et SHARMA (1985) utilisent la méthode de GUPTA (1967) soit une extraction de 2 h à basse température avec H_2SO_4 72% suivie d'un reflux pendant 16 h après dilution. BENZING-PURDIE et NIKIFORUK (1989) utilisent une technique plus simple d'hydrolyse à 105° pendant 18 h dans H_2SO_4 2N avec toutefois une comparaison avec la méthode de CHESHIRE et MUNDIE (1966). GUCKERT (1973) avait également utilisé une technique assez proche de celle-ci avec une hydrolyse à l'acide sulfurique 3N à 80°C pendant 24 h après extraction.

2) Purification éventuelle des hydrolysats avant analyse

Particulièrement pour les dosages chromatographiques, les hydrolysats doivent être purifiés d'une charge minérale importante surtout en sulfates mais aussi en minéraux extraits du sol par attaque acide, particulièrement le fer et l'aluminium. La neutralisation des extraits entraîne la précipitation des hydroxydes de fer et d'aluminium. Si cette neutralisation est réalisée avec un carbonate ou hydroxyde d'un métal alcalino-terreux lourd (Ca, Sr ou Ba), nous obtenons en outre une précipitation des sulfates. Le danger réside dans une possible adsorption des sucres neutres par les précipités. Avec l'hydroxyde ou le carbonate de baryum, les sucres neutres et les sels de baryum des acides uroniques peuvent être retrouvés par filtration et rinçage à l'eau des précipités, parfois même à l'eau chaude ou par extraction soxhlet à l'éthanol (CHESHIRE et MUNDIE, 1966). NaHCO_3 a été également utilisé pour la neutralisation des extraits acides avec extraction au méthanol du sulfate de sodium après dessiccation (OADES, 1967).

Le carbonate de calcium a permis une neutralisation en éliminant les sulfates et aussi la plupart des matières organiques colorées (BRINK et al., 1960).

OADES et al. (1970) ont préféré le carbonate de strontium pour amener les hydrolysats vers un pH de 7. En laissant reposer ensuite les solutions, ils constatent une coprécipitation des complexes bruns de fer et de matière organique. Après filtration et évaporation à sec à l'évaporateur rotatif, les sucres sont repris par 4 à 5 portions de 2 à 4 ml de méthanol avec filtration.

Les extraits peuvent être également purifiés par passage successif sur résine cationique et anionique avec en outre une possibilité de séparer sucres neutres et acides uroniques.

Alternativement des colonnes de charbon en mélange avec la célite permettent d'éluer les sucres avec de l'alcool éthylique à 50 % après rinçage des sels à l'eau (CHESHIRE, 1979).

3 - Dosages colorimétriques des sucres.

La plupart des méthodes colorimétriques sont basées sur l'une des deux propriétés suivantes des sucres : leur pouvoir réducteur ou la formation dans les acides forts de composés type furfural qui réagissent facilement pour donner des dérivés colorés.

On classe les méthodes en plusieurs types correspondant à l'estimation des sucres totaux, des hexoses ou des pentoses.

Colorimétrie des sucres totaux :

Deux techniques basées sur le dosage du pouvoir réducteur des sucres ont été testées : réduction de solutions alcalines de sels cuivriques (liqueur de fehling) pour donner des complexes cuivreux ou bien

réduction de solutions jaunes de ferricyanure pour donner des ferrocyanures incolores. Cette dernière a été jugée préférable dans le cas des sols et automatisée par CHESHIRE et MUNDIE (1966).

Trois techniques utilisent l'autre propriété basée sur les dérivés du furfural : les sucres totaux à l'anthrone, au phénol ou à l'orcinol.

L'anthrone donne une belle couleur vert-bleue avec les dérivés du furfural dans l'acide sulfurique concentré. Ce réactif fournit la meilleure absorbance des complexes avec les déoxyhexoses et les hexoses (à l'exception du mannose). Il fournit par contre une réponse beaucoup plus faible pour les pentoses qui devient négligeable lorsque la teneur en anthrone est plus grande que 0,05 %. Cette méthode est en outre suspectée d'interférer avec d'autres matières organiques ainsi que le fer et les nitrates (CHESHIRE 1979).

Le phénol réagit avec les dérivés furfural pour donner une couleur jaune (DUBOIS et al, 1956). La similarité de cette couleur avec celle des hydrolysats de sol a fait suspecter ce réactif de fournir des résultats par excès (Mac GRATH, 1973). Pourtant DOUTRE et al. (1978) jugent cette méthode plus satisfaisante que celle à l'anthrone ; ses résultats sont comparables à ceux obtenus par chromatographie gaz-liquide.

L'orcinol ou 3,5 dihydroxytoluène réagit également avec les dérivés furfural, avec l'avantage de donner des réponses assez semblables pour la plupart des sucres. Il a été appliqué aux hydrolysats de sols par BACHELIER (1966).

Colorimétrie des hexoses :

Bien que ce réactif ait été initialement proposé pour les sucres totaux, l'anthrone est plutôt un réactif d'estimation des hexoses et déoxyhexoses des hydrolysats de sol.

IVARSON et SOWDEN (1962) ont proposé également l'acide chromotropique pour la détermination des hexoses. Ce réactif est peu sujet à interférence par les pentoses et acides uroniques mais il fournit des réponses plus fortes que l'anthrone sur 4 échantillons de sols et litières.

Colorimétrie des pentoses :

CHESHIRE et MUNDIE (1966) ont utilisé le réactif orcinol : FeCl_3 décrit par THOMAS et LYNCH (1961), pour estimer la libération maximum des pentoses lors de l'hydrolyse. L'aniline dans l'acide acétique réagit également avec les pentoses à température ordinaire pour donner une couleur rouge, les hexoses et acides uroniques ne donnant que peu d'interférence (IVARSON et SOWDEN, 1962 ; TRACEY, 1950).

Colorimétrie des déoxyhexoses :

La couleur jaune formée par chauffage des déoxyhexoses avec la cystéine en milieu acide sulfurique est citée comme spécifique des déoxyhexoses et ce réactif a été appliqué par CHESHIRE et MUNDIE (1966) à des hydrolysats de sols.

Des réactifs spécifiques ont été également proposés pour le dosage des acides uroniques et des amino-sucre mais ils n'entrent pas dans notre propos.

4 - Dosage des sucres par chromatographie liquide

Il ne semble pas exister encore de technique très performante pour le dosage des sucres par chromatographie liquide. Pourtant dès 1969, CHESHIRE et al. arrivaient à séparer les 8 sucres neutres moyens des sols par chromatographie d'échange d'ion avec gradient de pH. Mais leur technique n'était pas très performante puisque une séparation durait 14 h.

En sortie de colonne, les sucres étaient analysés par colorimétrie après réaction à l'orcinol dans l'acide sulfurique. Un meilleur réactif pour les éluats alcalins sans acidification est l'hydrazide de l'acide p hydroxybenzoïque qui donne une couleur jaune.

HAMADA et ONO (1984) analysent les sucres sur des sols de cendres volcaniques par chromatographie liquide haute performance (HPLC) avec une colonne anionique et une détection par spectroscopie de fluorescence après réaction à l'éthanolamine. La séparation demande 70 mn mais arabinose, fructose et fucose sont élués sous le même pic ; il en est de même pour rhamnose et ribose.

PLUIJMEN (1987) analyse les sucres sur différentes plantes par HPLC sur une colonne SUGAR PAK TM (WATERS ASSOCIATES) avec de l'eau ou un mélange acétonitrile-eau comme phase mobile, une détection par réfractométrie et avec une précolonne anionique et cationique. Mais il s'intéresse surtout au glucose et fructose et ne fournit pas ses chromatogrammes.

REIM et VAN EFFEN (1986) utilisent une technique qui semble plus prometteuse. Le nouveau détecteur qu'ils proposent est beaucoup plus sensible que les réfractomètres et ne nécessite pas de formation de dérivés comme les méthodes spectrométriques. Utilisant une colonne d'échange d'ions ils séparent à la fois des sucres simples et des oligomères de faible poids moléculaire. Mais ils ne fournissent pas de chromatogramme comportant les 8 sucres majeurs des sols.

ANGERS et NADEAU (1988) ont séparé les sucres d'hydrolysats de sols par une colonne aminex HPX-87P (BIO-RAD labs) ; mais ils ne dosent que cinq sucres et avec une limite de détection assez médiocre.

5 - Dosage des sucres par chromatographie gazeuse

Cette technique est assez longue à mettre en oeuvre pour deux raisons :

- les sucres sont trop polaires pour être chromatographiés directement. Il faut passer par des dérivés qui bloquent les fonctions hydroxyles,
- la chromatographie gazeuse est plus sélective que la chromatographie liquide. Dans le cas des sucres, elle peut conduire à une multiplicité de pics représentant les différents isomères de configuration des sucres et les chromatogrammes deviennent difficiles à interpréter.

La plupart des auteurs utilisent des techniques analogues à celle décrite par OADES et al. (1970) :

Sur les extraits acides neutralisés et purifiés on fait agir du borohydrure de sodium qui transforme les différentes formes des sucres en leur forme alditol. On élimine l'acide borique formé par des évaporations successives en milieu acide acétique puis on procède à une acétylation des alditols avec l'anhydride acétique

Les acétates d'alditols sont repris dans du chlorure de méthylène pour être injectés dans le chromatographe. OADES et al.(1970) utilisent une colonne de 2 m par 3,5 mm DI remplie de GAS Chrom Q 100-120 Mesh imprégné à 5 % de ECNSS-M. Ils obtiennent une séparation des 8 sucres majeurs des sols en 70 mn avec une résolution assez médiocre entre Rhamnose et Fucose.

SPITELLER (1980) à travaillé à perfectionner cette technique. Il sépare les acétates d'alditols sur une colonne capillaire apolaire OV1 de 25 m en 25 minutes en détectant également les traces de glucosamine et galactosamine.

Parmi les auteurs récents qui utilisent des techniques analogues, on trouve quelques variantes au niveau des conditions chromatographiques.

CHESHIRE et al. (1983) réparent les acétates d'alditols avec une colonne capillaire de 50 m x 0,3 mm imprégnée de SILAR 10 CP avec une programmation de température de 90 minutes.

DORMAAR (1984) avec une colonne capillaire en verre imprégnée de SP2330 obtient une séparation d'une durée analogue à celle de SPITELLER (1980).

BALDOCK et al. (1987) utilisent le protocole de SPITELLER, ainsi que ARSHAD et SCHNITZER (1987) mais ces derniers avec une colonne capillaire et une phase stationnaire trifluoropropyl-méthyle qui n'améliore pas la durée d'analyse.

COELHO et al. (1988) s'en tiennent à une colonne remplie qui leur fournit une séparation d'une durée analogue à celle de OADES et al. (1979).

MURAYAMA (1988) ainsi que CHESHIRE et GRIFFITHS (1989) utilisent également la séparation chromatographique des acétates d'alditol sans préciser la colonne employée.

Cette technique n'est pourtant pas la seule proposée : MORGENLI (1975) fournit une séparation

des sucres neutres sous forme de leurs dérivés O-isopropylidène. La préparation du dérivé est réalisée assez simplement par action d'acétone à 1 % d'acide sulfurique mais la séparation nécessite ensuite 35 à 40 minutes sur colonne XE60 ou OV 225.

TRAITLER (1984) sépare les dérivés triméthylsylés des sucres sur de courtes colonnes apolaires.

COWIE et HEDGES (1984) séparent également les dérivés triméthylsylés des sucres d'hydrolysats de plancton, sédiment et bois mais en amenant au préalable les sucres libres à leur équilibre de mutarotation en présence de perchlorate de lithium pour simplifier le problème de l'interprétation d'une grande multiplicité des pics.

III. BUT DE L'ETUDE

L'analyse ci-dessus nous a montré deux types de problèmes :

- la difficulté de caractériser les sols selon leur contenu en différents sucres neutres et l'incertitude qui reste liée à l'origine microbienne ou végétale de chaque sucre, à leur répartition parmi les éléments structuraux du sol et les autres constituants organiques.
- une incertitude sur la justesse et la précision d'analyses fortement influencées par les conditions d'hydrolyse mais aussi par la variabilité des résultats selon les techniques de colorimétrie et par des risques d'erreur résultant de protocoles assez fastidieux des analyses chromatographiques.

Il nous est apparu que ces deux types de problèmes sont fortement liés et que les progrès des connaissances dans le premier dépendront peut-être de la solution du second.

Les études menées à l'ORSTOM sur le dosage des polysaccharides des sols concernaient d'une part les hydrolyses acides et d'autre part l'amélioration des conditions de dosage.

IV - ESSAIS D'OPTIMISATION DES CONDITIONS D'HYDROLYSE

L'étude bibliographique ci-dessus montre que de nombreux travaux ont été réalisés sur le sujet. Pourtant ces travaux déjà anciens se sont pratiquement arrêtés avec OADES et al. (1970) qui ont particulièrement fouillé le sujet mais avec des techniques un peu empiriques sans utiliser les méthodes modernes d'optimisation.

Brigitte SANS (1986) avait donc été chargée pendant un mois de reprendre sur un sol l'étude des conditions d'hydrolyse avec un plan d'expérience central composite incluant simultanément trois facteurs : la normalité de l'acide sulfurique, la température et le temps d'attaque et ceci avec ou sans prétraitement à l'acide 26 N à froid.

Au moyen de la méthodologie des surface de réponse elle cherchait ensuite à optimiser

l'absorbance des sucres dosés à l'anthrone selon le mode opératoire en annexe de GUCKERT (1973).

Malheureusement de trop grandes fluctuations dues au dosage colorimétrique par rapport à celles dues aux facteurs contrôlés l'ont empêchée de tirer des conclusions fiables. Elle remarque que les trop fortes températures (140°) comme les durées d'analyses trop longues (8,5 h) détruisent les sucres. L'hydrolyse s'avère incomplète dans les zones de faible température et de faible normalité. L'optimum sans préattaque se situe vers une teneur en acide de 5 N conforme aux résultats de OADES et al. (1970) mais pour un temps d'attaque bien supérieur de 4,5 h dans des conditions probablement moins agressives (100° en flacon bouché alors que OADES et al. opèrent à reflux).

C. DESSAIN (1987) a repris ce travail d'optimisation mais en cherchant au préalable à étudier les causes d'erreur du dosage à l'anthrone. La cause principale décelée se situait dans l'insuffisance du temps donné par la littérature pour le développement de la coloration au bain marie à 80 °c après mélange avec l'anthrone ; il a porté ce temps à 35 mn.

Avec ce protocole amélioré, des tests F de Fisher montrent que l'erreur due à la préparation des échantillons (hydrolyses en conditions constantes et formation des dérivés colorés) n'est pas supérieure à celle due à la mesure du colorimètre mais avec tout de même un coefficient de variation de 6,5 %.

Il a alors repris les plans d'expérience de Brigitte SANS soient des conditions d'hydrolyse centrées autour de 5 N pour la normalité de l'acide (N, 3N, 5N, 7N, 9N), de 100°C pour la température (60°C, 80°C, 100°C, 120°C, 140°C) et de 4,5 heures pour la durée (0,5 - 2,5 - 4,5 - 6,5 - 8,5 heures). Les hydrolyses ont été réalisées dans des flacons SOVIREL bouchés à vis en étuve thermostatée sur deux sols sans préattaque à froid et sur l'un d'entre-eux après une préattaque à froid de 16 h à l'acide 26N. Les dosages sont réalisés à l'anthrone avec le nouveau temps de développement de la coloration et au ferricyanure avec un colorimètre automatique. Les résultats confirment en partie les précédents. Les facteurs qui interviennent le plus sont la température et le temps d'hydrolyse ; dans tous les cas, les températures extrêmes (140°) ou trop faibles (60°) fournissent la plus faible quantité de sucres. Les durées d'hydrolyse trop faibles (1/2 heure) sont également prohibitives. La normalité de l'acide intervient moins si ce n'est qu'une valeur trop faible (1N) est un peu moins favorable à la libération des sucres dans le cas où il n'y a pas de préattaque acide.

Sur les deux sols sans préattaque à froid, pour une durée d'hydrolyse de 4,5 heures les maxima obtenus pour le dosage des sucres à l'anthrone se situent vers les valeurs centrales des plans d'expérience soit un acide 5N et une température de 100° (en flacon bouché) ; l'influence de variations sur la teneur en acide est toutefois beaucoup moins importante que celle sur la température. Le dosage des sucres au ferricyanures conduit aux mêmes conclusions.

La préattaque à froid augmente les quantités de sucres dosés par l'une et l'autre méthode ; une incertitude demeure cependant sur la position du maximum de sucres libérés par hydrolyse après préattaque à froid ; pour le dosage à l'anthrone, ce maximum est déplacé vers 70°C avec un acide plus faible (1N) en accord avec les résultats de CHESHIRE et MUNDIE (1966), alors que pour le dosage au ferricyanure, on n'enregistre qu'un léger déplacement vers une température de 90°C.

Plus récemment, nous avons mené une étude visant à comparer quatre méthodes d'attaque :

- 1 : HCl 3 N 1 h à 105°C
- 2 : H₂SO₄ N 6 h à 105 °C
- 3 : H₂SO₄ 26 N 16 h à froid puis H₂SO₄ N 5 h à 105°C
- 4 : H₂SO₄ 5 N 20 mn à 105°C
- 5 : attaque 3 après attaque 4

Les attaques ont été conduites en flacons bouchés sur: un mélange étalon comprenant 1 mg de chacun des 8 sucres élémentaires des sols, 100 mg de cellulose cristallisée du commerce, 2 g de sol d'une région de canne à sucre de Martinique. Chaque essai a été conduit en double et les sucres dosés par colorimétrie au phénol puis par chromatographie gazeuse (annexes)

Les résultats du dosage colorimétrique montrent (tableau I) :

- une bonne reproductibilité des mesures en double ;
- une bonne résistance globale des sucres étalons à toutes les attaques. On ne note qu'une légère diminution du taux de sucres lorsque le temps d'attaque augmente ; par contre on ne constate pas d'influence de la préattaque à froid et les acides chlorhydrique et sulfurique ne semblent pas plus dégradants l'un que l'autre ;
- une résistance quasi-parfaite de la cellulose cristallisée aux acides concentrés à 105°, quels que soient le type et la concentration de l'acide ; l'hydrolyse devient très importante (88 %) avec la méthode 3 comportant la préattaque à froid et totale avec la méthode 4.
- Une difficulté à conclure en ce qui concerne le sol ; les résultats analytiques sont tous probablement par excès du fait d'une perturbation de la coloration ; les méthodes 2 et 3 donnent des résultats égaux légèrement supérieurs à l'attaque chlorhydrique et seule la méthode 5 fournit un résultat plus important sensiblement égal à celui déjà trouvé par ailleurs (C. FELLER, comm. pers.) mais énorme puisqu'il représente près de 75 % du carbone du sol.

Les résultats chromatographiques ne sont interprétables que pour la cellulose (formation des acétates d'alditols incomplète dans les autres cas). Ils confirment ceux de la colorimétrie avec toutefois des valeurs un peu plus faibles puisque la totalité des sucres récupérés va de 68 % (méthode 3) à plus de 80 % (méthode 5) de la cellulose soumise à hydrolyse. Dans tous les cas où il n'y a pas eu de préattaque à froid, on ne détecte que des traces de glucose.

Remarquons que l'hydrolyse de la cellulose ne fournit pas que du glucose, bien que ce sucre représente, selon les cas, 66 à 86 % de la totalité ; on détecte ensuite 10 à 30 % de galactose puis 1 à 2 % de mannose et enfin environ 1 % de chacun des sucres xylose et ribose. Il convient donc d'être prudent quant à l'origine microbienne suspectée de certains sucres comme le mannose.

V - ESSAIS D'AMELIORATION DU DOSAGE CHROMATOGRAPHIQUE

1 - Chromatographie gazeuse

Nous avons choisi la technique la plus classique de séparation après formation des acétates d'alditols et nous avons cherché à améliorer la fiabilité et le temps d'analyse de cette technique assez longue dans deux grandes directions :

- la séparation chromatographique proprement dite,
- la purification des hydrolysats acides et la formation des dérivés.

- Séparation chromatographique

Nous avons tenté d'améliorer la vitesse de séparation des acétates d'alditols qui de 70 mn avec OADES et al.(1970) était passée à environ 25 mn avec les auteurs plus récents cités ci-dessus.

Après plusieurs essais, nous avons choisi une colonne capillaire avec imprégnation d'une phase SP 2330 analogue à celle de DORMAAR (1984) mais sur silice fondue au lieu du verre. Le chromatogramme (fig 1) montre une séparation réalisée en 12,5 mn avec cette colonne sur un mélange étalon et un extrait de sol ; les conditions chromatographiques sont fournies en annexe.

- Préparation des hydrolysats avant injection

Comme indiqué ci-dessus, les méthodes de purification des hydrolysats ont parfois été suspectées d'absorber les sucres. C'est pourquoi Christian ILLE (1986), au cours d'un stage de fin d'études, a testé différentes méthodes de purification.

Il a préparé d'abord une solution sulfurique contenant approximativement les éléments minéraux du sol sans matière organique : calcination d'un sol à 1000° pendant une nuit, attaque par l'acide sulfurique 7N pendant 7 heures, filtration et ajout complémentaire de sels ferriques et d'aluminium. A des aliquotes de cette solution minérale, il ajoutait alors 1 mg de chacun des sucres des sols puis procédait à des purifications préalablement à la chromatographie selon les techniques suivantes :

- élution à l'eau sur résine amberlite MB1,
- élution au méthanol sur résine amberlite MB1,
- neutralisation au carbonate de strontium,
- neutralisation au bicarbonate de sodium,
- neutralisation au carbonate de baryum,
- neutralisation à la baryte,

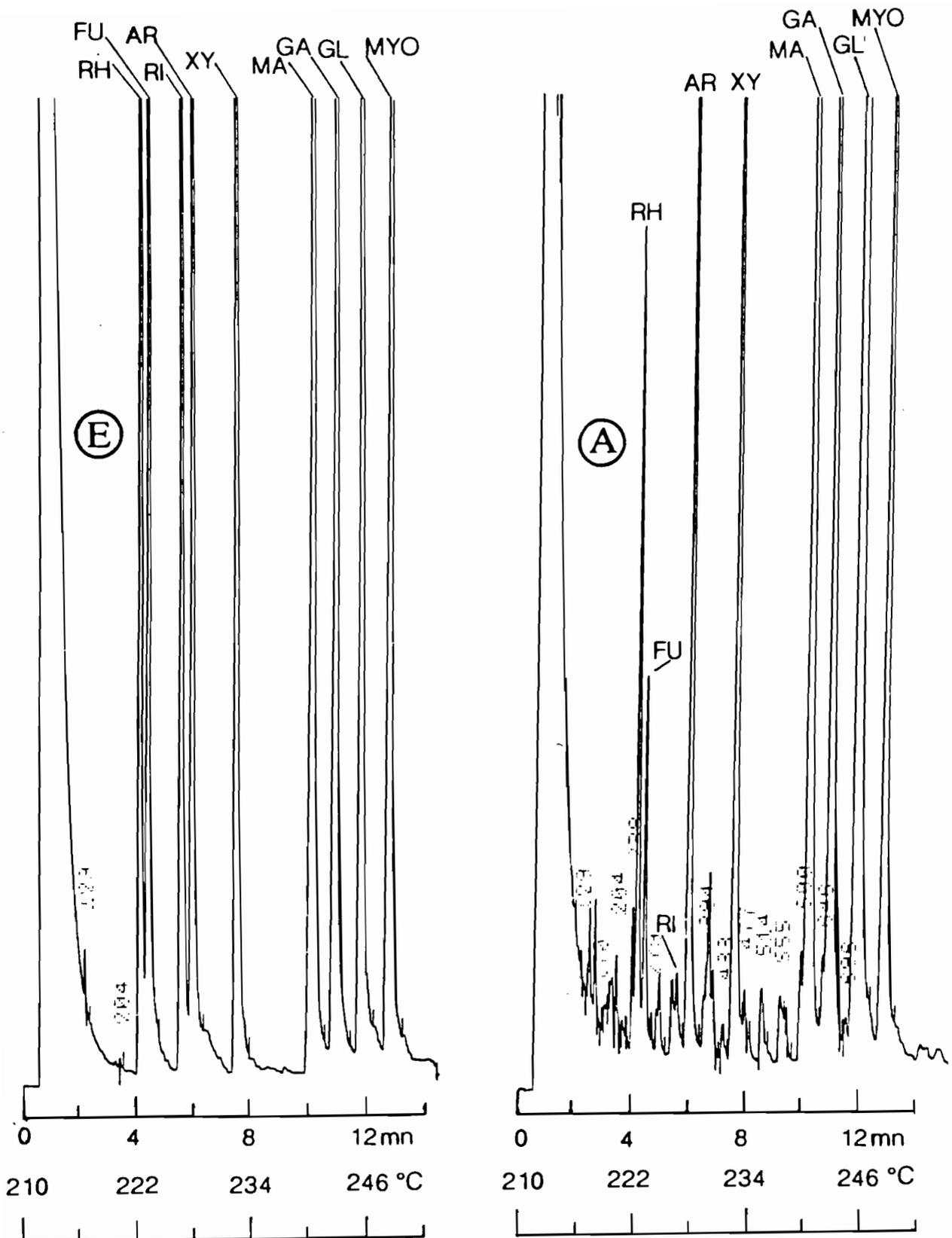


Figure 1 : Chromatogrammes d'acétates d'alditols sur colonne capillaire en silice fondue avec phase SP2330 (RH=rhamnose, FU=fucose, RI=ribose, AR=arabinose, XY=xylose, MA=mannose, GA=galactose, GL=glucose, MYO=myoinositol étalon interne) :
 E= mélange étalon correspondant à l'injection de 0,2 µg de chaque sucre.
 A= sucres d'un sol ferrallitique fortement désaturé de la vallée du Niari (Congo) ; hydrolyse 20 mn à reflux par H₂SO₄ 5N.

- neutralisation à la soude.

La méthode qui a fourni la meilleure récupération des sucres est comme pour OADES et al. (1970), la neutralisation au carbonate de strontium.

Des manipulations ont été conduites ultérieurement, avec des solutions synthétiques analogues, pour préciser l'effet de la neutralisation au carbonate de strontium sur la récupération des sucres. Sur trois essais l'étalon interne (myoinositol) était ajouté avant neutralisation, et sur trois autres essais avant la réduction au borohydrure des solutions concentrées purifiées. Chacune des solutions finales était injectée deux fois dans le chromatographe. Les calculs des teneurs absolues retrouvées ont montré (tableau II) :

- une erreur provenant de la préparation des échantillons non supérieure à celle de la chromatographie (test F). Cette erreur est de l'ordre de 1 % pour la plupart des sucres ;
- une absorption plus importante pour l'étalon interne que pour les autres sucres. Il vaut donc mieux n'introduire cet étalon interne qu'après purification des extraits avant dérivatisation des sucres ;
- un pourcentage moyen de récupération des sucres de 85 % variant de 71 % pour le ribose à 91 % pour le rhamnose. Le ribose est toujours le sucre le moins bien récupéré. Avec ces pourcentages de récupération, nous avons calculé les facteurs correctifs suivants à appliquer aux résultats de teneurs absolues de chaque sucre par cette méthode : 1,21 pour rhamnose, 1,08 pour fucose, 1,41 pour ribose, 1,10 pour arabinose et xylose, 1,25 pour mannose, 1,21 pour galactose, 1,15 pour glucose. Ces facteurs tiennent compte des coefficients de réponse de chaque sucre par rapport à l'étalon interne ;

Comme signalé ci-dessus, les opérations de réduction et d'acétylation qui suivent la purification des hydrolysats sont également assez longues et rendent difficile la comparaison de nombreux échantillons. BLAKENEY et al. (1983) ont préconisé une méthode permettant de réduire ces temps de préparation mais un essai que nous avons réalisé au laboratoire s'est avéré infructueux.

2- Chromatographie liquide (HPLC)

Cette technique la plus prometteuse car elle faciliterait beaucoup les opérations et par là diminuerait les risques d'erreur, n'a pas pu être testée suffisamment par manque de crédit.

Le seul fabricant qui fournit dans sa documentation un chromatogramme comportant les sept sucres majoritaires parmi les huit sucres neutres des sols est DIONEX. En outre ce fabricant est le seul à proposer un détecteur ampérométrique très sensible du type de celui adapté par REIM et VAN EFFEN (1986) à l'analyse des sucres. Pourtant des essais conduits au laboratoire des fraudes de Montpellier n'ont pas permis jusqu'à maintenant une séparation des sucres en une seule injection comme sur le

chromatogramme de la documentation du fabricant. On arrive cependant à doser les sucres en deux injections comportant des conditions différentes de normalité de l'éluant.

CONCLUSION

Les études réalisées ont permis diverses améliorations dans la détermination des sucres résultant de l'hydrolyse acide des polysaccharides des sols. Par rapport aux auteurs récents qui ont conduit des études analogues, nous avons réduit de moitié le temps nécessaire à l'obtention d'un chromatogramme des acétates d'alditols après injection.

Nous avons sélectionné une technique de purification des hydrolysats par précipitation au carbonate de strontium et proposé des coefficients correctifs de l'absorption de chaque sucre par les précipités.

Dans le domaine de l'optimisation des conditions d'hydrolyse, nous avons confirmé la nécessité d'une préattaque à froid pour l'hydrolyse des matières cellulosique et précisé les domaines possibles des temps et températures d'hydrolyse ainsi que la concentration de l'acide.

Ces résultats devront être confirmés sur d'autres sols mais à notre avis, les conditions optima d'hydrolyses ne pourront être vraiment affinées que lorsqu'on disposera d'une technique plus rapide d'analyse des sucres. Il faut donc poursuivre les recherches vers les techniques de chromatographie liquide haute performance, en particulier par échange d'ion et détection ampérométrique (type DIONEX).

L'analyse bibliographique incluse à ce rapport qui comprend une description succincte des principaux travaux déjà menés sur les sucres dans les sols devrait permettre au lecteur de juger de l'opportunité de telles recherches.

BIBLIOGRAPHIE

- ANGERS D.A., NADEAU P. et MEHUYS G.R., 1988.- Determination of carbohydrate composition of soil hydrolysates by high-performance liquid chromatography, *J. of Chromatography*, 454, 444-449.
- ARSHAD et SCHNITZER, 1987.- Characteristics of the organic matter in a slightly and in a severely crusted soil, *Pflanzenernähr Bodenk.*, 150, 412-416.
- BACHELIER G., 1966.- Les sucres dans les sols et leur dosage global, *Cah. ORSTOM Ser. Pedol.*, 4, 9-22.
- BAGAUTDINOV F.Y., KHAZIYEV F.K. et SHCHERBUKHIN V.D., 1984.- Polysaccharide fraction of humic substances from a typical chernozem and a gray forest soil, *Soviet Soil Sci.*, 16, 37-42.
- BALDOCK J.A., KAY B.D. et SCHNITZER M., 1987, Influence of cropping treatments on the monosaccharide content of the hydrolysates of a soil and its aggregate fractions, *Can. J. Soil Sci.*, 67, 489-499.
- BARRIUSO E., ANDREUX F. et PORTAL J.M., 1985.- Etude de la répartition des glucides associés aux constituants humiques dans un sol humifère de montagne, *C.R. Acad. Sci. Paris*, 300, II, 16, 827-830.
- BENZING-PURDIE L.M. et NIKIFORUK J.H., 1989.- Carbohydrate composition of hay and maize soils and their possible importance in soil structure, *J. of Soil Sci.*, 40, 125-130.
- BLAKENEY A.B., HARRIS P.J., HENRY R.J. et STONE B.A., 1983.- A simple and rapid preparation of alditol acetates monosaccharide analysis, *Carbohydrate Research*, 113, 291-299.
- BRINK R.H., DUBACH P. et LYNCH D.L., 1960.- Measurement of carbohydrates in soil hydrolysates with anthrone, *Soil Sci.*, 89, 157-166.
- CESHIRE M.V. et ANDERSON G., 1975.- Soil polysaccharides and carbohydrate phosphates, *Soil Sci.*, 119, 356-362.
- CESHIRE M.V. et GRIFFITHS B.S., 1989.- The influence of earthworms and cranely larvae on the decomposition of uniformly ^{14}C labelled plant material in soil, *J. of Soil Sci.*, 40, 117-124.
- CESHIRE M.V. et MUNDIE C.M., 1966.- The hydrolytic extraction of carbohydrates from soil by sulfuric acid. *J. of Soil Sci.*, 17, 372-381.
- CESHIRE M.V., 1979.- Nature and origin of carbohydrates in soils, *Acad. Press*, 216 p.
- CESHIRE M.V., MUNDIE C.M. et SHEPHERD H, 1973.- Transformation of ^{14}C glucose and starch in soil, *Soil Biol. and Biochem.*, 1, 117-130.
- CESHIRE M.V., MUNDIE C.M. et SHEPHERD H., 1971.- The origin of the pentose fraction of soil polysaccharides, *J. of Soil Sci.*, 22, 222-236.
- CESHIRE M.V., SPARLING G.P. et MUNDIE C.M., 1983.- Effect of periodate treatment of soil on carbohydrate constituents and soil aggregation, *J. of Soil Sci.*, 34, 105-112.
- COELHO R.R.R., LINHARES L.F. et MARTIN J.P., 1988.- Sugars in hydrolysates of fungal melanins and soil humic acids, *Plant and Soils*, 106, 127-133.
- COWIE G.L. et HEDGES J.I., 1984.- Determination of neutral sugars in plankton, sediments and wood by capillary gas chromatography of equilibrated isomeric mixtures, *Anal. Chem.*, 56, 497-504.
- DESSAIN C., 1987.- Détermination des polysaccharides des sols : étude des causes d'erreur et optimisation des conditions d'hydrolyse, Rapport fin d'études IUT ORSAY-ORSTOM BONDY.

- DORMAAR J.F., 1984.- Monosaccharides in hydrolysates of water-stable aggregates after 67 years of cropping to spring wheat as determined by capillary gas chromatography, *Can. J. Soil Sci.*, 64, 647-656.
- DOUTRE D.A., HAY G.W., HOOD A., VanLOON G.W., 1978.- Spectrophotometric methods to determine carbohydrates in soil, *Soil Biol. and Biochem.*, 10, 457-462.
- FOLSOM B.L., WAGNER G.H. et SCRIVNER C.L., 1974.- comparison of soil carbohydrate in several prairie and forest soils by gas- liquid chromatography, *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 38, 305-309.
- FRANCOIS C., 1988.- Les sucres neutres in "Devenir à court terme de différentes formes de l'azote dans un ferrisol", Doctorat de l'université de Nancy I, 67-75.
- GUCKERT A., CURE B. et JACQUIN F., 1971.- Comparative evolution of the polysaccharides of the humin after incubation of glucose ^{14}C and straw ^{14}C , *Trans. Intern. Symposium "humus et plante V"-Prague*, 155-160.
- GUCKERT, 1973.- Contribution à l'étude des polysaccharides dans les sols et de leur rôle dans les mécanismes d'agrégation, Thèse doct. d'état, Univ. Nancy I, 124 p.
- GUPTA U.C. et SOWDEN F.J., 1965.- Studies on methods for the determination of sugars and uronic acids in soils, *Can. J. of Soil Sci.*, 45, 237-240.
- GUPTA U.C., 1967.- Carbohydrates in "Soil Biochemistry" McLAREN et PETERSON ed., Marcel Dekker-New York, 91-118.
- HAMADA R. et ONO A., 1984, Determination of carbohydrates in hydrolysates of volcanic ash soil by liquid chromatography with fluorescence spectroscopy, *Soil Sci. Plant Nutr.*, 30, 145-150.
- ILLE C., 1986.- Mise au point des conditions de dosage chromatographique des carbohydrates dans des hydrolysats de sols, Rapport fin d'études IUT ORSAY-ORSTOM BONDY.
- IVARSON K.C. et SOWDEN F.J., 1961.- Methods for the analysis of carbohydrate material in soil, *Soil Sci.*, 94, 245-250.
- McGRATH D., 1973.- Sugars and uronic acids in irish soils, *Geoderma*, 10, 227-235.
- MORGENLIE S., 1975.- Analysis of mixtures of the common aldoses by gas chromatography-mass spectrometry of their O-isopropylidene derivatives, *Carbohydrate Research*, 41, 285-289.
- MURAYAMA S., 1983.- Changes in the monosaccharide composition during the decomposition of straws under field conditions, *Soil Sci. Plant Nutr.*, 30, 367-381.
- MURAYAMA S., 1984.- Decomposition kinetics of straw saccharides and synthesis of microbial saccharides under field conditions, *J. of Soil Sci.*, 35, 231-242.
- MURAYAMA S., 1988.- Microbial synthesis of saccharides in soils incubated with ^{13}C labelled glucose, *Soil Biol. Biochem.*, 20, 193-199.
- OADES J.M., 1967a.- Gas-liquid chromatography of alditol acetates and its application to the analysis of sugars in complex hydrolysates, *J. of Chromatography*, 28, 246-252.
- OADES J.M., 1974, Synthesis of polysaccharides in soil by microorganisms, *Trans. Intern. Congr. Soil Sci.* 10th- Moscow, 93-100.
- OADES J.M., KIRKMAN M.A. et WAGNER G.H., 1970.- The use of gas-liquid chromatography for the determination of sugars extracted from soils by sulfuric acid, *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 34, 230-235.

- PLUIJMEN M.H.M., 1987.- Sugar analysis with the Shaffer-Somogyi micro-analysis, High Performance Liquid Chromatography and enzymatic analysis in crop samples, *Commun. in Soil Sci. Plant Anal.*, 18, 1049-1059.
- REIM R.E. et VanEFFEN R.M., 1986.- Determination of carbohydrates by liquid chromatography with oxidation at a nickel(III) oxide electrode, *Anal. Chem.*, 58, 3203-3207.
- SANS B., 1986.- Optimisation de l'hydrolyse des polysaccharides des sols, Rapport fin d'études IUT ORSAY-ORSTOM BONDY.
- SINGHAL et SHARMA, 1985.- Status of carbohydrates in the acid hydrolysates of soils and humic acids of Dehra dun forests (Uttar Pradesh), *Proc. Indian ntn. Sci. Acad.*, B51, 3, 348-352.
- SPITELLER M., 1980.- Kapillargaschromatographische bestimmung von zuckern unterschiedlicher boden, *Z. Pflanzenernaehr. Bodenkd.*, 143, 720-729.
- STEVENSON F.J., 1982, Soil carbohydrates in "Humus chemistry", Willey & Sons, 147-171.
- THOMAS et LYNCH, 1961.- A method for the quantitative estimation of pentoses in soil, *Soil Sci.*, 1961, 91, 312-316.
- TRACEY M.V., 1950.- A colorimetric method for the determination of pentoses in the presence of hexoses and uronic acids, *Biochem. Journal*, 47, 433-436.
- TRAITLER H., Del VEDOVO S. et SCHWEIZER T.F., 1984.- Gas chromatographic separation of sugars by on-column injection on glass capillary columns, *J. of Hight Resol. Chromatog. & Chromatog. Commun.*, 7, 558-562.

ANNEXES

PROTOCOLES DE DOSAGE

DOSAGE DES SUCRES METHODE DE DUBOIS PAR COLORIMETRIE AU PHENOL

Reactifs et produits

- Phénol à 5% dans l'eau.
- H₂SO₄ 36N
- Gamme étalon : 0-5-10-25-50 et 100 mg glucose/l

Mode opératoire

- dans des tubes à essais, mettre 2 ml d'échantillon (hydrolysate de sol) + 1 ml de phénol + 5 ml H₂SO₄ (rapidement sans le faire couler le long de la paroi ; attention tout de même aux projections).
- attendre 10 mn ; agiter les tubes ; les placer au bain-marie à 25-30 °C pendant 20 mn ; refroidir sous l'eau ; faire la lecture à 485 nm (490 pour les hexoses, 480 pour les pentoses et acides uroniques).

- N.B. : - la coloration est stable plusieurs heures.
- il est parfois nécessaire d'homogénéiser les solutions juste avant la lecture.

DOSAGE DES SUCRES A L'ANTHRONE

Reactifs et produits

- Solution d'anthrone à 0,2% dans H₂SO₄ concentré (d = 1,84)
- gamme étalon : 0-5-10-15-20-25 mg glucose/l.
- glace pilée.

Mode opératoire.

- hydrolyser 5g de sol avec 50 ml d'acide sulfurique dans les conditions choisies (Cf. ci-dessus).
- centrifuger et ajuster le surnageant à 100 ml.
- après dilution des extraits, pipeter 5 ml de la solution et des étalons dans des tubes calibrés de 150 x 25mm placés dans la glace.
- ajouter dans chaque tube 10 ml de la solution d'anthrone en laissant couler lentement le long de la paroi ; agiter par un mouvement de rotation.
- obturer par un morceau de parafilm et placer immédiatement dans un bain-marie à 85 °C pendant 35 mn.
- refroidir dans le bac à glace et passer au colorimètre à 6250 millimicrons.

DOSAGE DES SUCRES PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE DES ACETATES D'ALDITOLS

Reactifs et produits

- solution étalon de sucres dans l'alcool méthylique à 15 % d'eau contenant 1 mg/ml de chacun des sucres : rhamnose, fucose, ribose, arabinose, xylose, mannose, galactose, glucose.
- solution étalon contenant 1 mg/ml de myoinositol dans le mélange méthanol/eau v/v.
- méthanol R.P.
- carbonate de strontium R.P.
- borohydrure de sodium R.P.

- acide acétique glacial.
- solution anhydre d'acide acétique à 10% dans le méthanol.
- anhydride acétique.
- chloroforme

Mode opératoire

préparation des extraits

- hydrolyser 5g de sol à l'acide sulfurique dans les conditions choisies (Cf. texte ci-dessus).
- centrifuger et recueillir le surnageant.
- ajouter la quantité de carbonate de strontium en poudre calculée selon la quantité d'acide sulfurique à neutraliser plus 10 % ; ajouts par petites portions avec agitation sur un agitateur magnétique en évitant le débordement par excès de mousse.
- laisser agir au moins une heure avec agitation ; vérifier le pH qui doit être neutre ou légèrement basique (au besoin ajouter une pastille de soude) ; vérifier la précipitation des hydroxydes de fer (coloration des précipités et décoloration de la solution).
- centrifuger et recueillir le surnageant ; rincer le culot avec 25 ml de méthanol; recentrifuger et joindre le surnageant à la première solution ; répéter cette opération.
- ajouter un volume exact en rapport avec la quantité de sucres de la solution d'étalon interne (0,5 à 2 ml).
- évaporer à sec à l'évaporateur rotatif ; rincer le ballon par 3 à 4 petites portions de méthanol à la pipette pasteur et transférer les solution de rinçage dans des fioles de 5 ml à bouchage à vis.
- ajouter environ 10 mg de borohydrure de sodium et laisser agir une nuit.
- ajouter 0,1 ml d'acide acétique glacial puis évaporer à sec sous balayage d'azote à 70 °C ; ajouter 1 ml de solution méthanol/CH₃COOH à 10 % et réévaporer ; répéter 5 fois cette opération.
- ajouter 1 ml d'anhydride acétique ; boucher les fioles et porter à 135 °C pendant 2 heures.
- refroidir à 70 °C et réévaporer à sec sous balayage d'azote.
- refroidir et reprendre par 0,5 à 2 ml de chloroforme selon la teneur en sucre.
- les solutions peuvent être stockées ou injectées directement dans le chromatographe.

préparation des acétates d'alditol étalons

prélever 1 ml de solution étalon de sucres et 1 ml de solution d'étalon interne dans des fioles à vis de 5 ml et opérer comme ci-dessus à partir de l'étape d'ajout du borohydrure de sodium.

Conditions chromatographiques

colonne capillaire silice fondue SP 2330 (SUPELCO) 15 m de longueur et 0,25 mm de diamètre intérieur.

gaz vecteur Hélium 0,7 Bars

injecteur diviseur : débit de fuite = 100ml/mn.

détecteur à ionisation de flamme.

Températures :

colonne : programmée de 210 à 250°C à 3 °C/mn

injecteur : 300 °C

détecteur : 250 °C