

. 50376

1949

1

RECHERCHE D'UN MILIEU DE CULTURE ARTIFICIEL POUR

LE B. MESAENTERICUS BOIDIN

Pierre DERYSER
Ingénieur-Chimiste H.E.I.
licencié-ès-Sciences



C'est en 1906 qu'Auguste BUIDIN constata qu'un empois d'amidon s'était liquéfié à la suite d'une infection. Ayant recherché la cause de cette liquéfaction, il décela la présence d'une bactérie du type B. Mesentericus et put mettre en évidence la sécrétion par ce microorganisme d'une diastase ayant la propriété de liquéfier l'empois d'amidon.

Auguste BUIDIN et le Dr. Jean EFFRONT recherchèrent alors le milieu le plus propice au développement de la bactérie puis étudièrent l'influence de diverses substances sur la sécrétion diastasique. Après avoir précisé au laboratoire les conditions les meilleures, ils transportèrent leur découverte sur le plan industriel. Les difficultés à surmonter étaient nombreuses, notamment celles relatives à la nature et à la forme des appareils de fermentation, à une asepsie rigoureuse et c'est seulement en 1920 que ces inventeurs purent sortir les premiers litres de jus diastasique. Ils réussirent ensuite à obtenir de ces solutions des produits secs, concentrés et stables.

Cette amylase d'origine bactérienne, connue commercialement sous les noms de "Rapidase" et de "Superdiastase", a déjà rencontré de nombreuses applications dans toutes les industries travaillant les matières amylacées, spécialement dans l'industrie textile (désencollage, encollage et apprêts) et dans la brasserie (liquéfaction des grains). Son grand pouvoir liquéfiant, sa résistance aux températures relativement élevées, son action dans une zone de pH assez large lui ont procuré une estimable faveur.

Le milieu de culture industriel actuellement utilisé ne permettant pas, du fait de sa complexité, de se rendre compte de l'influence de certains facteurs sur la croissance de la bactérie et la sécrétion diastasique, nous avons recherché un milieu artificiel composé d'éléments bien définis. Sur ce milieu nous avons étudié l'influence des matières azotées, de certains anions et cations et enfin de divers "activateurs". Ce travail, effectué avec les conseils de Monsieur le Professeur PACET de la faculté libre de médecine et de pharmacie, nous a permis de dégager une formule de moût artificiel susceptible d'être utilisé pour certaines applications industrielles.

Avant d'exposer ces résultats, nous dirons quelques mots des caractéristiques du B. Mesentericus BUIDIN, de la technique actuelle de fabrication industrielle et nous indiquerons notre méthode de travail.

CHAPITRE I.

LE B. MESAENTERICUS BOIDIN - TECHNIQUE ACTUELLE.

DE FABRICATION INDUSTRIELLE DE LA RAPIDASE

CARACTERISTIQUES DU B. MESAENTERICUS BOIDIN

Le B. Mesentericus BOIDIN prend une forme variable suivant le milieu de culture. Sur un milieu riche ou sur pomme de terre, il se présente sous forme de batonnets épais, grands et fréquemment disposés en chaîne. C'est un aérobie strict. Sa température optimum est 37°C.

Sur pomme de terre, il donne une culture blanc jaunâtre, plissée à élevures arrondies. Le voile sec au début de la pousse devient ensuite très visqueux.

Sur gélose, il donne un enduit plus sec mais également plissé.

Sur milieu liquide, il présente une zooglye abondante formant un voile épais et plissé à la surface.

Il liquéfie la gélatine.

Il possède les caractéristiques des bacilles Gram positif.

Il donne rapidement des spores placées à chaque extrémité du batonnet. Ces spores ne se colorent par le Ziehl qu'après un mordantage très énergique à l'acide chromique. Les spores sont très résistantes à la chaleur; leur température mortelle est 130°C.

TECHNIQUE ACTUELLE DE FABRICATION INDUSTRIELLE DE LA RAPIDASE

Le milieu de culture est préparé à partir de tourteaux d'arachide, de soja ou de ricin que l'on soumet à une hydrolyse acide à l'ébullition. Par passage au filtre presse, on sépare la drèche et on envoie le moût clair dans un cuiseur. Il y est neutralisé, additionné de sels minéraux et stérilisé.

Refroidi aseptiquement, le moût estensemencé au moyen d'un ballon de culture de B. Mesentericus BOIDIN préparé au laboratoire. Un ballon de 250 cm suffit pourensemencer 2.000 litres de liquide. Ce bouillon de culture est alors envoyé de façon aseptique dans des appareils de fermentation, préalablement stérilisés et comportant une série de plateaux de forme et de profondeur particulièrement étudiées. On abandonne la culture à elle-même à 35-37°C. Pour éviter toute infection que causerait une rentrée d'air pollué, on maintient durant toute la durée de la pousse dans les appareils une légère pression d'air stérile.

Après 24 heures, le développement intense des bactéries provoque une élévation de température susceptible de nuire au développement du microbe et à la sécrétion diastasique; aussi maintient-on la température dans des limites convenables, en refroidissant les appareils par ruissellement d'eau. Le liquide nutritif s'épuisant progressivement le développement bactérien diminue, la température s'abaisse.

La sécrétion diastasique atteint son maximum 4 à 6 jours après l'ensemencement. On sépare alors le jus diastasique des zooglyphes et des résidus insolubles par filtration ou décantation.

La solution claire amenée à un pouvoir standard constitue le produit enzymatique commercial de forme liquide. On peut obtenir des produits plus concentrés en évaporant cette solution dans le vide à basse température. On peut aussi obtenir des produits secs par précipitation de la diastase.

CHAPITRE II

METHODE GENERALE DE TRAVAIL

Notre travail a consisté à donner à la bactérie des éléments divers pour sa croissance et à évaluer les variations correspondantes de la sécrétion diastasique, par mesure du "pouvoir Liquéfiant" à 75°C. Pour cela il nous a fallu, après des essais préliminaires, adopter un milieu nutritif "sensible" qui puisse servir de base à notre étude.

Nous avons d'abord retenu la formule suivante que nous désignons dans nos travaux sous le nom de "formule D".

Fécule de pomme de terre virée à la Rapi-dase jusqu'au stade "dextrines"	50 g.
Citrate biammonique	30 g.
Phosphate monopotassique cristallisé	2 g.
Phosphate disodique cristallisé	3 g.
Sulfate de Calcium	1 g.
Sulfate de Magnésium	1 g.
Sulfate ferreux	20 mg.
Sulfate de Manganèse	2,5 mg.
Eau distillée	q.s. 1 lit.

Par la suite, pour économiser le citrate d'ammonium dont nous n'avions qu'une faible réserve, nous avons utilisé la formule F identique à la formule D à la seule différence que la moitié du Citrate est remplacée par une quantité de lactate d'ammonium équivalente en Azote.

Pour nos essais nous avons fait varier les divers éléments de la solution nutritive et nous en avons introduit de nouveaux, en mesurant l'effet produit sur la sécrétion diastasique. C'est ce que nous exposerons dans les chapitres suivants. Donnons auparavant des indications sur la préparation des milieux, la pousse, le dosage et le chiffrage des résultats.

PREPARATION DU MILIEU NUTRITIF - POUSSSE

Le milieu nutritif est préparé par prélèvements à la pipette de solutions de titres connus des divers éléments désirés (à l'exception des produits trop peu solubles ou peu stables en solution qui sont pesés). Les produits employés sont, sauf indications contraires, les produits purs du commerce. Ayant manqué de citrate d'ammonium pur commercial, nous en avons préparé à partir d'acide citrique et d'ammoniaque. Nous avons également préparé le lactate d'ammonium à partir d'acide lactique et d'ammoniaque.

Ayant choisi, une fois pour toutes, les Dextrines comme matières hydrocarbonées, voici comment nous procédons à leur préparation à partir de fécule de pomme de terre. Dans un ballon, nous introduisons le poids désiré de fécule avec deux fois son volume d'eau et nous agissons soigneusement pour obtenir un lait sans grumeaux. Nous ajoutons 0,1% de Super-Rapidade dissoute à part dans un peu d'eau et agissons fortement. On ferme alors le ballon par un bouchon traversé d'un long tube de verre. On porte à 75° C au B.M. et on fait tourner le tube entre ses doigts jusqu'à empesage. La liquéfaction suit quelques instants après. On laisse 30 minutes à 75°C puis on refroidit et on joint ce jus aux autres éléments nutritifs.

Le moût est alors ajusté au pH 6 par addition de soude puis au pH 6,3 par addition d'ammoniaque. Lorsque nous utilisons des solutions de citrate et de lactate d'ammonium, nous nous arrangeons pour que leur pH soit aux alentours de 6,3. Une correction éventuelle est faite à la soude ou à l'acide sulfurique. Nos pH ont été mesurés au début de nos travaux au potentioph-mètre Jouan puis au potentioph-mètre Uesi.

On répartit alors le liquide dans des petits ballons de 250 centimètres-cube à raison de 50 centimètres-cube par ballon. On bouche à l'ouate. On stérilise à l'autoclave 20 minutes à 1,2 Kg.

Les ballons sont ensemencés à partir d'une culture de *B. Mesentericus* BOIDIN âgée de 24 heures et laissée à l'étuve à 36°C. pendant 6 jours. Dès 24 heures, le voile apparaît puis se plisse. On obtient peu à peu une zooglye abondante formant un voile épais et plissé à la surface. Par filtration sur coton, on sépare la zooglye du jus diastasique sur lequel on détermine le Pouvoir Liquéfiant par la méthode que nous allons exposer.

DETERMINATION DU POUVOIR LIQUEFIANT A 75°C.

Le Pouvoir Liquéfiant à 75°C. (par abréviation P.L. 75) s'exprime par le nombre de centigrammes de fécule standard (mélange de fécule de pomme de terre et de dextrine blanche) que peut liquéfier 1 centimètre-cube ou 1 gramme de la substance essayée.

On délaie 10 g. de fécule standard dans 15 cm³ d'eau distillée. Le volume est de 22 cm³. On prélève à la pipette des fractions de 2,2 cm³ du mélange que l'on introduit dans des tubes de verre ayant une longueur de 27 cm environ et un diamètre intérieur de 7,5 mm. Ces tubes sont jaugés à 4 cm³.

On ajoute une certaine quantité de liquide diastasique à essayer et on complète au volume de 4 cm³ avec de l'eau distillée.

On place dans chaque tube un agitateur très fin. On agite pour avoir un mélange parfait et on plonge les tubes dans un B.M. à 75°C. On continue l'agitation jusqu'au moment de l'empesage. On maintient la température à 75°C et on reprend l'agitation dès que la liquéfaction commence. Au bout d'une heure, on place les tubes dans un B.M. bouillant, on agite pendant quelques secondes puis on retire les agitateurs. On laisse 5 minutes dans le B.M. bouillant. On met ensuite les tubes dans un récipient renfermant de l'eau que l'on maintient à 20°C. pendant 10 minutes.

Pour juger de l'état de la liquéfaction, on incline les tubes suivant un angle de 45°. Ceux qui ont reçu une quantité suffisante de diastase se vident. Les autres restent pleins. On prend comme point le dernier tube vide.

On dilue le liquide diastasique à essayer de façon que la quantité de diastase nécessaire pour liquéfier le contenu d'un tube soit comprise entre 0,4 et 1,8 cm³. Les résultats seront alors assez nets pour pouvoir supporter la multiplication par le coefficient de dilution.

Sachant qu'un tube contient 100 eg. de fécule et connaissant la quantité de jus diastasique nécessaire pour les liquéfier on calculera facilement le Pouvoir Liquéfiant du produit essayé. Par exemple en supposant que pour liquéfier les 100 eg. de fécule, il ait fallu 1 cm³ de jus diastasique dilué au 1/1.000, le P.L. 75 sera de :

$$\frac{100 \times 1.000}{1} = 100.000$$

Cette méthode relativement simple et d'une précision de l'ordre de 10%, ce qui est suffisant pour ce genre d'essais, est couramment employée dans les laboratoires de la Société RAPIDASE.

CHIFFRAGE DES RESULTATS

Vu les variations d'une souche à l'autre, chaque série d'essais comportait, comme témoin, une des formules de base mentionnées plus haut.

Pour faciliter la comparaison des essais entre eux, nous avons défini par "Activité Diastasique" (par abréviation A.D.) le rapport entre le P.L. de l'essai contenant l'élément ajouté ou modifié et le P.L. du témoin. Ce rapport est multiplié :

- par 300 si le témoin est la formule D
- par 350 si le témoin est la formule F

Ces chiffres n'ont pas été choisis arbitrairement. Ils ont été retenus en fonction des P.L. obtenus dans un grand nombre d'essais et tiennent compte du rapport d'activité existant entre les deux formules sensibles.

Ainsi donc l'Activité Diastasique des témoins sera toujours de 300 pour la formule D et de 350 pour la formule F.

Du fait que les milieux sontensemencés à partir d'une culture sur pomme de terre, la quantité de semence introduite ne peut être rigoureusement constante. Mais il nous semble que ce facteur a son influence considérablement réduite du fait que :

- 1°/ - Nous ensemençons plusieurs ballons de même moût dont on fait le P.L. moyen.
- 2°/ - Nous laissons les ballons six jours à l'étuve. La phase de latence pendant laquelle ce facteur intervient surtout est largement dépassée.
- 3°/ - Nous avons répété plusieurs fois les mêmes essais et les chiffres publiés sont les moyennes des chiffres trouvés. Rappelons que pour chaque série, chacun des termes est chiffré par rapport au témoin.

N'oublions pas d'ailleurs que la méthode d'analyse n'est juste qu'à 10% près, ce qui rend caduque une extrême rigueur sur les autres facteurs.

CHAPITRE III

INFLUENCE DU PH ET DE LA DUREE DE LA POUSSE

SUR L'ACTIVITE DIASTASIQUE

INFLUENCE DU PH

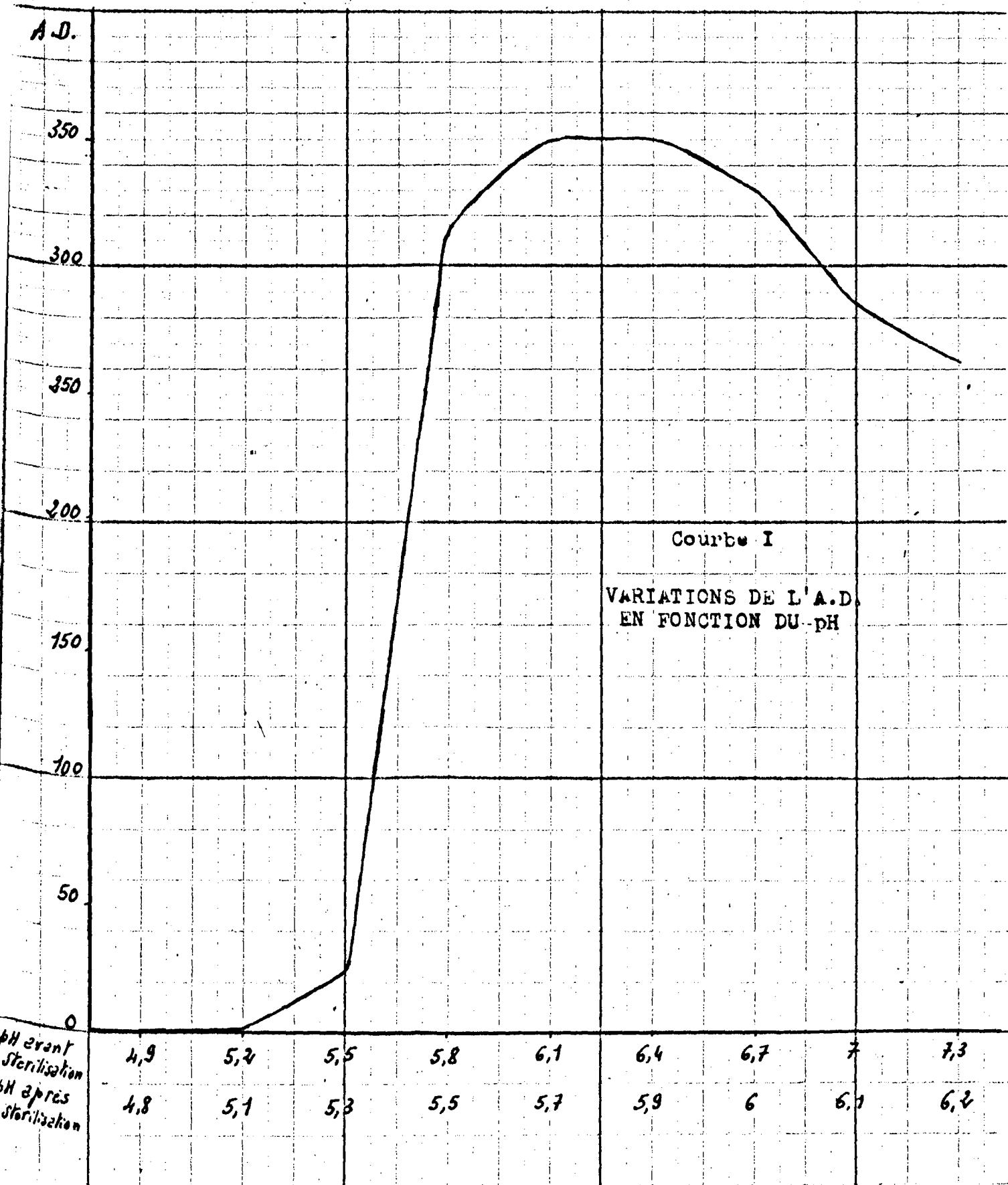
Par addition de Soude ou d'acide sulfurique, des fractions d'un même moût ont été ajustées à des pH différents. Après la stérilisation, on a ouvert un ballon pour une nouvelle mesure du pH. Les autres ballons ont été ensemencés et après 6 jours de pousse on a déterminé le pH et le P.L. du jus diastasique.

Le tableau suivant et la courbe I rendent compte des résultats obtenus.

PH AVANT STERILISATION	PH APRES STERILISATION	PH APRES POUSSE	A.D.
4,9	4,8	4,8	0
5,2	5,1	5	0
5,5	5,3	5,9	25
5,8	5,25	7,6	315
6,1	5,7	7,95	350
6,4	5,9	8	350
6,7	6	8,1	329
7	6,1	8,25	285
7,3	6,2	8,4	263

On constate donc que :

- 1°/ - la stérilisation fait tomber le pH d'autant plus que le pH initial est plus élevé.



- 2°/ - la pousse n'est possible que pour un pH après stérilisation de 8,3 mais que pour avoir une A.D. intéressante il faut pratiquement se trouver au-dessus de 8,5.
- 3°/ - le maximum d'A.D. est obtenu avec un pH initial de 8,1 à 8,4. Pour nos essais nous avons retenu 8,3.

INFLUENCE DE LA DUREE DE LA POUSSE

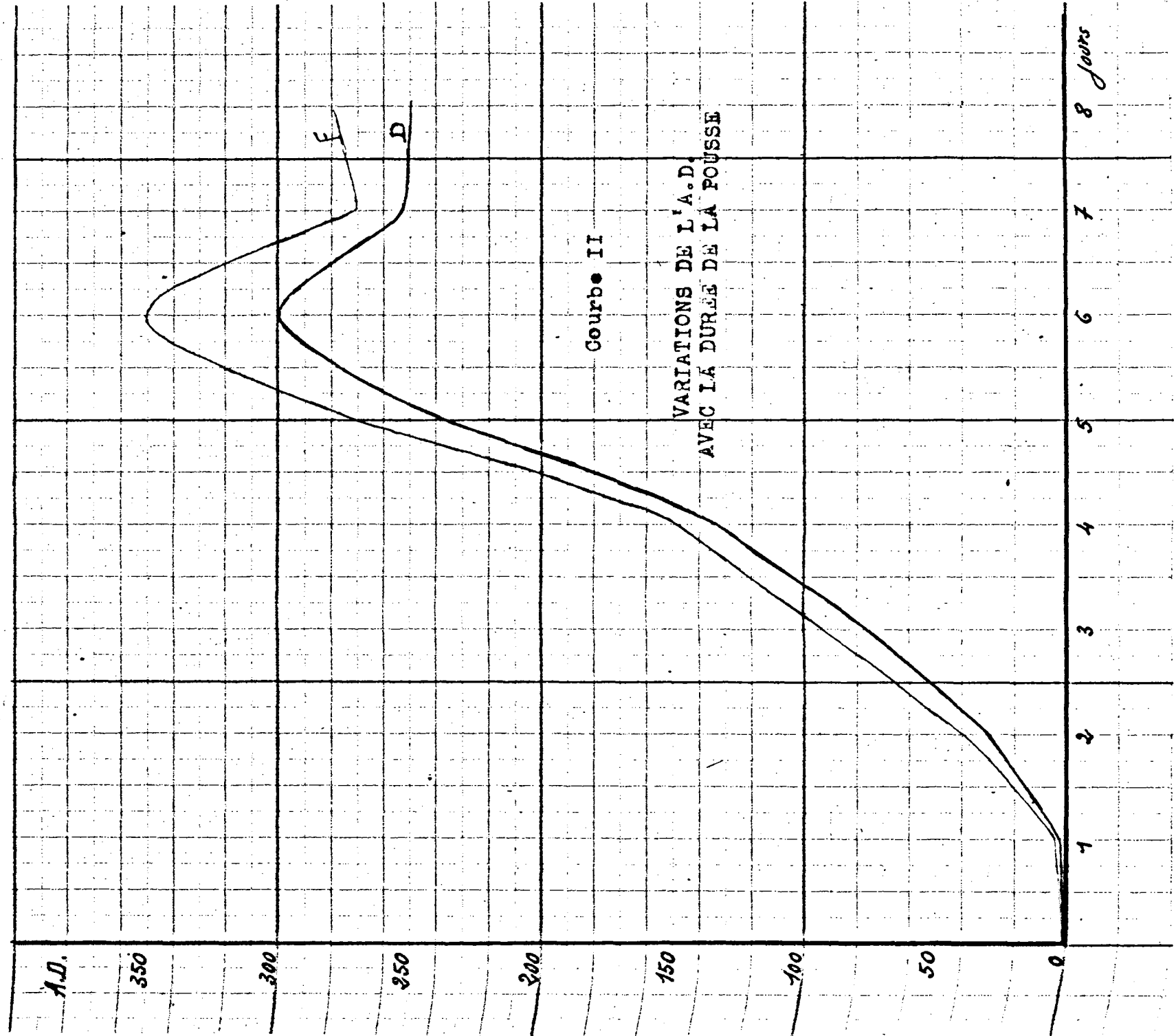
Pour nous rendre compte de l'allure de la sécrétion diastase en fonction du temps de pousse, nous avons ensimencé un grand nombre de ballons d'un même moût puis avons procédé chaque jour à la détermination du P.L. et du pH du jus de quelques ballons. Nous donnons les résultats pour les formules de base D et F dans le tableau suivant (courbe II). Les pH n'ont qu'une valeur relative.

<u>NOMBRE DE JOURS</u> -----	<u>FORMULE D</u>		<u>FORMULE F</u>	
	<u>pH</u> -----	<u>A.D.</u> -----	<u>pH</u> -----	<u>A.D.</u> -----
1	6,2	2	6,2	2
2	7	29	7,3	38
3	7,1	76	7,4	91
4	7,45	132	7,6	147
5	7,9	238	8	270
6	8,2	300	8,1	350
7	8,2	250	8,35	270
8	8,6	250	8,65	280

De ces chiffres il se dégage que :

- 1°/ - C'est entre le quatrième et le cinquième jour que la sécrétion est la plus active. L'A.D. augmente environ de 80% du quatrième au cinquième jour.
- 2°/ - C'est au sixième jour que l'A.D. atteint son maximum. On constate ensuite une liquéfaction progressive des capsules bactériennes. La coagulée perd sa consistance. L'A.D. baisse.
- 3°/ - Dès le deuxième jour la formule F affirme sa supériorité sur la formule D. Nous en reparlerons au chapitre suivant quand nous étudierons l'influence de la qualité des aliments azotés.

76



CHAPITRE IV

INFLUENCE DE LA QUANTITE ET DE LA QUALITE

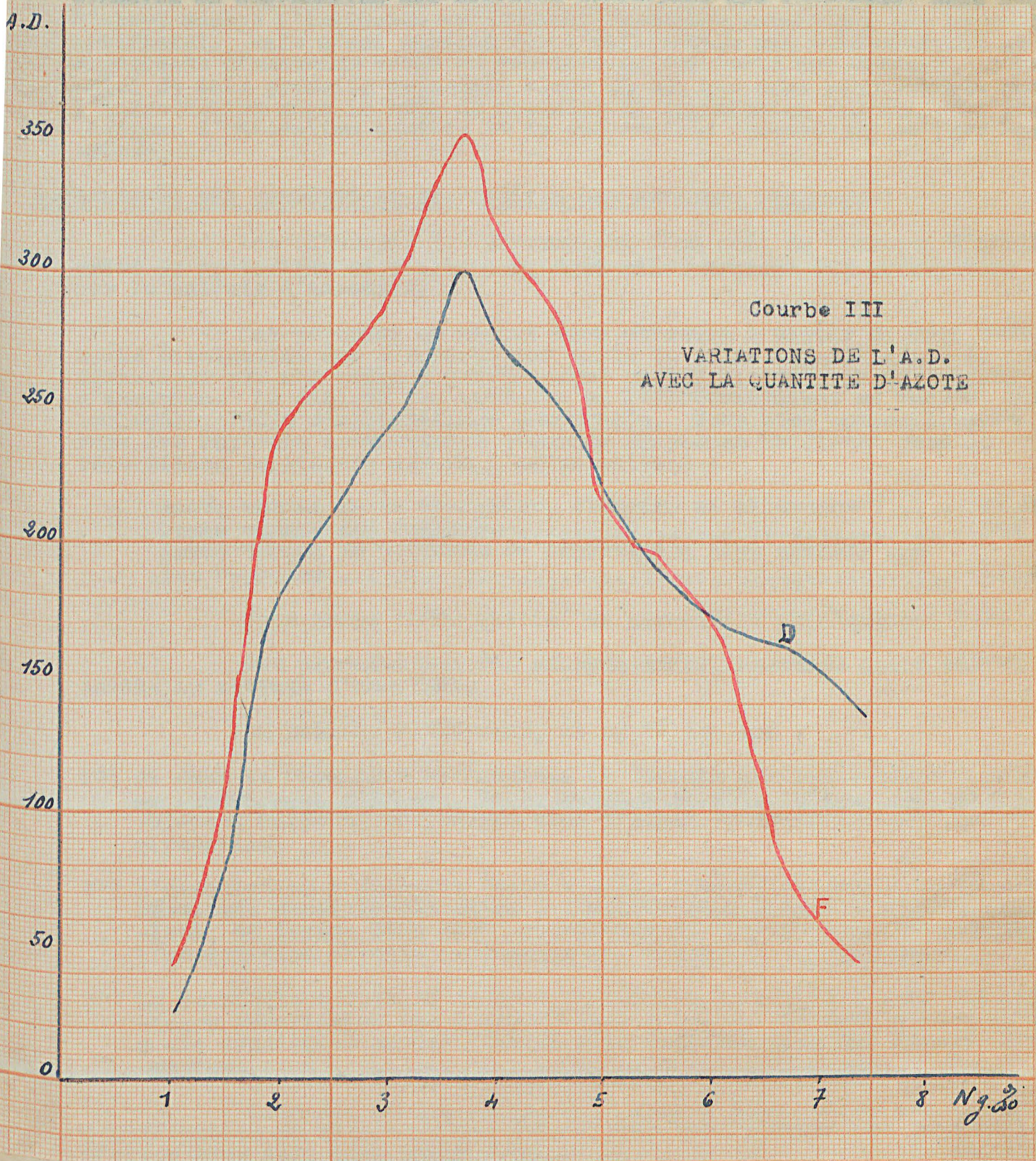
DES ALIMENTS AZOTES

Pour nos formules de base comme pour nos divers essais nous avons retenu la dose de 8,71 g. d'Azote par litre, ce qui correspond à la quantité apportée par 80 g. de citrate biammonique. En effet comme le montre le tableau ci-dessous (courbe III), c'est pour ce taux que l'A.D. est la meilleure.

Les résultats donnés, moyennes de plusieurs essais, concernent la formule D dans laquelle tout l'Azote est introduit sous forme de citrate d'ammonium et la formule F dont l'Azote vient pour une moitié de citrate et pour une moitié de lactate d'ammonium. Les pH donnés n'ont qu'une valeur relative.

Il faut noter la chute de l'A.D. beaucoup plus rapide dans le cas de la formule F que pour la formule D, lorsque la quantité d'Azote s'accroît.

<u>QUANTITE D'AZOTE</u> en g. par litre	<u>FORMULE D</u>		<u>FORMULE F</u>	
	<u>pH</u>	<u>A.D.</u>	<u>pH</u>	<u>A.D.</u>
1	5,95	24	6,1	42
1,5	6	83	6,5	109
2	7	153	7,1	243
2,5	7,2	210	7,2	263
2,85	7,4	236	7,4	280
3	8,2	240	8	289
3,35	8,3	269	8,3	324
3,71	8,36	300	8,3	350
3,85	8,4	285	8,4	331
4	8,4	273	8,4	312
4,5	8,5	255	8,5	285
4,85	8,5	233	8,5	245
5	8,5	216	8,5	213
5,5	8,6	189	8,5	193
6	8,7	171	8,5	170
6,7	8,7	161	8,5	74
7,4	8,7	135	8,5	47



INFLUENCE DE LA QUALITE DES ALIMENTS AZOTES

Le moût industriel ne comportant comme source d'Azote que des produits de dégradation des matières protéiques des tourteaux, nous avons d'abord essayé l'influence qu'auraient de telles substances sur le moût artificiel. Mais c'est surtout sur l'utilisation des sels minéraux et organiques d'ammonium seuls ou combinés qu'ont porté nos travaux. L'emploi de tels produits répondait mieux au but que nous poursuivions que l'introduction dans le moût de produits de dégradation des matières protéiques d'obtention pénible et de composition inconstante ou trop complexe.

A-INFLUENCE DES PRODUITS DE DEGRADATION DES MATIERES PROTEIQUES

Les Albumoses (1) provenaient d'un moût de tourteau d'Arachide privé de Syntonine et d'Albumine, dont elles avaient été précipitées par le Sulfate d'ammonium.

Les peptones ne purent être obtenues à partir du même moût après élimination des Albumoses par suite de notre impossibilité de nous débarrasser par une méthode suffisamment rapide et efficace du Sulfate d'ammonium. La dialyse par membrane ou l'électrodialyse ne purent être employées, faute d'appareillage convenable. Nous nous sommes tournés vers les Peptones commerciales dénommées "Peptones Vaillant" dont la répartition de l'Azote est de l'ordre suivant :

Azote venant de la Syntonine, Albumine et Albumoses	12,5%
Azote venant des Peptones	36%
Azote venant de produits de dégradation plus avancés que les Peptones	51,5%

Nous avons enfin utilisé du glycocolle chimiquement pur.

Ces produits ont été essayés seuls, associés entre eux ou joints au citrate d'ammonium.

Du tableau ci-dessous, il se dégage que :

- 1°) Si dans la formule D on remplace le Citrate par les Albumoses pour un apport égal d'Azote, l'A.D. diminue de 50%. L'A.D. est sensiblement nulle si on fournit tout l'Azote en Peptones Vaillant ou en glycocolle.
- 2°) L'association à richesse égale d'Azote Citrate-Albumoses donne des résultats sensiblement égaux à l'association Citrate-Peptones Vaillant et toutes deux sont supérieures au Citrate seul. Par contre l'association Citrate-Glycocolle est nettement inférieure.
- 3°) La combinaison Citrate-Albumoses-Peptones se révèle bonne. La Meilleure répartition est à apport égal d'Azote. Il semble donc qu'il y ait avantage à donner l'azote à la bactérie sous des formes différentes.

Bien des essais auraient pu encore être faits, par exemple l'utilisation de divers acides aminés mais nous n'avons pas jugé utile d'aller plus loin dans cette voie.

(1) Nous avons utilisé les termes: Syntonine, Albumoses, Peptones, bien qu'ils ne soient plus employés aujourd'hui, parce qu'ils étaient commodes pour désigner le fractionnement successif de la molécule de protéine.

LES 3,71 g. d'AZOTE SONT FOURNIS PAR :

	<u>A.D.</u>
1°) Citrate d'ammonium	360
Albumoses d'Arachide	156
Peptones Vaillant	10
Glycocolle	0
2°) Albumoses (50%) Peptones (50%)	96
Citrate (50%) Albumoses (50%)	370
Citrate (50%) Peptones (50%)	370
Citrate (50%) Glycocolle (50%)	136
3°) Citrate (1/3) Albumoses (1/3) Peptones (1/3)	412
Citrate (41,7%) Albumoses (41,7%) Peptones (16,6%)	380
Citrate (41,7%) Albumoses (16,6%) Peptones (41,7%)	343
Citrate (50%) Albumoses (25%) Peptones (25%)	390

B-INFLUENCE DES SELS MINÉRAUX ET ORGANIQUES D'AMMONIUM

Afin de limiter nos essais, nous avons toujours apporté 3,71 gr. d'azote par litre au moût. Les sels d'ammonium ont été dosés avant leur emploi. La quantité introduite dans le moût a donc dépendu de leur teneur en azote.

1 - L'Azote est fourni par un seul sel d'ammonium.

SELS D'AMMONIUM UTILISÉS

	<u>A.D.</u>
Citrate d'ammonium	300
Tartrate d'ammonium	60
Nitrate d'ammonium	25
Lactate d'ammonium	0
Sulfate d'ammonium	0
Oxalate d'ammonium	0
Chlorure d'ammonium	0

On voit que le citrate d'ammonium possède une supériorité écrasante sur les autres sels, qui ne donnent que des résultats médiocres ou nuls. Il semble que cette supériorité soit due à la propriété du citrate de former avec les phosphates et le sulfate de Calcium des sels complexes solubles.

2 - L'Azote est fourni par l'association de deux ou trois sels ammonia-
-caux.

Le tableau ci-dessous indique l'A.D. obtenue avec diverses
associations. Chaque sel apporte une fraction indiquée dans le tableau
de la quantité d'azote toujours invariable (3,71 g. par litre).

<u>CITRATE</u>	<u>CHLORURE</u>	<u>LACTATE</u>	<u>SULFATE</u>	<u>TARTRATE</u>	<u>NITRATE</u>	<u>OXALATE</u>	<u>A.D.</u>
3/3							300
2/3	1/3						300
1/2	1/2						170
1/3	2/3						52
1/3	1/3	1/3					330
2/3		1/3					273
1/2		1/2					350
1/3		2/3					0
2/3			1/3				275
1/2			1/2				285
1/3			2/3				289
1/2		1/4	1/4				340
1/3		1/3	1/3				350
2/3				1/3			294
1/2				1/2			335
1/3				2/3			335
3/4					1/4		290
1/2					1/2		185
1/3					2/3		135
1/2						1/2	0

De ces résultats, il se dégage que :

- 1°) Les associations Citrate-Nitrate et Citrate-Chlorure sont sans
intérêt puisqu'elles donnent des résultats inférieurs au Citrate
seul. Toutefois, l'association Citrate-Chlorure-Lactate donne un
assez bon résultat mais inférieur à celui que donne la combinaison
Citrate-Lactate.

- 2°) L'association Citrate-Oxalate ne permet aucune pousse, le Calcium étant précipité à l'état d'oxalate de calcium que la bactérie ne semble pas pouvoir utiliser. Nous verrons plus loin que sans addition du sulfate de Calcium au moût, on obtient quand même une pousse notable. Il est probable que la fécule ou quelques autres produits ajoutés contiennent de petites quantités de calcium suffisantes pour la pousse. En présence d'oxalate, le calcium est précipité en totalité, la pousse est impossible.
- 3°) L'association Citrate-Lactate à égalité d'apport d'Azote a été largement expérimentée et est très avantageuse puisqu'elle donne une A.D. de 350 contre 300 au citrate seul. Nous avons retenu cette association dans la formule de base F. Il faut remarquer que lorsqu'on augmente la dose de lactate au détriment de celle du citrate, l'A.D. baisse et s'annule lorsque les 2/3 de l'azote sont fournis en lactate.
- 4°) L'association Citrate-Tartrate donne de bons résultats mais ne pourrait que difficilement être utilisée industriellement, vu le prix de revient du tartrate. L'association Citrate-Lactate est plus avantageuse.
- 5°) De l'association citrate-sulfate on ne tire pas d'amélioration mais par contre une association à égalité d'apport d'azote entre le Citrate, le lactate et le sulfate donne une A.D. de 350. Le sulfate étant un produit moins onéreux que le citrate et le lactate, l'économie réalisable serait appréciable.

-1-1-1-1-1-1-1-

CHAPITRE V

INFLUENCE DES PHOSPHATES

INFLUENCE DE LA QUANTITE DE PHOSPHATE DISODIQUE

Si laissant inchangée la quantité de phosphate mono-potassique (2 g. par litre) on fait varier la quantité de phosphate disodique on obtient les résultats suivants. Il est bien entendu que le pH initial est toujours 6,3.

<u>PHOSPHATE DISODIQUE</u> en g. par litre	<u>A.D.</u> sur formule D
0	265
1	275
2	285
3	300
4	249
5	233

La dose de 3 g. par litre qui est celle retenue pour les formules de base est donc la plus convenable.

INFLUENCE DE LA QUANTITE DE PHOSPHATE MONOPOTASSIQUE

Si laissant inchangée la quantité de phosphate disodique (3 g. par litre), on fait varier la quantité de phosphate monopotassique, on obtient les résultats suivants (pH initial = 8,3)

<u>PHOSPHATE MONOPOTASSIQUE</u> en g. par litre	<u>A.D.</u> sur formule D
0	30
1	249
2	300
3	310
4	335

L'augmentation de la dose de phosphate monopotassique entraîne un accroissement de l'A.D. Il est fort probable que cette amélioration soit due à l'influence de l'ion Potassium, car nous avons pu substituer dans les formules D ou F le sulfate de Potassium au phosphate monopotassique (pour un même apport d'ions Potassium) sans qu'il s'en suive des variations notables d'A.D.

INFLUENCE DE LA VARIATION COMBINEE DES PHOSPHATES

1°) Si l'on fait croître en même temps les doses de phosphate disodique et de phosphate monopotassique, on constate que la proportion adoptée dans les formules de base est la meilleure, à savoir:

2 g. par litre de phosphate monopotassique

3 g. par litre de phosphate disodique

Notons que sans phosphates l'A.D. est faible.

<u>PHOSPHATE MONOPOTASSIQUE</u> en g. par litre	<u>PHOSPHATE DISODIQUE</u> en g. par litre	<u>A.D.</u>
0	0	27
1	2	230
2	3	300
3	4	258

2°) Si l'on fait croître le phosphate monopotassique et décroître le phosphate disodique, l'A.D. croît lentement :

<u>PHOSPHATE MONOPOTASSIQUE</u> en g. par litre	<u>PHOSPHATE DISODIQUE</u> en g. par litre	<u>A.D.</u>
1	4	257
2	3	300
3	2	316
4	1	341

CHAPITRE VI

INFLUENCE DE DIVERS CATIONS

Nous avons étudié l'influence de divers sels métalliques. Dans bien des cas, il est possible que l'action améliorante ou inhibitrice du sel soit due non seulement au cation mais aussi à l'anion. Nous n'avons pas cherché à mettre particulièrement en évidence leur influence respective. Cela nous aurait entraîné trop loin. Toutefois en comparant l'action de produits ayant de commun soit l'anion soit le cation, on pourra déduire parfois si c'est à l'anion ou au cation qu'il faut attribuer l'effet constaté.

INFLUENCE DU SULFATE FERREUX

Nous avons constaté que l'addition de sulfate ferreux améliore l'activité diastasique.

<u>SULFATE FERREUX</u> en mg. par litre	<u>A.D.</u> sur formule F
0	325
10	335
15	350
20	350
50	350
100	350
250	210

INFLUENCE DU SULFATE DE MANGANESE

Les résultats obtenus par addition de sulfate de manganèse sont légèrement différents suivant que l'on considère la formule D ou la formule F. Pour la première, la dose optimum est de 2,5 mg. par litre, pour la seconde elle est de 1,25 mg.

<u>SULFATE DE MANGANESE</u> en mg. par litre	<u>A.D.</u> sur formule D
0	258
0,625	278
1,25	286
2,5	300
5	300
10	300
50	300

SULFATE DE MANGANESE
en mg par litre

A.D.
sur formule F

0	275
0,625	275
1,25	270
2,5	250

INFLUENCE DU SULFATE DE ZINC

Nous n'avons constaté aucune amélioration de l'activité diastasique en ajoutant au moût du sulfate de zinc. Au contraire dès que l'on dépasse la dose de 1 mg. par litre, l'A.D. baisse progressivement.

Les résultats donnés dans le tableau ci-dessous concernent la formule F.

SULFATE DE ZINC

A.D.

0	350
0,2	350
0,5	350
0,6	350
0,8	350
1	333
2	334
3	333
5	327
10	318
15	298
20	327
25	306
30	310
40	304
50	294

INFLUENCE DU SULFATE DE CUIVRE

L'addition de sulfate de cuivre au moût améliore sensiblement l'A.D. jusqu'à la dose de 7,5 mg. par litre. Au delà de cette quantité, l'A.D. décroît et le sulfate de cuivre empêche toute pousse de quelque importance dès 60 mg par litre.

Le tableau suivant donne les résultats concernant la formule 1

<u>SULFATE DE CUIVRE</u> <u>en mg par litre</u>	<u>A.D.</u>
0	350
0,5	352
1	372
2	381
3	381
4	390
5	390
6	399
7,5	403
10	395
12	387
15	385
20	350
25	289
30	166
40	88
60	4
80	2
100	2
120	0
160	0

INFLUENCE DU SULFATE DE CALCIUM

Grâce à la propriété qu'a le citrate d'ammonium de former avec les phosphates et le sulfate de calcium des complexes solubles, il est possible de dépasser notablement le coefficient de solubilité du sulfate de calcium dans la formule D et d'améliorer l'A.D. Il est pratiquement inutile de dépasser la dose de 3 g. par litre si non le sulfate reste inemployé au fond du ballon et l'A.D. ne s'élève plus.

Voici les résultats obtenus avec la formule D :

<u>SULFATE DE CALCIUM</u> <u>en g. par litre</u>	<u>A.D.</u>
0	240
1	300
2	337
3	352
4	352
5	352
6	352

Avec la formule F, dans laquelle la dose de citrate est réduite de moitié, on ne peut dépasser la dose de 2 g. par litre. Pratiquement même, nous avons retenu la dose de 1,5 g. dans nos conclusions ce qui permet une dissolution aisée et assure une excellente A.D.

<u>SULFATE DE CALCIUM</u> <u>en g. par litre</u>	<u>A.D.</u>
1	350
1,5	410
2	400
3	375
4	350

On voit nettement l'influence que joue le citrate d'ammonium dans la dissolution du sulfate de calcium: dans la formule F qui contient la moitié moins de citrate que la formule D, la dose optimum de sulfate est deux fois plus faible que pour cette dernière formule.

INFLUENCE DU LACTATE DE CALCIUM

1°) Dans la formule D :

Si dans cette formule on remplace le sulfate de calcium par du lactate de calcium (2,25 g. de lactate de calcium équivalent à 1 g. de sulfate de calcium) on ne constate pas de variation nette d'A.D.

2°) Dans la formule F :

On n'a aucun avantage à remplacer dans la formule F le sulfate par le lactate de calcium comme le montre le tableau suivant :

<u>LACTATE DE CALCIUM</u> en g. par litre	<u>A.D.</u>	A.D. obtenue par une quantité équivalente en Ca de sulfate de Calcium
2,25	350	<u>350</u>
3,375	395	410

INFLUENCE DU CHLORURE DE CALCIUM

1°) Dans la formule D :

Si on remplace dans la formule D le sulfate par le chlorure de calcium, on améliore l'A.D.

<u>CHLORURE DE CALCIUM</u> en g. par litre	<u>A.D.</u>	A.D. obtenue avec une quantité équivalente en Ca de sulfate de Calcium
0,816	333	<u>300</u>
1,632	337	337
2,448	428	352
3,264	390	352

2°) Dans la formule F :

Les résultats sont à peu près de même ordre qu'avec le sulfate de calcium. Mais pour des teneurs fortes en Ca, la baisse de l'A.D. est plus sensible pour le chlorure.

<u>CHLORURE DE CALCIUM</u> en g. par litre	<u>A.D.</u>	A.D. obtenue avec une quantité équivalente en Ca de sulfate de Calcium
0,816	360	<u>350</u>
1,224	410	410
1,632	400	400
2,448	380	375
3,264	320	360

INFLUENCE DU SULFATE DE MAGNESIUM

1°) Sur la formule D

<u>SULFATE DE MAGNESIUM</u> <u>en g. par litre</u>	<u>A.D.</u>
0	240
1	300
1,5	334
2	334
2,5	300
3	300
4	300

2°) Sur la formule F

<u>SULFATE DE MAGNESIUM</u> <u>en g. par litre</u>	<u>A.D.</u>
0	255
0,25	280
0,5	344
1	350
1,5	360
2	360
3	306

On constate que pour l'une et l'autre formule, la dose optimum se situe vers 1,5 g. par litre, mais le bénéfice à réaliser par rapport à la dose de 1 g. des formules de base est faible. Il ressort des chiffres que la présence de magnésium est nettement favorable.

INFLUENCE DU SULFATE DE POTASSIUM

On améliore l'A.D. en ajoutant au moût du sulfate de potassium comme le montre le tableau suivant :

<u>SULFATE DE POTASSIUM</u> <u>en g. par litre</u>	<u>A. D.</u>
0	300
0,5	345
1	336
2	318
4	318

INFLUENCE DU CHLORURE DE POTASSIUM

Nous avons ajouté à la formule D du chlorure de potassium, à d'assez fortes doses pour juger de l'effet produit sur l'A.D. au cas où nous voudrions employer ce produit pour accroître la densité du moût.

Nous nous heurtons vite au rôle inhibiteur de l'ion chlore.

<u>CHLORURE DE POTASSIUM</u> en g. par litre	<u>A.D.</u>
0	300
5	300
10	277
20	252
40	210
60	150

INFLUENCE DU CHLORURE DE SODIUM

Nous avons également étudié l'action du chlorure de sodium à des doses relativement fortes. Pour des doses inférieures à 20 g. par litre les résultats sont plus intéressants qu'avec le chlorure de potassium puisqu'on constate une amélioration de l'A.D. Par contre la chute de l'A.D. est très brutale au delà de 20 g. par litre.

<u>CHLORURE DE SODIUM</u> en g. par litre	<u>A.D.</u>
0	300
5	352
10	360
20	300
30	232
40	165
50	20
60	15

INFLUENCE DU MOLYBDATE D'AMMONIUM

A faible dose le molybdate améliore légèrement l'A.D. mais des quantités plus fortes ne la modifient pas.

<u>MOLYBDATE D'AMMONIUM</u> en mg. par litre	<u>A.D.</u> sur moût D
0	300
1	315
5	330
10	315
20	300
30	300
40	300
60	300
80	300

-1-1-1-1-

CHAPITRE VII

INFLUENCE DE DIVERS ACTIVATEURS

Nous avons ajouté au moût différents corps capables de favoriser la croissance de la bactérie et la sécrétion diastasique:

l'acide p-aminobenzoïque
le thioglycolate d'ammonium
l'acide Indolacétique
l'acide phénylacétique
la colchicine
les vitamines B1, B2 et PP

Les résultats fort variables suivant le corps étudié, sont publiés dans ce chapitre. Nous avons donné à ces corps le qualificatif d'"activateur" ou de "stimulant" et non de "facteur de croissance", puisqu'il faut réserver le terme de "facteur de croissance" à une substance dont l'organisme considéré est incapable de réaliser la synthèse et en l'absence de laquelle, toute multiplication est impossible. Ce n'est pas le cas pour les produits étudiés.

INFLUENCE DE L'ACIDE p-AMINOBENZOIQUE

On constate une amélioration très nette de l'activité diastatique finale si on ajoute à la formule D de l'acide p-aminobenzoïque. Nous avons fait avec ce produit de très nombreux essais. Ils ont montré que c'est pour la dose de 10 mg par litre que l'amélioration est maximum

<u>ACIDE p-AMINOBENZOIQUE</u> en mg. par litre	<u>A.D.</u>
0	300
2,5	330
5	352
7,5	375
10	400
12,5	400
15	360
20	360
25	360
50	360
100	375
200	360
300	354
400	345

L'action de l'acide p-aminobenzoïque est d'autant plus marquée que le milieu nutritif est plus pauvre ou qu'un facteur risque d'entraver la pousse de la bactérie (par exemple pH un peu trop faible ou trop élevé, élément indispensable en trop faible dose, trace d'inhibiteur souche défectueuse...)

Ainsi un moût pour lequel l'azote est fourni pour moitié par du citrate d'ammonium et pour moitié par du glycérol (élément peu favorable à la pousse de la bactérie) a une A.D. de 136 contre 300 au témoin. Par addition de 10 mg. d'acide p-aminobenzoïque, l'A.D. s'est relevée de 136 à 246 (soit 73% d'amélioration). Une addition semblable au témoin ne relève que de 33,8% l'A.D.

Autre exemple: nous avons eu une souche affaiblie qui ne donnait par rapport à une souche normale qu'une A.D. de 165 au lieu de 300. Par addition de 10 mg. par litre d'acide p-aminobenzoïque nous avons relevé l'A.D. de 165 à 350 (51,8% d'amélioration). Pour la souche normale une telle addition porte l'A.D. de 300 à 400 soit 33,8% d'amélioration.

Dans un moût complexe, comme celui à base de tourteaux
l'action de l'acide p-aminobenzoïque n'est pas nette ni
constante. - 23 -

INFLUENCE DU THIOLYCOLATE D'AMMONIUM

Nous avons utilisé le Thioglycolate 40% des Laboratoires
Zundel, Joliet et Cie.

Le thioglycolate n'a procuré aucun accroissement de l'A.D.,
il gêne la pousse et devient rapidement un inhibiteur.

THIOLYCOLATE D'AMMONIUM 40% en cm³ par litre

A.D. sur formule F

0	350
0,1	350
0,2	325
0,3	260
0,4	245
0,5	192
1	160
2	25
4	0
8	0

INFLUENCE DE L'ACIDE INDOLACETIQUE

L'addition de ce produit procure une légère amélioration
à faible dose, avec optimum à 0,8 mg par litre. Mais si on dépasse
1,8 mg par litre, l'A.D. devient inférieure à celle du témoin.

ACIDE INDOLACETIQUE en mg. par litre

A.D. sur formule F

0	350
0,05	355
0,2	361
0,4	394
0,6	387
0,8	396
1	370
1,5	350
2	317

....

5	332
10	298
20	289
30	298
40	298
50	298

INFLUENCE DE L'ACIDE PHENYLACETIQUE

Nous avons obtenu avec ce produit des résultats irréguliers. On peut toutefois en déduire que s'il améliore l'A.D., son effet bien-faisant est très faible.

<u>ACIDE PHENYLACETIQUE</u> en mg. par litre	<u>A.D.</u> sur Formule F
0	350
1	333
2	340
4	350
6	338
8	345
10	338
12	354
15	371
20	371
25	354

INFLUENCE DE LA COLCHICINE

Nous possédons une solution aqueuse à 1 g %. Nous avons trouvé que la colchicine a une action améliorante très nette. La dose optimum est de l'ordre de 4 mg. par litre.

Si l'on force trop la quantité de colchicine introduite l'A.D. tombe au-dessous de celle du témoin.

COLCHICINE
en mg par litre

A.D.
sur Formule F

0	350
1	406
2	406
4	420
6	376
8	376
10	376
12	368
15	357
20	315
25	301

INFLUENCE DE LA VITAMINE B 1

L'addition de cet activateur améliore l'A.D. Il faut noter que les résultats varient fortement d'un essai à l'autre. Cela doit tenir à la culture. Celles-ci ne sont pas rigoureusement identiques. Les résultats donnés sont des moyennes concernant le motif F.

VITAMINE B1
en mg. par litre

A.D.

0	350
0,01	351
0,04	343
0,07	357
0,1	390
0,4	400
0,7	400
1	400

INFLUENCE DE LA VITAMINE B2

Ce qui a été dit pour la vitamine B1 reste valable. Les moyennes publiées dans le tableau suivant semblent montrer qu'il n'y a pas intérêt à ajouter ce produit. Le résultat donné pour la dose de 0,07 mg est le seul qui dépasse le témoin. Il est un peu exceptionnel.

<u>VITAMINE B2</u> en mg. par litre	<u>A.D.</u> sur formule F
0	850
0,01	848
0,04	848
0,07	400
0,1	848
0,4	330
0,7	329
1	332

INFLUENCE DE LA VITAMINE PP

L'amélioration que l'on peut attendre de l'addition de ce produit est très faible, comme le montre le tableau suivant :

<u>VITAMINE PP</u> en mg. par litre	<u>A.D.</u> sur formule F
0	850
0,01	824
0,04	827
0,07	333
0,1	332
0,4	376
0,7	365
1	362

CHAPITRE VII

INFLUENCE DE LA DILUTION DU MOUT

Nous avons dilué le moût F à divers degrés pour nous rendre compte de l'effet produit sur l'A.D.

Il ressort des résultats indiqués au tableau ci-dessous que jusqu'à 85% de dilution, la perte en A.D. est faible. Elle ne dépasse pas 3%. Si en travail industriel, on retrouvait une aussi faible diminution d'A.D., l'économie de 15% en matières premières ne serait pas à négliger, surtout en ce qui concerne le citrate et le lactate d'ammonium.

<u>POURCENTAGE DE MOUT</u>	<u>A.D.</u>
100	350
95	350
90	341
85	341
80	329
60	210
50	180
40	105
25	57
10	24
5	6
0	0

-1-1-1-1-1-1-

CHAPITRE IX

CONCLUSIONS

La plupart des substances que nous avons étudiées ont eu un effet améliorant plus ou moins accentué sur l'A.D. On ne peut espérer adopter une formule de milieu nutritif tenant compte de la dose optimum de tous ces produits. Il est certain que les effets améliorants de ces divers corps se limiteraient les uns les autres. Nous obtiendrions une A.D. supérieure sans doute à celle du témoin mais peut-être inférieure ou à peine supérieure à celle obtenue par addition de la dose optimum d'un seul des éléments ajoutés ou modifiés. Il s'agit de choisir et de corriger, le cas échéant, à la lumière de l'expérience.

Par ailleurs nous avons obtenu dans les divers essais concernant un même corps des résultats parfois fort variables. Nous avons dégagé de ceux-ci un chiffre moyen permettant de se rendre compte de quel ordre de grandeur était son influence bonne ou mauvaise. Il ne faudrait pas vouloir donner à ces chiffres une valeur absolue. Même en rapportant les chiffres trouvés à celui d'un témoin, on n'élimine pas le fait suivant: les cultures utilisées ne peuvent être rigoureusement identiques. Comme en entre toutes les matières vivantes, il existe entre elles des différences dans leurs possibilités de synthétiser les corps qui leur sont nécessaires et dans leur appareil diastasique. Ces différences font que tel activateur ou tel élément sont plus nécessaires à l'une qu'à l'autre. C'est d'ailleurs pour échapper un peu à ce facteur que nous avons reproduit nos essais plusieurs fois, mais nous ne pourrions prétendre retrouver sur un seul essai le résultat moyen que nous avons indiqué. Le facteur "culture" influencerait par trop le résultat.

En vue d'une application industrielle, nous retenons la formule suivante :

	Fécule virée jusqu'au stade "Dextrines"	50 g.
ext	Citrate d'ammonium	q.s. pour apporter 1,855 g N
	Lactate d'ammonium	q.s. pour apporter 1,855 g N
	Phosphate monopotassique cristallisé	2 g
	Phosphate disodique cristallisé	3 g
	Sulfate de Calcium	1,5 g
	Sulfate de Magnésium	1,5 g
	Sulfate ferreux	20 mg
	Sulfate de Manganèse	1,25 mg
	Sulfate de Cuivre	7,5 mg
	Acide p-aminobenzoïque	10 mg
	Eau	q.s. 1 litre.

Ce milieu sera ajusté avant stérilisation au pH 6,3.

Une telle formule est capable de donner une A.D. de l'ordre de 450 à 500 alors que le moût utilisé actuellement dans le travail industriel donne au laboratoire une A.D. variant de 350 à 400. Le jus diastasique obtenu à partir du moût artificiel est moins coloré et moins visqueux.

Si les circonstances l'exigeaient, les modifications suivantes pourraient être apportées sans variation importante de l'A.D. :

- 1°) Diluer le moût à 85 ou 90%.
- 2°) Fournir l'Azote pour 1/3 en Citrate, pour 1/3 en lactate et pour 1/3 en sulfate d'ammonium. L'économie en acide citrique et en acide lactique, produits coûteux, serait sensible.
- 3°) Remplacement du phosphate monopotassique par du sulfate de Potassium.

Enfin il est possible que le sulfate de cuivre soit superflu pour un travail industriel dans lequel l'appareillage en cuivre cède toujours des traces de métal au moût. Par contre un peu de chlorure de Sodium pourrait avoir un heureux effet.

Nous nous étions proposé en commençant cette étude de mettre au point une formule de milieu de culture ne comportant que des éléments définis et permettant d'obtenir un développement bactérien et par là une activité diastasique au moins égale à celle donnée par la formule industrielle à base de tourteaux. Nous y avons réussi en améliorant même très sensiblement l'activité de la diastase.

Les essais étant en nombre illimité, il nous était impossible de tout essayer. Le terrain n'est que partiellement défriché. C'est un peu à la fois, par d'autres travaux et en suivant les indications de l'expérience que l'on pourra perfectionner encore ce mode de culture du *B. Mesentericus* BOIDIN et exalter davantage l'activité diastasique.

BIBLIOGRAPHIE

- A. BOIDIN et J. EFFRONT - Méthode et appareil pour la fabrication des diastases et toxines par les ferments oxydants (B.F. n° 471.546 : 1913)
- A. BOIDIN et J. EFFRONT - Procédés et appareils pour la fabrication des diastases (B.F. n° 563.932 1922).
- Société RAPIDASE - Perfectionnements dans la préparation des diastases par les microorganismes (B.F. n° 579.307 1923)
- Albert BOIDIN - Fabrication et emplois industriels de diastases (Communication au IV^e Congrès de Chimie Biologique 1933).
- M. H. PENEAU - Les diastases et leurs fabrications industrielles (Conférence au IV^e Congrès de Chimie Biologique 1933).
- Ivan-Auguste EFFRONT - Sur la fabrication industrielle des enzymes microbiennes (Chimie & Industrie vol. 43 p. 3 1940)
- DRAGUNOF - Solubilité des sels de l'acide phosphorique dans le citrate d'ammonium (Chemical Zentralblatt 1932 II 2715).
- J. MONOD - Recherches sur la croissance des cultures microbiennes (Hermann 1942).
- A. LWOFF - L'évolution physiologique. Etude des pertes de fonctions chez les microorganismes (Hermann 1944)