

50376
1953
4

50376
1953
4

N° d'ordre :
18

UNIVERSITÉ DE LILLE - FACULTÉ DES SCIENCES

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE

POUR OBTENIR

LE TITRE D'INGÉNIEUR-DOCTEUR

PAR

JEAN CLAVEAU

INGÉNIEUR DES INDUSTRIES AGRICOLES

1^{ère} THÈSE : **Influence de la Nicotinamide sur une Levure du Lactose.- Application Pratique à un Procédé de Dosage Microbiologique de cette Vitamine dans les Produits Alimentaires.**

2^{ème} THÈSE : Propositions données par la Faculté

Soutenues le 18 NOV 1953 devant la Commission d'examen.

JURY	}	M. MICHEL	}	Président
		Mlle. DELWAULLE		Examineurs
		M.M. DELOFFRE		
		BONNEMAN BOULANGER		



Doyen : M. LEFEBVRE, Professeur de Chimie Appliquée
et Chimie de la houille
Assesseur : M. ROUELLE, Professeur de Physique et Electricité
industrielles
Doyen honoraire : M. PRUVOST

Professeurs honoraires

M.M. BEGHIN	CAU	CHATELET
CHAUDRON	CHAZY	CORDONNIER
DEHORNE	DOLLE	FLEURY
GALLISSOT	GAMBIER	MAZET
PARISELLE	PASCAL	PAUTHENIER
SWYNGEDAUV	WIEMANN	

Professeurs

M.M. ARNOULT	: Radiotechnique générale
CHAPELON	: Analyse supérieure et calcul des probabilités
CORSIN	: Paléobotanique
Mlle. DELWAULLE	: Chimie P.C.B.
M.M. DUPARQUE	: Géologie et Minéralogie
HOCQUETTE	: Botanique générale et appliquée
KAMPE de FERIET	: Mécanique des Fluides
LELONG	: Mécanique rationnelle et Mécanique expérimentale
Mme. LELONG	: Calcul différentiel et intégral
M.M. MICHEL	: Chimie minérale
ROIG	: Physique générale
WATERLOT	: Géologie houillère
N.....	: Zoologie générale et appliquée
N.....	: Chimie et Physico-chimie industrielles

Professeurs sans chaire

M.M. DECUYPER	: Mathématiques appliquées
HEIM de BALSAC	: Zoologie
SAVARD,	: Chimie générale
N.....	: Chimie Agricole et Botanique P.C.B.

Maîtres de conférences

M.M. AIGRAIN	: Physique théorique
BONNEMAN-BEMIA	: Chimie appliquée
BONTE	: Géologie appliquée
BROCHARD	: Physique
DEHORS	: Physique industrielle
DREYFUSS	: Géologie
KOURGANOFF	: Astronomie
MARTINOT-LAGARDE	: Mécanique des Fluides
ROUBINE	: Physique

Chargés de cours

M.M. GERMAIN	: Chimie générale et organique
ZAMANSKY	: Mathématiques générales

Chef du Secrétariat : Mme BOUCHEZ

INFLUENCE DE LA NICOTINAMIDE
SUR UNE LEVURE DU LACTOSE
APPLICATION PRATIQUE A UN PROCEDE
DE DOSAGE MICROBIOLOGIQUE
DE CETTE VITAMINE
DANS LES PRODUITS ALIMENTAIRES

--:--:--:--:--:--:--:--:--

A MES JUGES

A V A N T P R O P O S

C'est au début de ce siècle, à la suite de travaux de physiologistes tels que HOPKINS et STEPP que furent définies, dans l'alimentation animale, les "maladies par carence" et la notion de "vitamine".

Les vitamines, isolées à l'état pur et sous la forme où elles se trouvent dans les milieux naturels furent d'abord dosées grâce à des tests physiologiques pratiqués sur animaux de laboratoire: c'était le dosage biologique.

Voici une quinzaine d'années, on caractérisa, chez les microorganismes, des substances indispensables et agissant à des doses infinitésimales, sous le nom de "facteurs de croissance". Ceux-ci furent, dans la majorité des cas, identifiés aux vitamines, d'où l'utilisation des microorganismes pour le dosage de ces catalyseurs biologiques: ainsi naquirent les méthodes de dosage microbiologique.- A l'heure actuelle, de nombreuses techniques ont été mises au point: elles offrent l'avantage d'être plus simples et plus rapides que les méthodes biologiques; peut-être sont-elles aussi plus fidèles?

Au hasard de recherches effectuées sous la direction de notre Maître, Monsieur A. CAMUS, Directeur de Recherches à l'Institut National de la Recherche Agronomique et Professeur à l'Ecole Nationale des Industries Agricoles, nous avons étudié un microorganisme pour lequel la nicotinamide s'est révélée "facteur de croissance".

Nous avons entrepris nos premiers essais systématiques et enregistré des résultats très intéressants, préliminaires du travail que nous présentons aujourd'hui, sous l'inspiration de Monsieur CAMUS et aidé par ses encouragements; nous le prions de bien vouloir trouver ici le témoignage de notre reconnaissance et l'expression de notre respectueux dévouement.

Les recherches ultérieures furent effectuées sous la direction de Monsieur le Professeur P. BOULANGER, de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de l'Université de Lille. Nous le remercions très sincèrement tant pour la sollicitude qu'il n'a jamais cessé de nous manifester que pour l'aide et les conseils que nous a apportés sa haute autorité scientifique. Nous tenons à lui exprimer, une fois encore, notre respectueuse considération et nos sentiments de profonde gratitude.

Notre travail a été également beaucoup facilité par l'enseignement reçu lors du stage consacré aux "dosages microbiologiques des vitamines" organisé par Monsieur le Professeur TERROINE au Centre National de la Recherche Scientifique en septembre 1952.

Ce stage, qui s'est déroulé dans les laboratoires de Messieurs les Professeurs POLONOVSKI et JACQUOT, de Monsieur le Commandant HOUZE, assistés de leurs collaborateurs, nous a permis d'améliorer nos techniques et de contrôler nos résultats.

Enfin, c'est à titre posthume que nous adresserons une ultime pensée et des remerciements sincères à Monsieur le Professeur DELOFFRE qui avait accepté d'être le rapporteur de notre thèse et qui, trop tôt disparu, nous avait, durant les derniers mois de sa vie, conseillé et guidé avec tant de bienveillance dans l'étude du sujet proposé par la Faculté.

Nous exprimons notre vive reconnaissance à Monsieur le Professeur MICHEL, à Mademoiselle le Professeur DELWAULLE et à Monsieur le Professeur BONNEMAN, pour l'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant d'être Président et Membres de notre Jury.

Nos remerciements iront également à Mademoiselle M. LIE-NARD, secrétaire dévouée de notre Ecole, pour son amicale collaboration technique au travail d'impression de cette publication.

Travail réalisé dans les laboratoires du
Centre d'Applications et de Recherches de
l'Ecole Nationale des Industries Agricoles.
Directeur de l'Ecole: Monsieur A. BONASTRE

T A B L E D E S M A T I E R E S

	Pages
<u>INTRODUCTION</u>	1
<u>CHAPITRE A - LA LEVURE</u>	3
- Identification	3
- Entretien de la souche	5
- Préparation de l'inoculum	6
<u>CHAPITRE B - LE MILIEU de CULTURE</u>	7
- Mise au point d'un milieu de culture synthétique	7
<u>CHAPITRE C - PREMIER ASPECT : LA FONCTION FERMENTATIVE</u>	10
- Protocole d'expérience	10
- Influence de la nicotinamide sur la fermentation alcoolique du lactose	10
- Essai qualitatif	10
- Essai quantitatif	11
- Application au dosage de la nicotinamide	18
- Principe du dosage	18
- Mode opératoire	19
<u>CHAPITRE D - DEUXIEME ASPECT : LA FONCTION VEGETATIVE</u>	24
- Transposition à la fonction végétative des résultats acquis pour la fonction fermentative...	24
- Etalonnage de l'électrophotomètre	24
- Influence de la nicotinamide sur la fonction végétative de "Saccharomyces lactis β "	27
- Application au dosage de la nicotinamide	30

<u>CHAPITRE E</u> - <u>COMPARAISON ENTRE LES DEUX METHODES DE DOSAGE</u>	35
<u>CHAPITRE F</u> - <u>REMARQUES COMPLEMENTAIRES CONCERNANT LES DEUX METHODES</u>	38
- Préparation des extraits	38
- Action de la quantité de sucre	39
- Etude des autres sucres fermentés par la levure	41
- Vérification de l'hypothèse du facteur de croissance	43
- Formes de la vitamine dosées par la levure ...	47
- Protocole de dosage sur des quantités plus faibles	48
<u>CHAPITRE G</u> - <u>QUELQUES DOSAGES EFFECTUES AU MOYEN DE CETTE METHODE</u>	49
- Dosages de nicotinamide sur quelques produits laitiers	49
- Dosages de nicotinamide sur quelques autres produits alimentaires	60
<u>CONCLUSION</u> -	68
<u>BIBLIOGRAPHIE</u> -	69

I N T R O D U C T I O N

Des recherches antérieures (1) sur un aspect du vieillissement des produits laitiers en poudre ont mis en évidence la sensibilité présentée par une levure du lactose vis-à-vis de la nicotinamide (2).

Le fait avait déjà été signalé notamment par Van Laer (3 p. 381) qui cite l'acide nicotinique et son amide comme facteur de croissance des levures du lait, et par Rogosa (4) qui, parmi les levures, fait la différenciation entre celles qui ne fermentent pas le lactose et sont capables de synthétiser l'acide nicotinique et celles qui, fermentant ce sucre, exigent l'apport extérieur de cette vitamine.

Dans ce groupe l'auteur signale notamment:

Torula cremoris

Torula lactosa

Monilia pseudotropicalis

Mycotorula lactis

Zygosaccharomyces lactis

et enfin:

Saccharomyces lactis

Saccharomyces fragilis

Nous avons pu mettre au point un milieu de culture exempt de nicotinamide, apportant par ailleurs tous les autres éléments nécessaires à cette levure et susceptible de servir de base à une méthode de dosage microbiologique de cette vitamine, convenant pour tous les produits alimentaires et particulièrement intéressante dans le cas des produits laitiers.

Il convenait d'étudier le comportement de cette levure sous les deux aspects classiques :

- 1) dans sa fonction fermentative, par l'examen de la production d'alcool en anaérobiose.
- 2) dans sa fonction végétative, par celui de la multiplication des cellules en aérobiose.

-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-

C H A P I T R E A

LA LEVURE

IDENTIFICATION

Isolée de la surface d'un camembert au début de sa maturation, elle a été identifiée selon la méthode de Guilliermond (5)

Elle fermente le lactose, caractéristique qui permet de simplifier beaucoup le travail d'identification -- Guilliermond écrit en effet (5 p. 259) "La plupart des levures n'ont pas d'action sur la lactose, rares et par conséquent caractéristiques sont celles qui font fermenter ce sucre".

Elle présente les caractères suivants :

Aspect microscopique : cellules ovoïdes à protoplasme régulier, avec bourgeonnements.

Dimensions : 3,5 à 5 μ

(Voir schéma I)

Aspect macroscopique :

a) sur gélose nutritive, colonies circulaires donnant après vieillissement de grandes colonies à bords larges et minces avec des prolongements arborescents.

(Voir schéma II)

b) sur gélatine nutritive, colonies géantes montrant au centre l'aspect d'un cratère aux bords relevés, entouré d'une large surface sensiblement circulaire, coupée par des rayons.

(Voir schéma III)

c) en piqures, développement le long de la partie piquée, la prolifération microbienne s'intensifiant régulièrement du fond vers la surface.

SCHEMA I

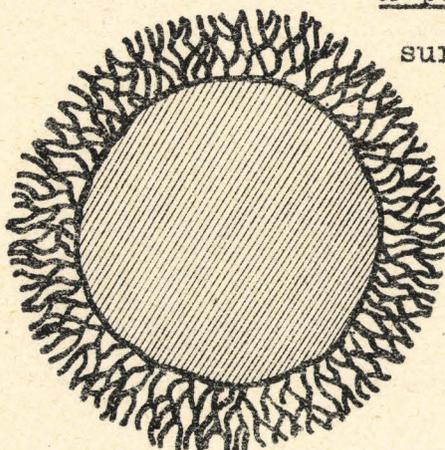


Aspect microscopique
cellules ovoïdes à
protoplasme régulier
avec bourgeonnements

SCHEMA II



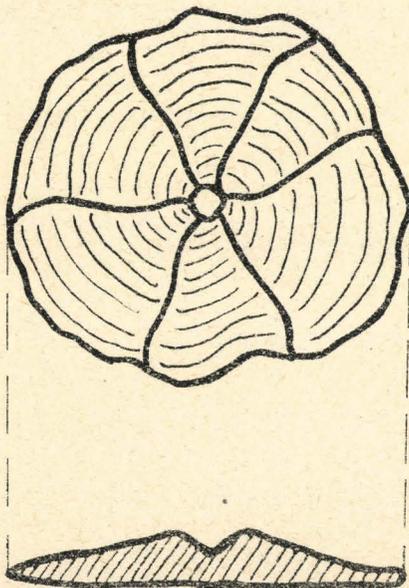
Colonie jeune



Aspect macroscopique
sur gélose nutritive

Colonie âgée
avec prolongements
arborescents.

SCHEMA III



Aspect macroscopique
sur gélatine nutritive

Colonie géante
avec au centre un cratère
à bords relevés

coupe

Sucres fermentés :

Fermentation active du lactose avec production d'une odeur aromatique très agréable,

Fermentation active du glucose, du saccharose, du mannose,

Fermentation très active du galactose,

Fermentation nulle du maltose.

Ces quelques caractères permettent de classer cette levure dans le groupe de :

- *Saccharomyces lactis* β de W. Dombrowski ou éventuellement :

- *Saccharomyces fragilis* de Jorgensen; ces deux formes paraissant être, toujours d'après Guilliermond, extrêmement voisines.

ENTRETIEN de la SOUCHE

Afin de respecter l'origine de la levure (isolée d'un camembert), nous utilisons, pour son entretien en culture pure, un milieu nutritif naturel très employé en industrie laitière : le lactosérum gélosé :

Technique de préparation:

- Déprotéiniser, par autoclavage à 120° durant 20 minutes, un lactosérum de fromagerie ou, à défaut, un lactosérum préparé au laboratoire par coagulation, par la présure, de lait de vache frais.

- Neutraliser à pH 6,8 (Indicateur : bleu de bromothymol) le sérum déprotéinisé.

- Géloser, à raison de 17 gr de gélose par litre, le sérum neutralisé; faire fondre la gélose par autoclavage à 120° durant 20 minutes.

- Après filtration, répartir le milieu ainsi obtenu en tubes à essais et boucher au coton cardé.

C H A P I T R E B

LE MILIEU DE CULTURE

MISE AU POINT D'UN MILIEU DE CULTURE SYNTHETIQUE

Il convenait de réaliser un milieu de culture synthétique, exempt de nicotinamide et susceptible cependant d'apporter à la levure tous les autres éléments nécessaires à son développement normal.

Tenant compte des besoins des levures en carbone, azote, matières minérales, facteurs de croissance et eau, donnés d'une part par des ouvrages généraux de microbiologie (3, 7, 8) et d'autre part par des publications spécialisées sur les méthodes de dosage microbiologique des vitamines (6, 9, 10) et après de nombreux essais au laboratoire, nous avons retenu la formule suivante:

Pour un volume final de 1 litre :

Lactose R A L 40 g
Hydrolysate de caséine " Vitamin free "
(exempt de vitamine) 5 g

dissoudre à chaud dans environ 900 cm³ d'eau bidistillée et ajouter après complète dissolution:

Solutions de Vitamines:

Sol. V₁ 10 cm³
Sol. V₂ 10 cm³

Solutions salines :

Sol. S₁ 10 cm³
Sol. S₂ 10 cm³
Sol. S₃ 10 cm³

bien agiter le milieu entre chaque addition de solution saline.

Compléter à 1 litre avec l'eau bidistillée.

Stériliser et filtrer afin d'obtenir un milieu parfaitement limpide.

Solutions de Vitamines

La détermination des différents facteurs de croissance et des doses à ajouter au milieu s'est inspirée de travaux (11, 12) mettant en relief, pour certains microorganismes et plus particulièrement pour les levures, l'ordre de grandeur du besoin en chacun de ces facteurs.

Elle tient compte aussi d'essais systématiques réalisés au laboratoire avec la levure utilisée.- La plupart de ces facteurs sont ajoutés par simple souci de sécurité, la levure devant avoir la possibilité d'en réaliser la synthèse.

Sol. V₁ : pour 100 cm³ de volume final:

Thiamine	10 mg
Riboflavine	3 mg
Biotine	1 mg

après dissolution en milieu faiblement acétique, cette solution de vitamines est ajustée à 100 cm³ avec de l'eau bidistillée et de l'alcool éthylique, afin que l'ensemble titre environ 50° GL. Elle est conservée à la glacière et à l'abri de la lumière.

Sol. V₂ : pour 100 cm³ de volume final :

Pyridoxine	3 mg
Pantothénate de Ca	3 mg
Mésoinositol	5 mg

Cette solution s'effectue directement dans l'eau bidistillée et est ajustée au volume final comme ci-dessus, afin d'obtenir un titre alcoolique du mélange voisin de 50° GL.- Elle doit également être conservée à la glacière.

C H A P I T R E C

PREMIER ASPECT: LA FONCTION FERMENTATIVE

PROTOCOLE d'EXPERIENCE

Pour étudier les variations de l'activité fermentaire de la levure considérée, en fonction de la teneur du milieu de culture en nicotinamide, nous avons utilisé la technique suivante: le substrat à étudier, toujours composé du milieu de culture de base dans lequel la nicotinamide est mise en solution, est réparti en tubes à essais de 25 x 250 à raison de 50 cm³ par tube, ceci afin d'obtenir un rapport surface / épaisseur de liquide faible et de favoriser la fermentation anaérobie.- Les tubes sont bouchés au coton et stérilisés à 115° durant 20 minutes.

Après refroidissement, ils sontensemencés avec 1 cm³ d'inoculum et mis en incubation à l'étuve à 30°.

Des prélèvements aseptiques, de volume constant et égal à 5 cm³, destinés aux dosages, sont faits périodiquement, à la pipette graduée stérile.

Sur ces prélèvements, nous dosons l'alcool formé par la méthode de Martin et Nourrisson (14), fondée sur l'oxydation de l'alcool par le bichromate de potassium en milieu sulfurique, suivie du dosage du bichromate en excès par titration, au moyen de l'hyposulfite de sodium, de l'iode qu'il libère quantitativement en présence d'un excès d'iodure de potassium.

INFLUENCE DE LA NICOTINAMIDE SUR LA FERMENTATION ALCOOLIQUE DU LACTOSE.

Essai qualitatif:

Dans un premier essai qualitatif, nous avons établi la courbe de fermentation alcoolique (alcool formé en fonc-

tion de la durée d'incubation) de deux séries de milieu nutritif.

1ère Série: tubes contenant 50 cm³ de milieu de base exempts de nicotinamide.

2ème Série: tubes contenant 50 cm³ de milieu de base additionnés de 1 mg de nicotinamide.

Ces deux séries, traitées comme nous l'avons indiqué au paragraphe précédent, ont donné les résultats analytiques résumés dans le tableau A et le graphique I

TABLEAU A

	Temps d'incubation en heures		
	<u>48 h.</u>	<u>85 h.</u>	<u>120 h.</u>
1ère Série	25	45	60
2ème Série	275	735	795

Ces résultats font ressortir que:

1) en l'absence de nicotinamide, la fermentation est presque nulle (après 120 heures d'incubation, 60 mg d'alcool dans 50 cm³).

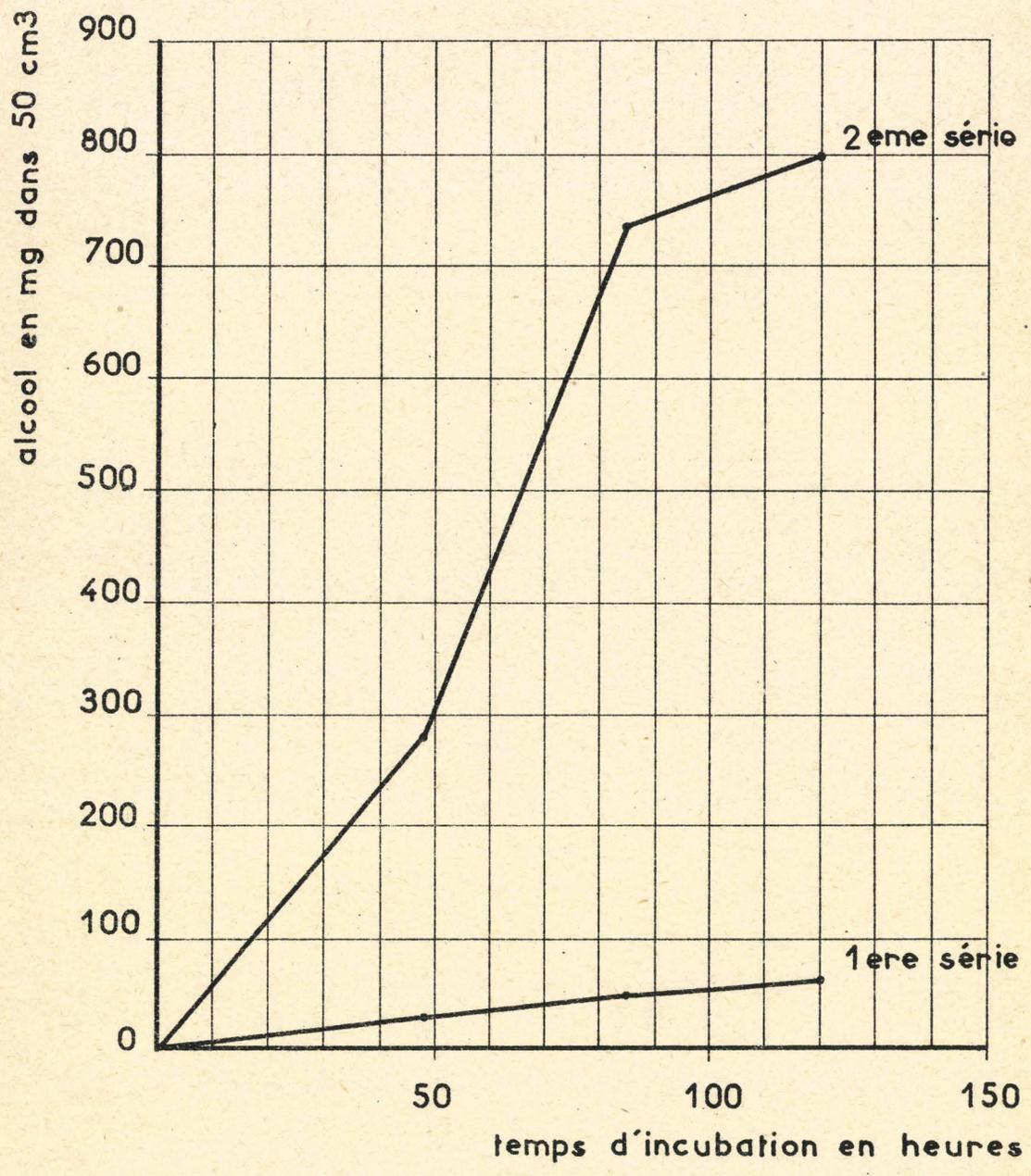
2) dès que l'on ajoute de la nicotinamide la fermentation redevient normale (après 120 h. d'incubation, 795 mg d'alcool dans 50 cm³).

Essai quantitatif:

Ce premier résultat, qui, du point de vue qualitatif, mettait très nettement en évidence l'action de la vitamine étudiée, ne donnait aucune indication quantitative sur les doses extrêmes, maxima et minima, limitant cette action.

Les séries d'essais suivantes permirent de fixer ces

GRAPHIQUE I



limites et apportèrent des constatations supplémentaires résumées dans le tableau B et le graphique II.

1ère Série: Tubes contenant 50 cm³ de milieu de base exempts de nicotinamide.

Autres Séries: Tubes contenant 50 cm³ de milieu de base additionnés de doses croissantes de nicotinamide: à savoir:

2ème série : 0,0005 mg de nicotinamide
3ème - : 0,001 mg d°
4ème - : 0,0025 mg d°
5ème - : 0,005 mg d°

Les séries suivantes: respectivement : 0,01 - 0,025 - 0,05 - 0,10 - 0,25 - 0,50 - 1,00 - mg de nicotinamide.

TABLEAU B

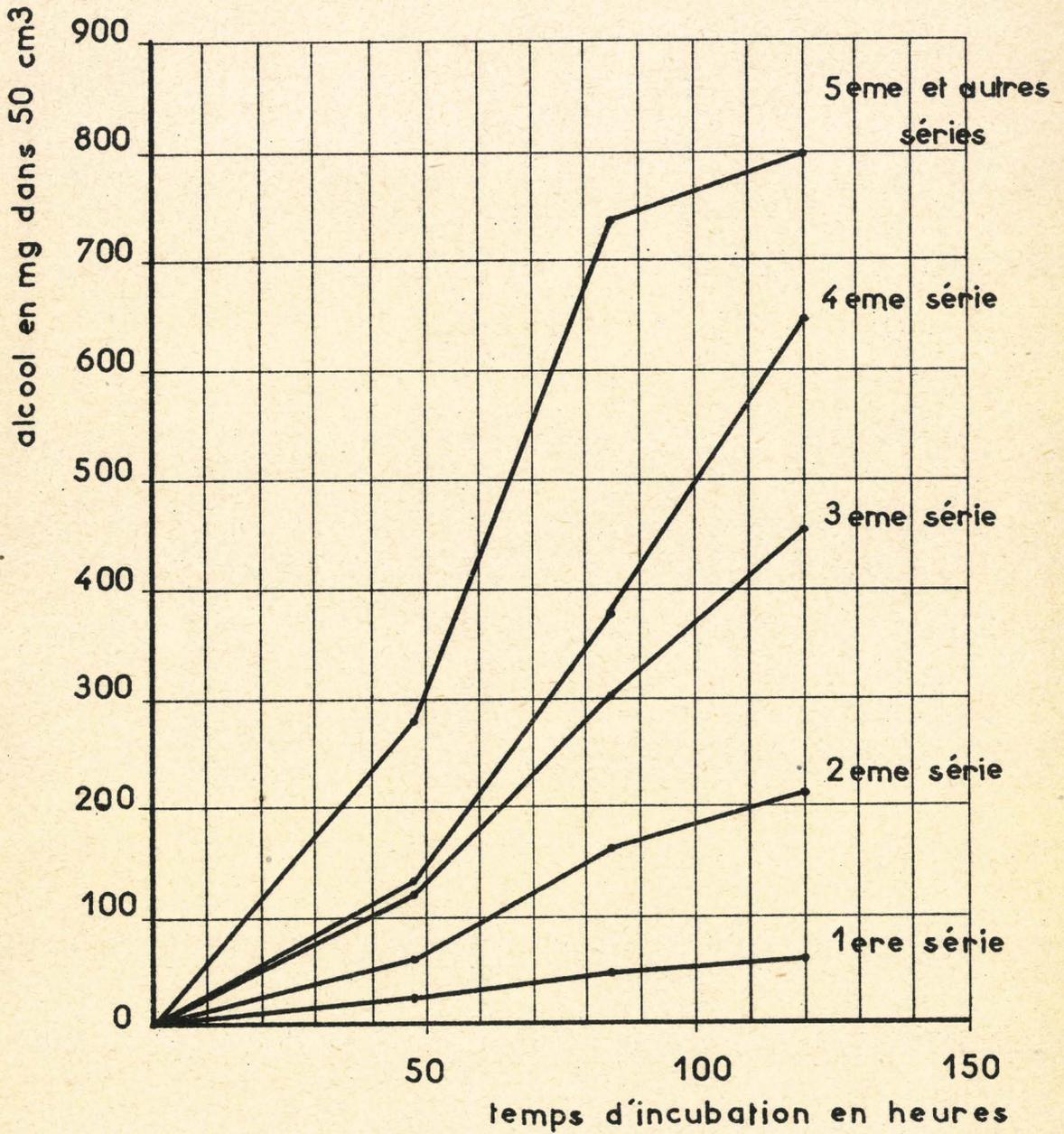
(Valeurs moyennes exprimées en mg d'alcool éthylique dans 50 cm³)

	Temps d'incubation en heures		
	<u>48 h.</u>	<u>85 h.</u>	<u>120 h.</u>
1ère Série	25	45	60
2ème Série	60	160	210
3ème Série	115	300	450
4ème Série	130	375	645
5ème Série et les séries suivantes	275	735	795

la dose de 0,005 mg de nicotinamide dans 50 cm³ de milieu constitue la dose nécessaire et suffisante pour déterminer l'action accélératrice maximum sur la fermentation alcoolique.

Il n'existe pratiquement pas de dose minimum, l'addi-

GRAPHIQUE II



tion de quantités inférieures à la limite précédente (0,0025 - 0,001 - 0,0005 mg dans 50 cm³) détermine, elle aussi, une action accélératrice sur la fermentation, action d'autant plus faible que la quantité ajoutée est elle-même plus faible.

Dans une nouvelle série d'essais, nous avons précisé cette seconde observation et les résultats résumés dans le tableau C et le graphique III n'appellent aucune explication complémentaire.

TABEAU C

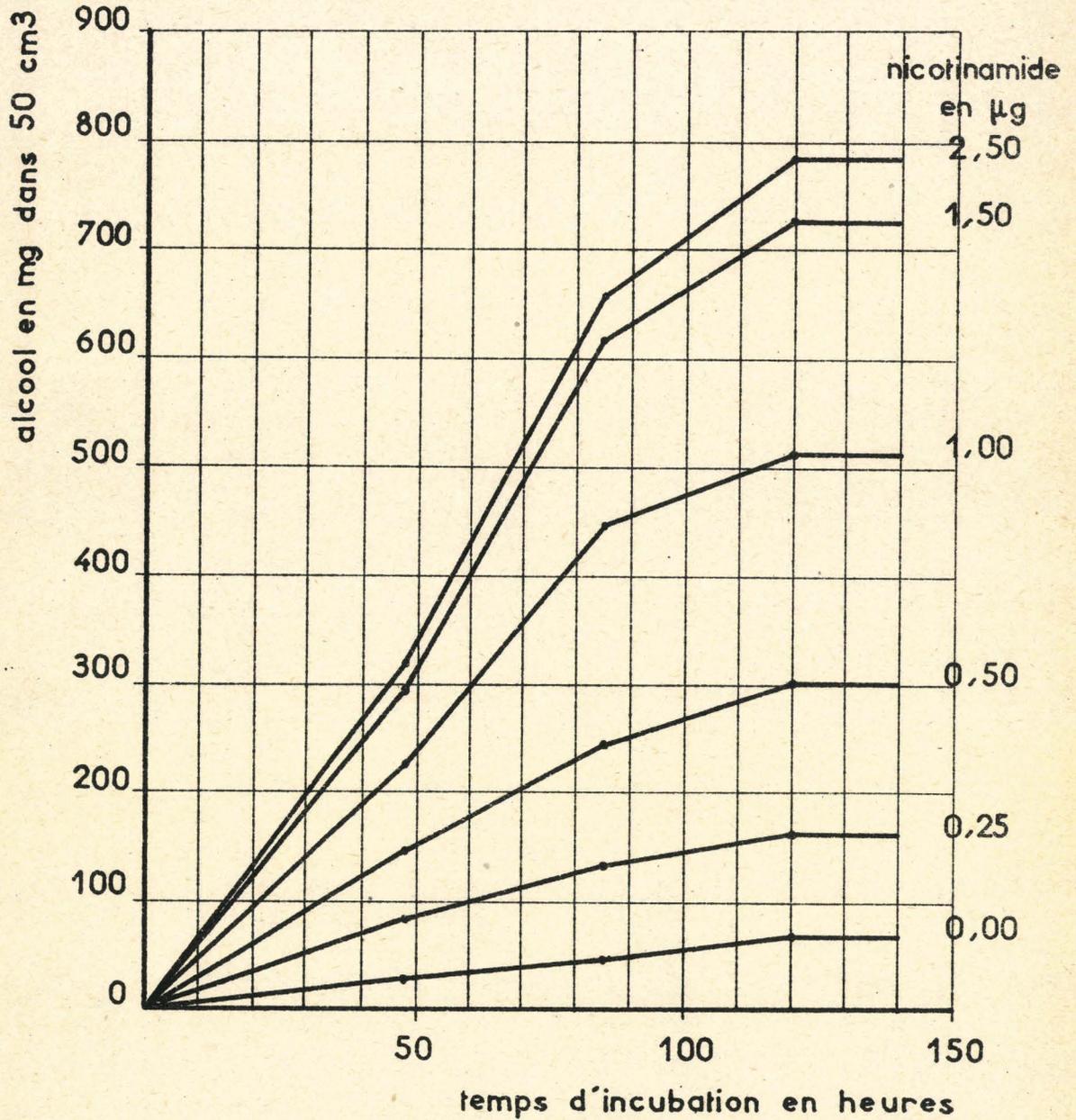
(Valeurs exprimées en mg d'alcool éthylique dans 50 cm³).

Quantité de nicotinamide ajoutée aux 50 cm ³ de milieu de base (en μ g)	Temps d'incubation en heures		
	<u>48 h.</u>	<u>85 h.</u>	<u>120 h.</u>
0,00	25	45	65
0,25	80	130	160
0,50	145	245	300
1,00	225	445	510
1,50	295	615	725
2,50	315	655	780

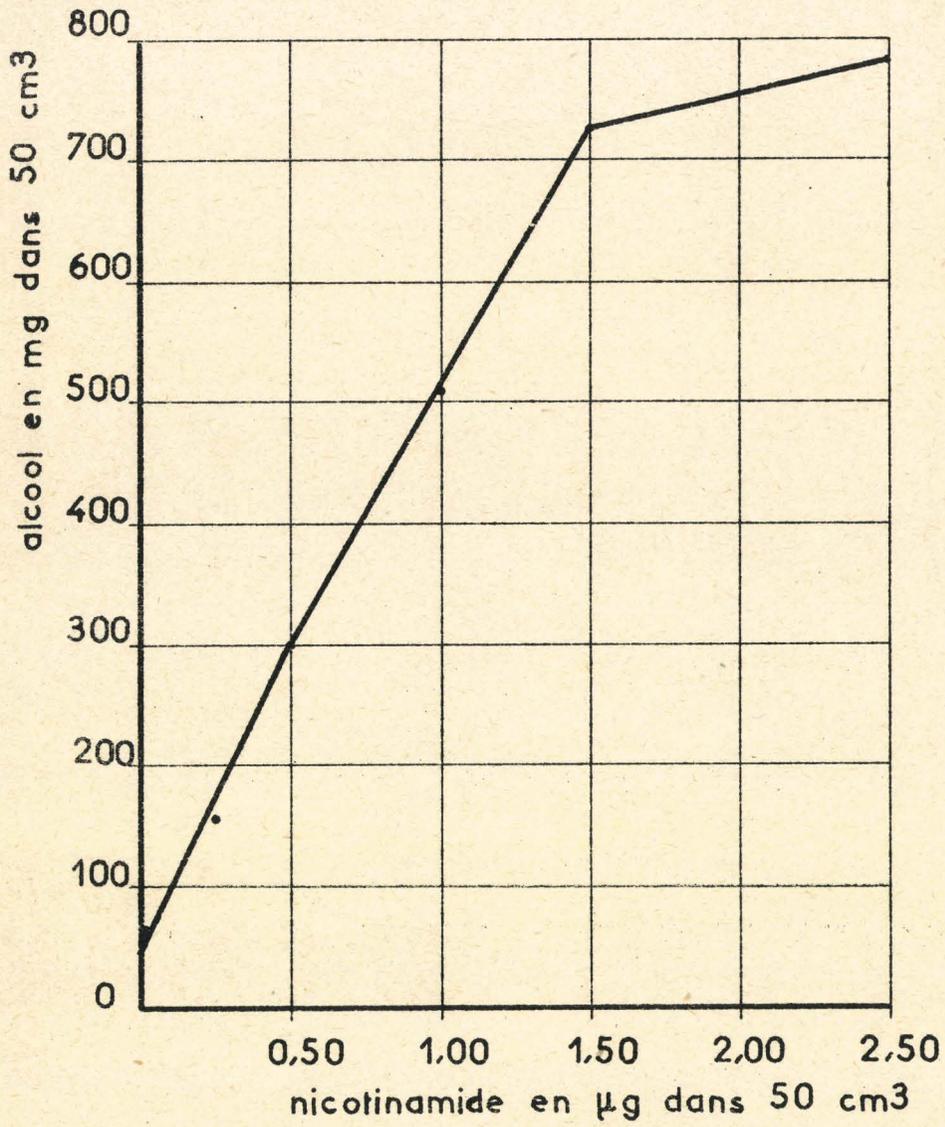
Négligeant la vitesse de fermentation, nous pouvons mesurer la quantité d'alcool formée après stabilisation de la fermentation.- L'expérience nous a montré que cette dernière est atteinte après 120 heures, dans les conditions d'ensemencement et de culture utilisées.

Le graphique IV représente la quantité d'alcool, exprimée en mg, formée après 120 h. d'incubation, en fonction de la dose de nicotinamide, exprimée en μ g, présente dans

GRAPHIQUE III



GRAPHIQUE IV



50 cm³ de milieu; il montre que, dans les limites de 0 à 1,5 μ g dans 50 cm³, il y a sensiblement proportionnalité entre le taux d'alcool formé et la quantité de vitamine contenue dans le milieu.

APPLICATION AU DOSAGE DE LA NICOTINAMIDE.

Les observations précédentes permettent de conclure que la nicotinamide est bien, pour la levure considérée, un facteur de croissance, c'est-à-dire une substance indispensable à son développement et dont elle est incapable d'effectuer la synthèse (15, 16).

Il est alors possible de concevoir que "Saccharomyces lactis β ", cultivé sur le milieu exempt de nicotinamide, puisse être l'agent d'une technique de dosage microbiologique de cette vitamine dans les produits alimentaires.

Des essais de dosage sur des produits laitiers (en particulier le lactosérum de fromagerie) nous ont donné des résultats satisfaisants. Pour chaque dosage, nous avons cherché à contrôler notre technique en utilisant la méthode de l'addition de quantités connues du produit à doser, sous forme pure.

Principe du dosage:

Il s'agit d'apporter au milieu synthétique de culture une quantité de nicotinamide empruntée au produit à analyser et comprise entre 0 et 0,0015 mg dans 50 cm³ de milieu.

Un dosage d'alcool, après 120 h. de culture de la levure, détermine l'influence exercée par la vitamine contenue dans la quantité de produit qui a été ajoutée.

La comparaison avec une courbe étalon, du type graphique IV, dans laquelle le facteur de croissance est introduit sous forme pure, donne l'échelle de conversion.- Si l'on ne possède pas de données approximatives sur la teneur du produit en nicotinamide, un essai préalable est nécessaire pour déterminer la quantité qui apportera la dose

de vitamine, dans les limites présentes, de 0 à 0,0015 mg.-
A cet effet, on ajoute à des tubes contenant 50 cm³ de milieu synthétique des doses décroissantes d'extrait du produit à analyser. Après ensemencement par la levure, un dosage d'alcool effectué après 120 heures d'incubation à 30°, précise les quantités limites de l'échantillon à prélever.-
Dans le cas du lactosérum de fromagerie, par exemple, elles sont de l'ordre de 0,5 à 1 cm³.

Mode opératoire:

Etablissement de l'échelle de référence:

Solution stock de nicotinamide: c'est une solution dans l'alcool éthylique redistillé renfermant 100 µg de vitamine par cm³. Cette solution peut se conserver à la glacière durant plusieurs mois sans s'altérer.

Au moment de l'emploi, elle est diluée dans l'eau bidistillée à raison de 1 cm³ pour 200 cm³ de volume final; chaque cm³ de la solution diluée correspond alors à 0,5 µg de vitamine.

L'échelle de référence comportera 5 tubes renfermant respectivement:

0 - 0,5	- 1	- 2 - 3	cm ³ de sol. diluée (de ni-
soit 0 - 0,25	- 0,50	- 1 - 1,50)coti-
			(namide

Ils seront complétés à 3 cm³ avec de l'eau bidistillée, puis additionnés de 47 cm³ de milieu de culture de base. Cette échelle permettra, après dosage de l'alcool, d'établir la courbe étalon.

Dosage proprement dit:

Pour plus de simplicité, nous considérerons le cas du dosage dans un produit hydrosoluble : le lactosérum de fromagerie, qu'il suffira de diluer au demi afin que chaque cm³ renferme de 0,2 à 0,5 µg de nicotinamide.

Cette dilution faite, la répartir dans les tubes à raison de:

1 - 2 - 3 cm³.- Compléter à 3 cm³ avec de l'eau bi-

distillée et ajouter 47 cm³ de milieu de culture.

L'ensemble des tubes (échelle et dosage), après stérilisation à 115° durant 20 minutes, sera ensemencé suivant la technique décrite.- Après 120 heures d'incubation nous doserons l'alcool.

Vérification:

Afin de vérifier nos résultats, nous préparons un tube témoin qui contient un volume déjà étudié de produit à doser (souvent 1 cm³) et en plus 0,50 µg de nicotinamide (soit 1 cm³ de solution diluée de cette vitamine).- Complété à 3 cm³, additionné de 47 cm³ de milieu, ce tube est traité comme ci-dessus.

Exemple numérique et lecture des résultats:

Dosage effectué sur un lactosérum dilué au 1/2.

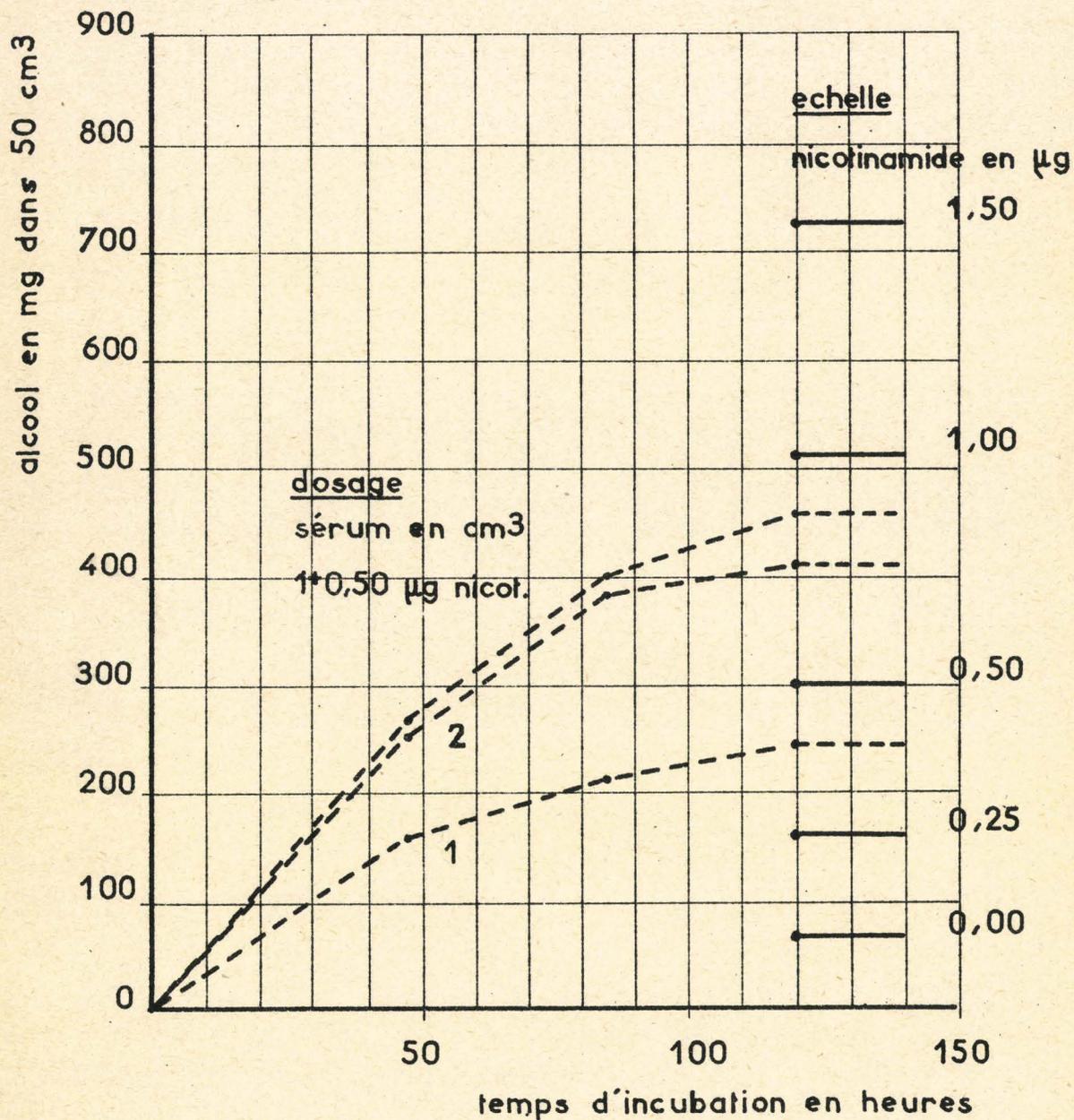
Voici les teneurs en alcool obtenues dans les conditions habituelles:

TABLEAU D

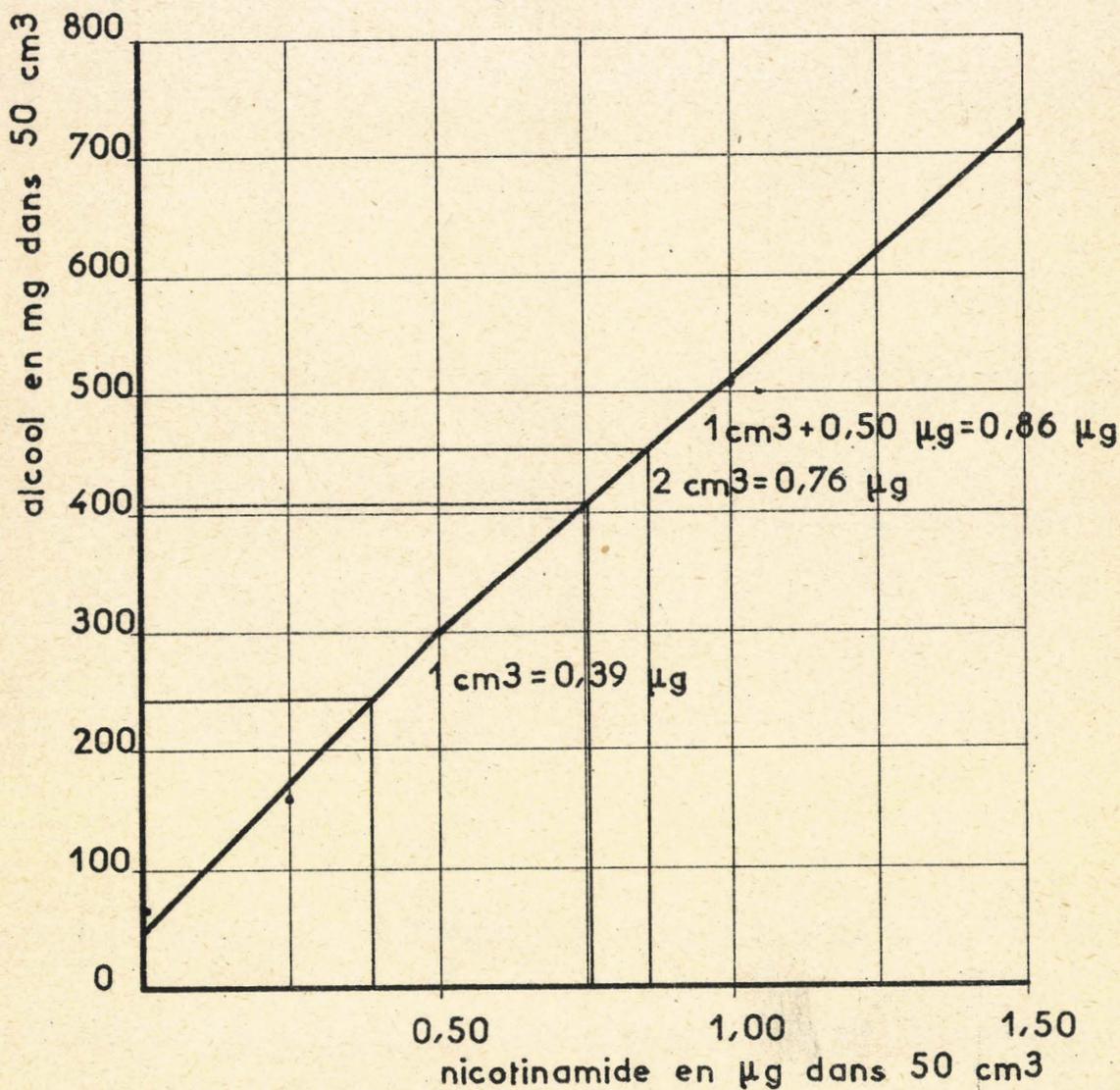
(Alcool éthylique formé après 120 h. d'incubation)			
Echelle (µg de nicotinamide dans 50 cm ³)	Alcool (mg dans 50 cm ³)	Dosage (cm ³ de sérum dilué dans 50 cm ³)	Alcool (mg dans 50 cm ³)
0,00	65	1	245
0,25	160	2	410
0,50	300		
1,00	510	1 cm ³ + 0,50 µg de nicotinamide	455
1,50	725		

Les deux premières colonnes du tableau D donnent la courbe étalon représentant l'alcool formé en fonction de la teneur en vitamine étudiée; les valeurs de la 4ème colonne

GRAPHIQUE V



GRAPHIQUE VI



du même tableau, reportées sur la courbe étalon, donnent la quantité de cette vitamine présente dans le volume de sérum dilué de la colonne 3 et, par suite, la richesse du produit initial.

Exemple:

245 mg d'alcool correspondent à 0,39 μ g de vitamine
0,39 μ g de vitamine sont apportés par 1 cm³ de sérum dilué
soit par cm³ de sérum : 0,78 μ g

de même : 410 mg d'alcool correspondent à 0,76 μ g de vitamine

soit par cm³ de sérum 0,76 μ g

enfin : 455 mg d'alcool correspondent à 0,86 μ g de vitamine
pour 1 cm³ de sérum dilué : 0,86 - 0,50 - 0,36 μ g

soit par cm³ de sérum : 0,72 μ g

Le graphique V représente les courbes de fermentation en fonction du temps.

Le graphique VI est celui servant au dosage, établi d'après les valeurs du tableau D.

-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-

CHAPITRE D

DEUXIEME ASPECT: LA FONCTION VEGETATIVE

TRANSPOSITION à la FONCTION VEGETATIVE des RESULTATS ACQUIS
POUR LA FONCTION FERMENTATIVE.

Des essais semblables aux précédents ont été effectués en aérobiose, sur boîtes de Roux, afin de favoriser la fonction végétative. Le milieu de culture utilisé renferme les mêmes composants, mais à une concentration finale moitié moins forte, ceci pour réduire la teneur en alcool en fin d'expérience.

L'ensemencement se fait dans des conditions absolument semblables, mais l'incubation à la température de 20° au lieu de 30° afin de réduire l'évaporation du liquide, que la large surface de la boîte de Roux a tendance à favoriser.

Le nombre de cellules de levure est apprécié par une mesure opacimétrique, à l'aide de l'électrophotomètre de Meunier, en cuve à traversée verticale sous une longueur d'onde $\lambda = 4700 \text{ \AA}$ (Bleu)

ETALONNAGE de l'ELECTROPHOTOMETRE

Si nous considérons une culture de levure ou de tout autre microorganisme en milieu liquide, nous pouvons, à un moment donné de la croissance, établir des relations entre les 3 éléments caractéristiques suivants:

- | | | |
|--------------------------------------|---|----------------------|
| - Poids de cellules sèches | } | pour un volume donné |
| - Nombre de cellules | | |
| - Opacité provoquée par les cellules | | |

Le poids de cellules sèches adopté est celui de la récolte centrifugée, lavée et séchée à 100 - 102°, de 10 cm³ de culture après 120 h. d'incubation.

Le nombre des cellules est déterminé, après le même temps, au compte-globules de Malassez (17) et exprimé pour un volume de 1/100 de mm³.

L'opacité est exprimée en nombre de divisions du tambour de l'électrophotomètre de Meunier (18, 19) pour la traversée verticale de la cuve "Djourbel" de 10 mm d'épaisseur, en utilisant l'écran bleu : $\lambda = 4700 \text{ \AA}$

Nous préférons la cuve à traversée verticale, à celle à traversée horizontale habituellement utilisée, du fait de la rapidité de sédimentation des suspensions de levures.

Les chiffres de correspondance sont les suivants:

TABLEAU E

Poids de cellules sèches dans 10cm ³	Nombre de cellules dans 1/100 mm ³	Opacité (N divisions de tambour)
16,00 mg	2.000	478
15,00 mg	1.880	470
10,00 mg	1.250	410
8,70 mg	1.080	380
5,50 mg	750	310
2,80 mg	350	208
1,25 mg	—	106
0,60 mg	—	55

Les valeurs (N divisions du tambour) sont exprimées après défalcation de l'absorption de base mesurée sur le milieu de culture avant incubation (20)

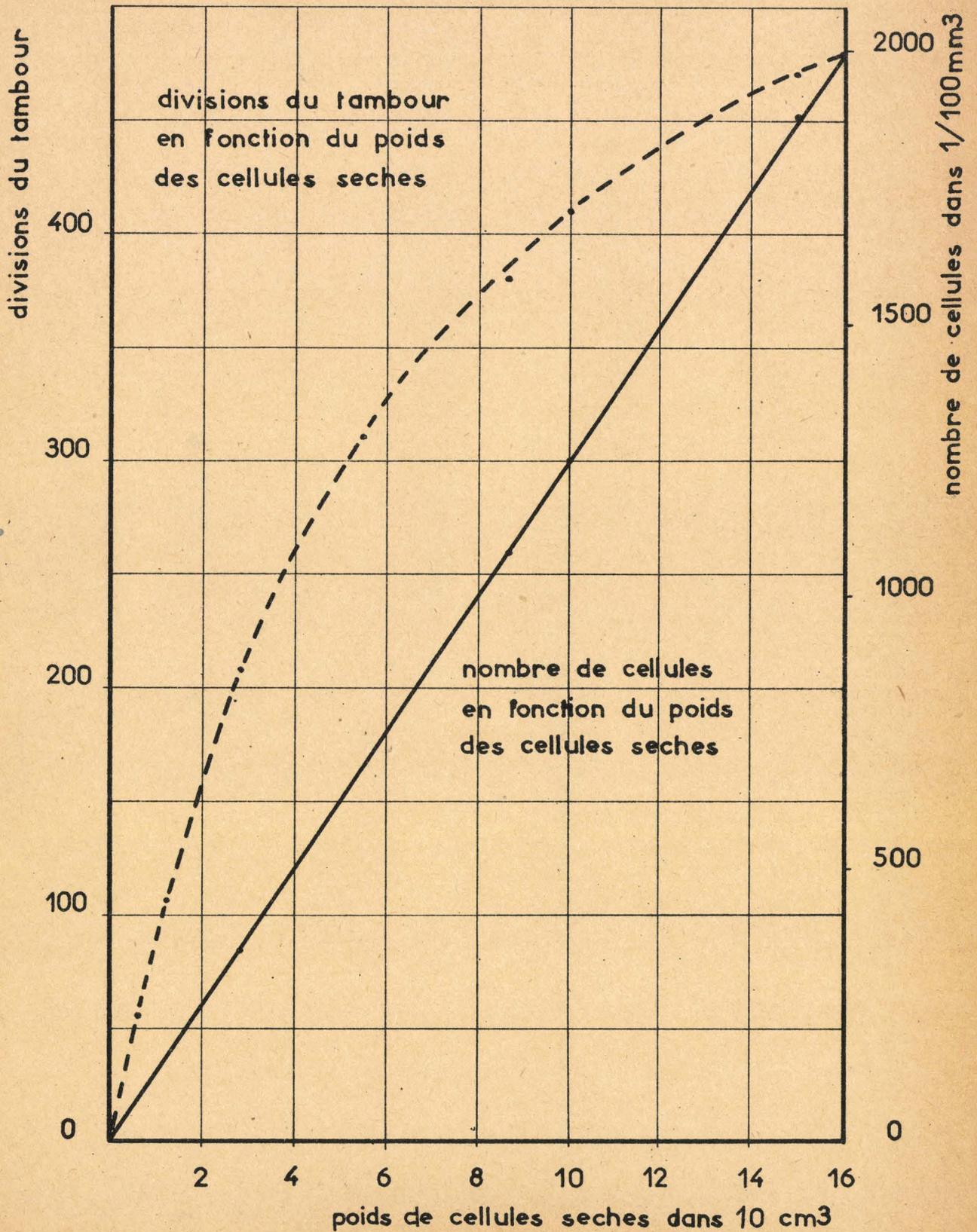
$$N = n - n_0$$

n = lecture réelle

n₀ = lecture sur le milieu avant incubation

Le graphique VII indique les variations du nombre de cellules et de l'opacité en fonction du poids des cellules.

GRAPHIQUE VII



Si la variation du nombre de cellules en fonction de leur poids peut être assimilée à une fonction linéaire, dans le cas d'une culture jeune en pleine activité, il n'en est plus de même pour la variation des graduations de l'électrophotomètre en fonction de ce même poids. Or, si comme cela s'est trouvé vérifié, la présence de certaines doses de nicotinamide intervient dans la multiplication cellulaire, c'est le nombre de cellules formées ou mieux le poids de la récolte qu'il convient d'étudier.

La détermination de ce poids est une opération délicate et longue; par contre, celle de l'opacité est simple et instantanée. Nous avons donc pensé employer cette dernière et utiliser ensuite le graphique VII pour convertir l'opacité lue en poids de cellules récoltées (courbe en pointillé).

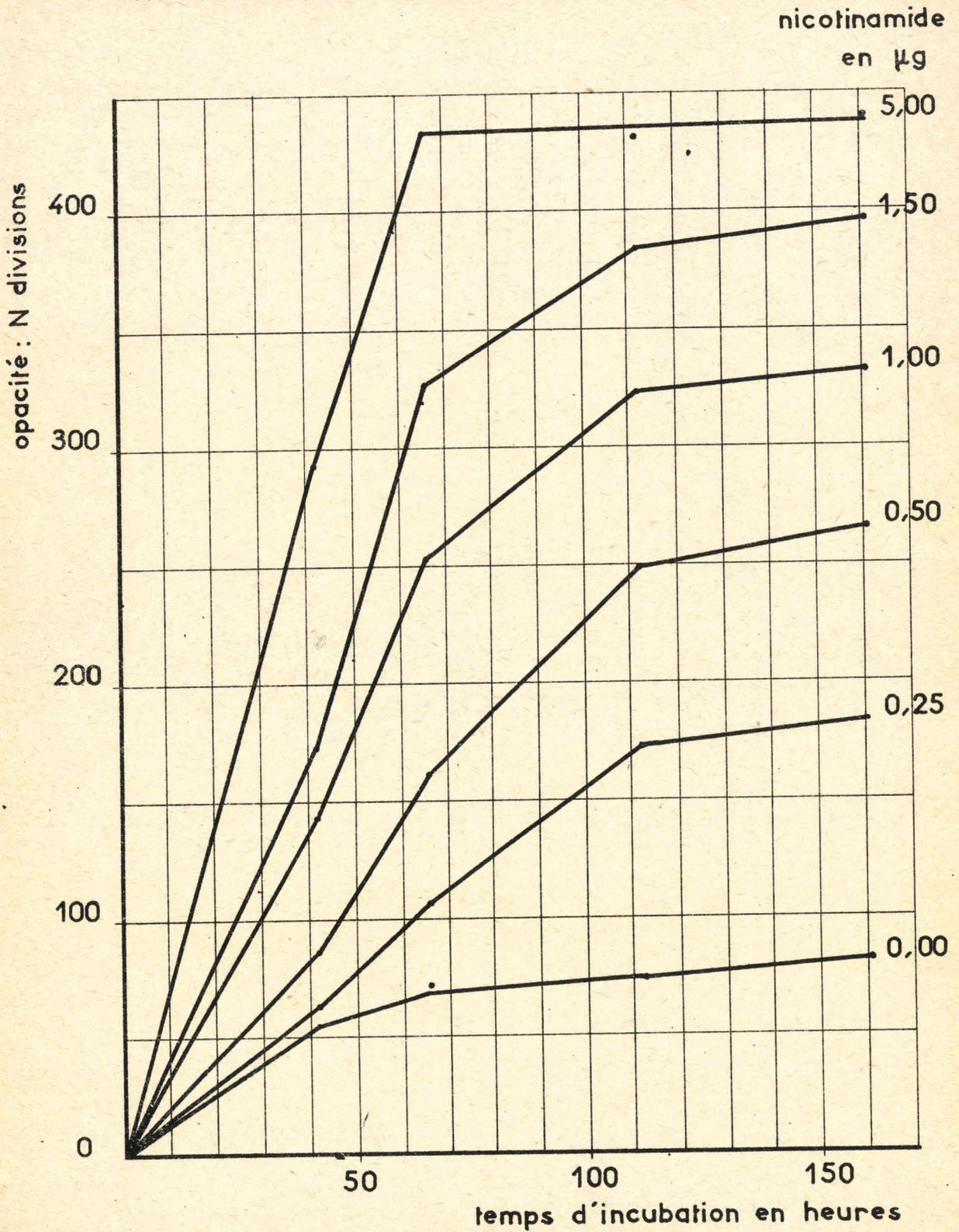
INFLUENCE de la NICOTINAMIDE sur la FONCTION VEGETATIVE de " SACCHAROMYCES LACTIS β ".

Etant donné la grande similitude des essais effectués à propos de la fonction fermentative et de ceux qui portent sur la fonction végétative, les résultats de ces derniers ont été seulement résumés dans le tableau F et les graphiques VIII et IX.

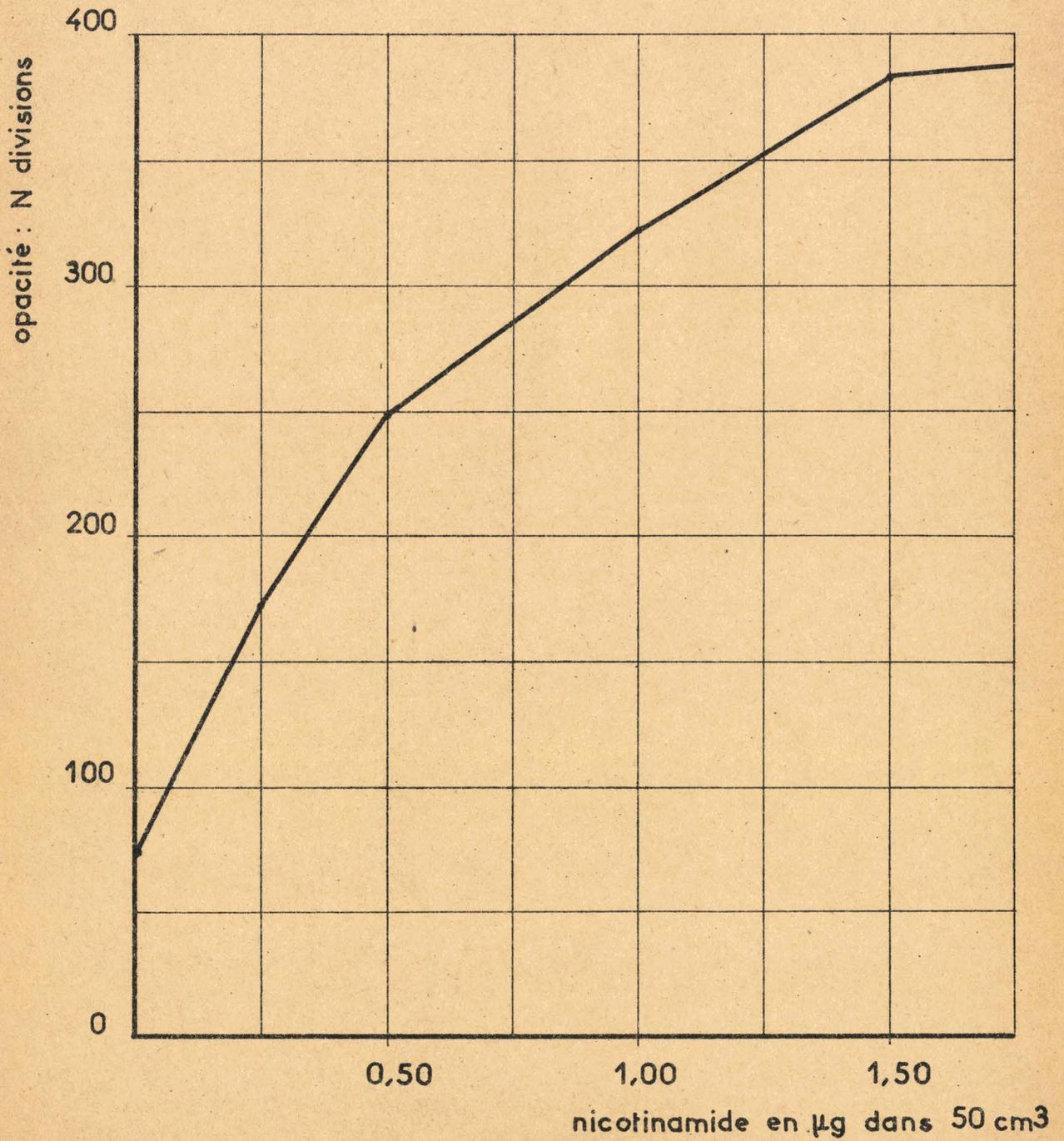
TABLEAU F

(opacité exprimée en Divisions de tambour de l'électrophotomètre : $N = n - n_0$)				
Quantité de nicotinamide ajoutée aux 50 cm ³ de milieu de base (en μ g)	Temps d'incubation en heures			
	42	66	112	161
0,00	54	71	74	81
0,25	62	106	173	-
0,50	85	161	249	265
1,00	142	253	323	331
1,50	173	327	383	396
5,00	293	434	431	440

GRAPHIQUE VIII



GRAPHIQUE IX



Le graphique VIII donne, en fonction du temps, les courbes d'accroissement du trouble de la culture (exprimé en divisions du tambour) pour différentes teneurs du milieu en nicotinamide; il montre que le maximum de développement est atteint, comme précédemment, après 120 h. d'incubation.

Le graphique IX exprime, après 120 h. d'incubation, l'opacité (en divisions du tambour) en fonction de la quantité de vitamine dans le milieu.

Enfin, si, à l'aide du graphique VII, nous convertissons l'opacité en poids de cellules sèches qui auraient été récoltées dans 10 cm³ de culture, nous obtenons les valeurs du tableau G qui, traduites graphiquement (graphique X), donnent, dans les limites habituelles de 0 à 1,5 μ g dans 50 cm³, une fonction linéaire.

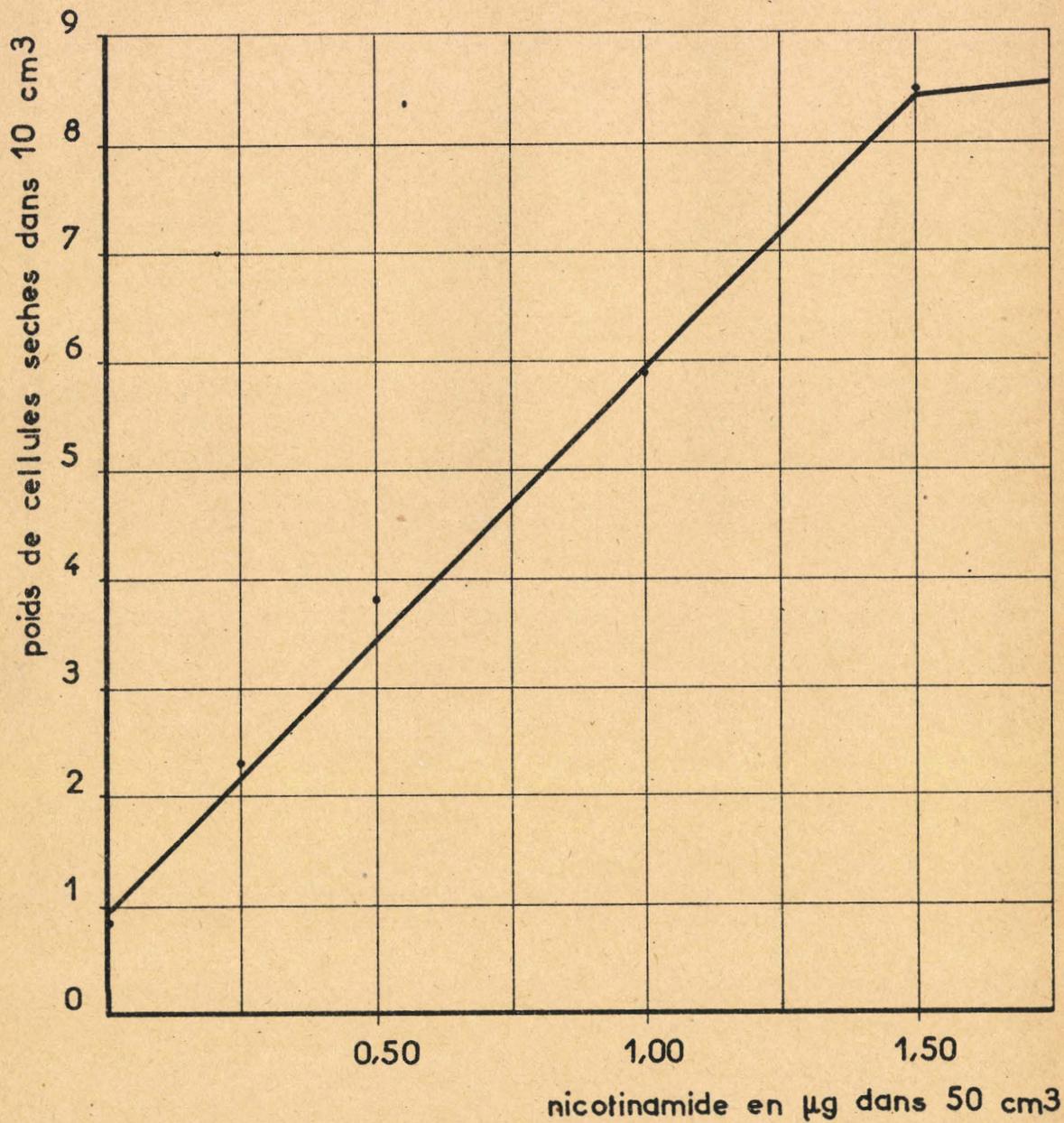
TABLEAU G

Quantité de nicotinamide ajoutée aux 50cm ³ de milieu de base (en μ g)	Opacité N divisions (N = n-n ₀)	Poids de cellules sèches en mg dans 10 cm ³ (d'après le gr. VII)
0,00	74	0,85
0,25	173	2,30
0,50	249	3,80
1,00	323	5,90
1,50	383	8,50
5,00	431	11,45

APPLICATION AU DOSAGE DE LA NICOTINAMIDE

Tout comme nous l'avons dit plus haut, il est possible d'exploiter les résultats obtenus et de les appliquer au dosage de la nicotinamide dans les produits alimentaires.

GRAPHIQUE X



Le principe de la méthode restant absolument le même, le mode opératoire demeurant inchangé, nous croyons inutile de les rappeler ici (se reporter à la page 18). Signalons seulement qu'à la place des tubes à essais nous opérons sur boîtes de Roux avec un volume final de liquide toujours égal à 50 cm³.

Nous nous contenterons donc de reprendre un exemple numérique.

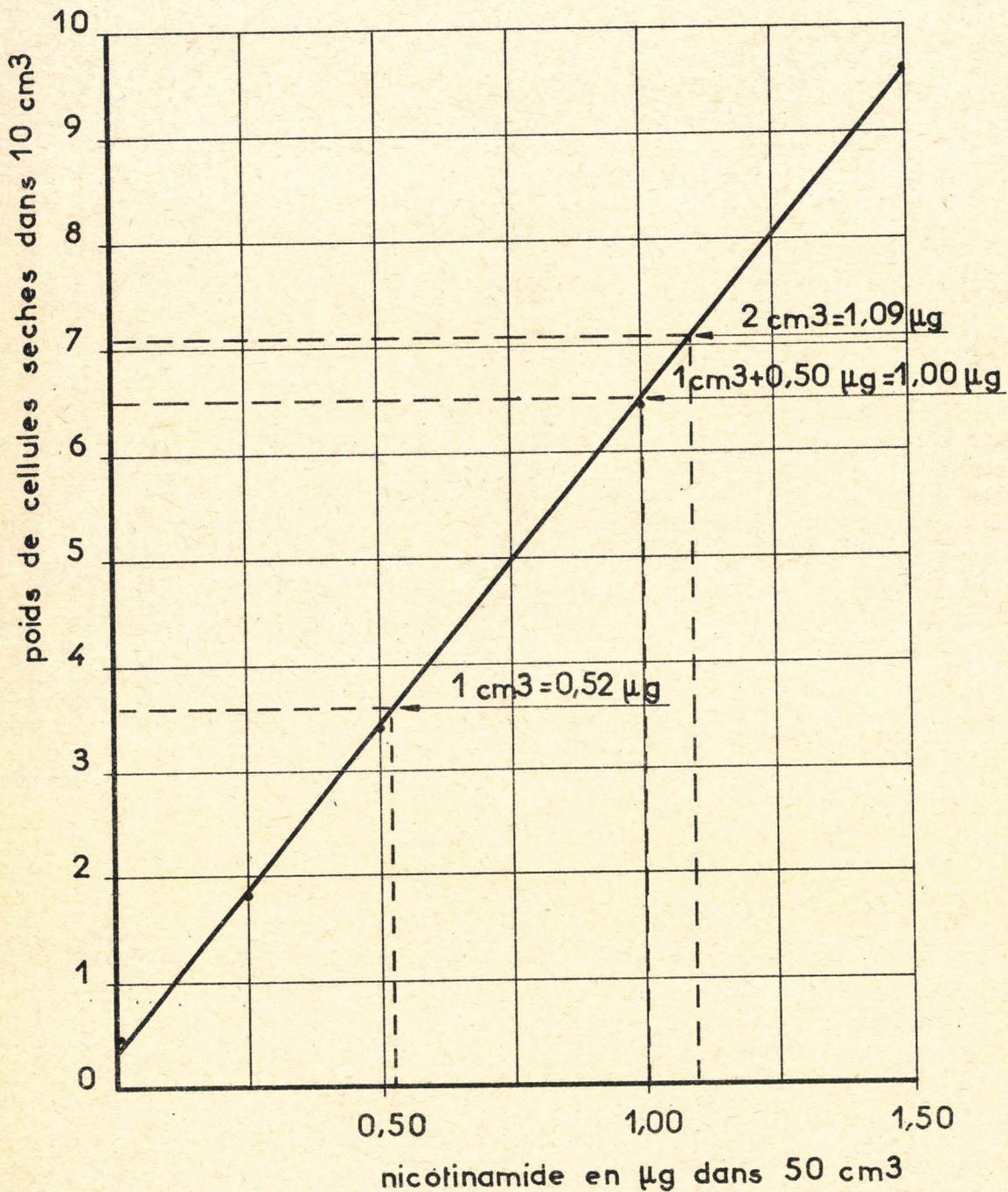
Exemple numérique et lecture des résultats:

Le dosage étant toujours effectué sur un lacto-sérum de fromagerie dilué au demi, les fioles de Roux sont préparées comme l'avaient été les tubes du dosage précédent. Après 120 heures d'incubation à 20°, voici les opacités obtenues à l'électrophotomètre et le poids de cellules sèches correspondant à chacune d'elles.

TABLEAU H

		Opacité N divisions (N = n - n ₀)	Poids de cellules sèches en mg/10 cm ³ (d'après le gr. VII)
<u>Echelle</u> μg de nicotinamide dans 50 cm ³	0,00	48	0,50
	0,25	141	1,30
	0,50	232	3,40
	1,00	337	6,45
	1,50	404	9,60
<u>Dosage</u> cm ³ de sérum dilué dans 50 cm ³	1	241	3,60
	2	352	7,10
	1 cm ³ + 0,50 μg de nicotinamide	339	6,50

GRAPHIQUE XI



CHAPITRE E

COMPARAISON ENTRE LES DEUX METHODES DE DOSAGE

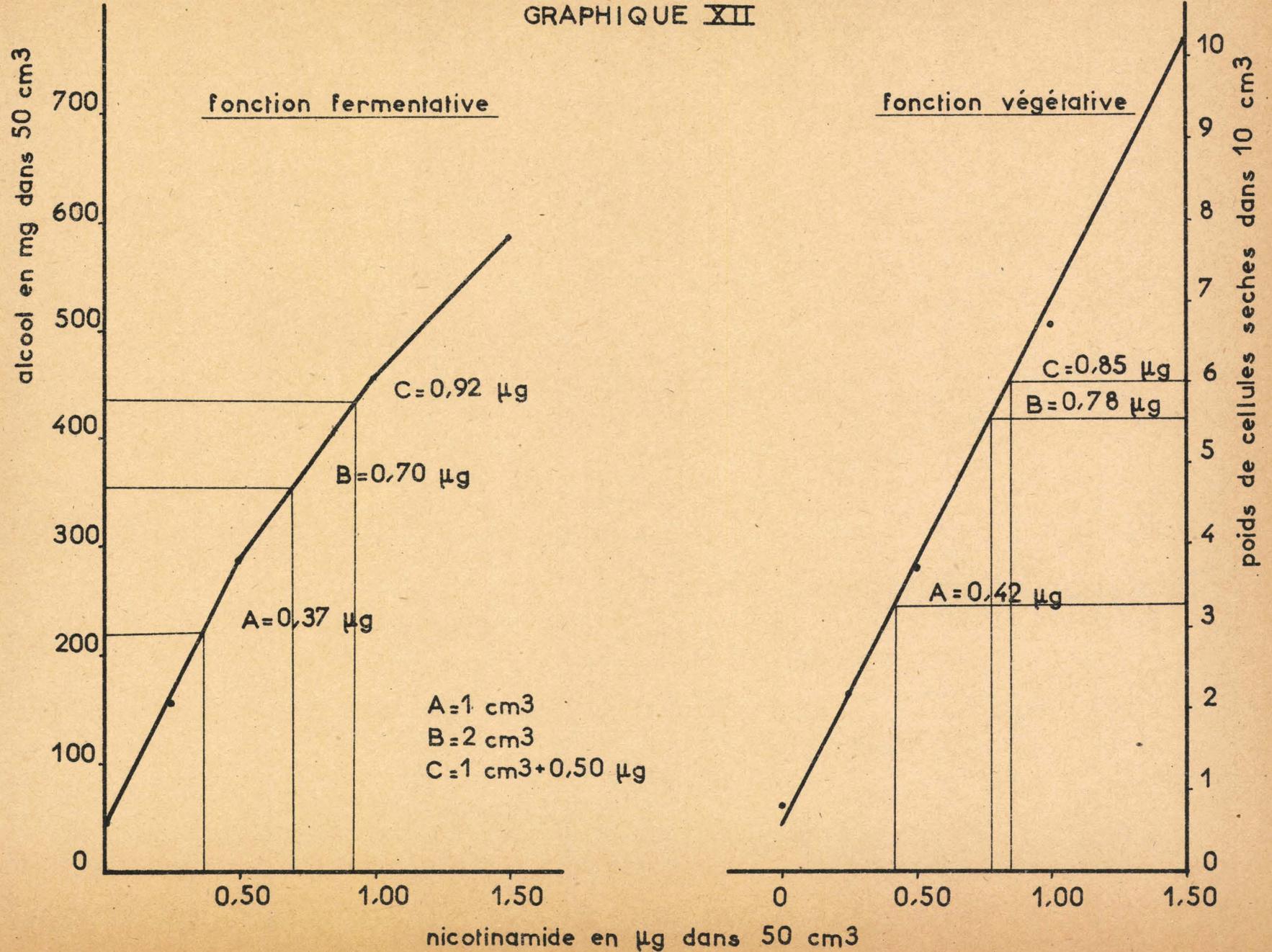
Les deux méthodes décrites dans les chapitres précédents, examinées l'une après l'autre comme nous venons de le faire, sont donc applicables au dosage microbiologique de la nicotinamide.- Il était intéressant de les mettre en parallèle, en effectuant, dans les conditions expérimentales décrites, sur un même lactosérum, deux dosages utilisant simultanément l'une et l'autre.

Nous avons rassemblé dans le tableau I et le graphique XII les résultats analytiques de ces dosages.

TABLEAU I

	F. fermentative		F. végétative	
	Alcool en mg dans 50 cm ³	Opacité N divisions (N = n-n ₀)	Poids de cellules sèches dans 10 cm ³ (d'après graphique VII)	
Echelle μg de nicotinamide dans 50 cm ³	0,00	45	70	0,80
	0,25	155	164	2,15
	0,50	285	246	3,70
	1,00	455	344	6,70
	1,50	585	413	10,20
Dosage cm ³ de sérum dilué dans 50 cm ³	1	220	230	3,30
	2	355	312	5,55
	1 cm ³ +0,50 μg de nicotinamide	435	324	6,00

GRAPHIQUE XII



Résultats:

1) D'après la fonction fermentative:

1 cm³ de dilution = 0,37 μ g de nicotinamide
1 cm³ de sérum = 0,37 x 2 = 0,74 μ g
2 cm³ de dilution = 0,70 μ g de nicotinamide
1 cm³ de sérum = $\frac{0,70 \times 2}{2}$ = 0,70 μ g
1 cm³ de dilution + 0,50 μ g = 0,92 μ g de nicotinamide
1 cm³ de dilution = 0,92 - 0,50 = 0,42 μ g
1 cm³ de sérum = 0,42 x 2 = 0,84 μ g
moyenne : 0,76 μ g / cm³ de sérum

2) D'après la fonction végétative

1 cm³ de dilution = 0,42 μ g de nicotinamide
1 cm³ de sérum = 0,42 x 2 = 0,84 μ g
2 cm³ de dilution = 0,78 μ g de nicotinamide
1 cm³ de sérum = $\frac{0,78 \times 2}{2}$ = 0,78 μ g
1 cm³ de dilution + 0,50 μ g = 0,85 μ g de nicotinamide
1 cm³ de dilution = 0,85 - 0,50 = 0,35 μ g
1 cm³ de sérum = 0,35 x 2 = 0,70 μ g
moyenne : 0,77 μ g / cm³ de sérum

Les deux méthodes donnent donc des résultats assez rapprochés pour apporter une assurance complémentaire sur leur utilisation au dosage microbiologique de la nicotinamide.

-:-:-:-:-:-:-:-:-:-

CHAPITRE F

REMARQUES COMPLEMENTAIRES CONCERNANT LES DEUX METHODES

PREPARATION DES EXTRAITS

Ils devront avoir une concentration finale en vitamine étudiée d'environ 0,2 à 0,5 μ g par centimètre cube.

Si le dosage doit s'effectuer sur des substances hydrosolubles, il suffit de les mettre en solution dans l'eau bidistillée pour obtenir la concentration désirée (c'est le cas notamment du lactosérum de fromagerie et c'est pour cette raison de simplification que nos premiers dosages ont porté sur ce matériel).

Si la substance n'est pas hydrosoluble, ce qui représente la majorité des cas, il convient d'effectuer une extraction par hydrolyse acide.-- Nous avons expérimenté les deux méthodes suivantes:

- hydrolyse durant 30 minutes à l'autoclave à 120° dans au moins 5 à 10 volumes de SO_4H_2 normal pour 1 volume de la substance à extraire (6, 21)

- hydrolyse durant 2 heures au bain-marie bouillant avec, pour environ 5 g. de substance, 30 cm³ d'eau et 10 cm³ de ClH à 25 % (22). Dans les deux cas, l'hydrolyse terminée, ramener à pH 6,8 (Indicateur bleu de bromothymol) et filtrer.

Ces deux méthodes d'extraction nous ont donné des résultats absolument semblables. Nous utilisons maintenant la première, qui est plus rapide et qui permet, en effectuant la neutralisation avec de la baryte finement broyée, d'éliminer l'acide sulfurique du milieu sous forme de SO_4Ba insoluble et retenu lors de la filtration.

Certains auteurs qui utilisent comme agent de dosage

des bactéries, recommandent d'éliminer les protéines, (à pH 4,5) (23) et les lipides (extraction par les solvants des graisses du produit initial) particulièrement gênants pour le dosage de la riboflavine. (23, 24). Nous n'avons pas remarqué, à la suite d'essais systématiques, que ces substances soient inhibitrices ou activatrices pour la levure.

Nous tenons seulement compte, pour les dosages sur les produits très gras (produits laitiers particulièrement), du volume occupé par la matière grasse surnageante, et c'est la phase aqueuse que nous ajustons au volume désiré.

ACTION DE LA QUANTITE DE SUCRE

a) Sur la fonction fermentative

Nous avons démontré que la quantité d'alcool formé était uniquement fonction de la quantité de nicotinamide présente dans le milieu et absolument indépendante de la dose de sucre.

Le milieu de base, additionné de 0,50 μ g de nicotinamide dans 50 cm³, soumis à la fermentation alcoolique tel quel et enrichi de 100 mg et 500 mg de lactose pour 50 cm³, a donné exactement la même quantité d'alcool (voir tableau J)

TABLEAU J

Composition du milieu	Alcool en mg/50 cm ³
milieu de base tel quel (soit: 2 g lactose/50 cm ³)	290
milieu de base + 100 mg lactose (soit: 2,1 g lactose/50 cm ³)	290
milieu de base + 500 mg lactose (soit: 2,5 g lactose/50 cm ³)	290

b) Sur la fonction végétative

De la même façon, nous avons démontré que la multiplication cellulaire était pratiquement indépendante de la quantité de sucre présente et uniquement fonction de la nicotine mise à la disposition de la levure.

Utilisant le même procédé, nous avons relevé les résultats résumés dans le tableau K.

TABLEAU K

Nicotinamide en μ g dans 50 cm ³	Composition du milieu		Opacité N divisions	Poids de cellules sèches en mg/10 cm ³ (d'après le gr. VII)
0,50) 50cm ³) { de milieu) { de base) {	0 g lactose soit: 1 g lact/50cm ³	249	3,80
		+ 0,100 g lactose soit: 1,1 g lact/50cm ³	251	3,85
		1 g lactose soit: 2 g lactose/50cm ³	242	3,65
0,25) 50 cm ³) { de milieu) { de base) {	0 g lactose soit: 1 g lact/50cm ³	145	1,85
		+ 1 g. lactose soit: 2 g lactose/50cm ³	140	1,80
		3 g lactose soit: 4 g lactose/50cm ³	133	1,70

Ces deux constatations sont du plus grand intérêt pratique, car elles permettent de ne pas tenir compte de l'apport de sucre par l'extrait, au moment du dosage.

Signalons que cet apport, quoique important dans le cas particulier de certains produits laitiers comme le lait concentré ou le lait en poudre, ne serait jamais de l'ordre des quantités expérimentées dans les essais ci-dessus.

ETUDE DES AUTRES SUCRES FERMENTES PAR LA LEVURE

Nous avons vu, au chapitre de l'identification de la levure, que, si elle faisait fermenter le lactose (phénomène qui a beaucoup aidé à cette identification), d'autres sucres tels que: glucose, mannose, saccharose, galactose, étaient aussi fermentés de façon intense.

Nous avons cherché à voir si, en remplaçant systématiquement le lactose, dans la formule de composition du milieu de base, par ces différents sucres pris séparément, les courbes conservaient la même allure générale et si, par conséquent, tout autre sucre susceptible d'être fermenté pouvait servir au dosage.

Comme cela était à prévoir, le tableau L et le graphique XIII répondent affirmativement à cette question.

Le glucose, le mannose, le saccharose donnent des courbes confondues avec celle du lactose.

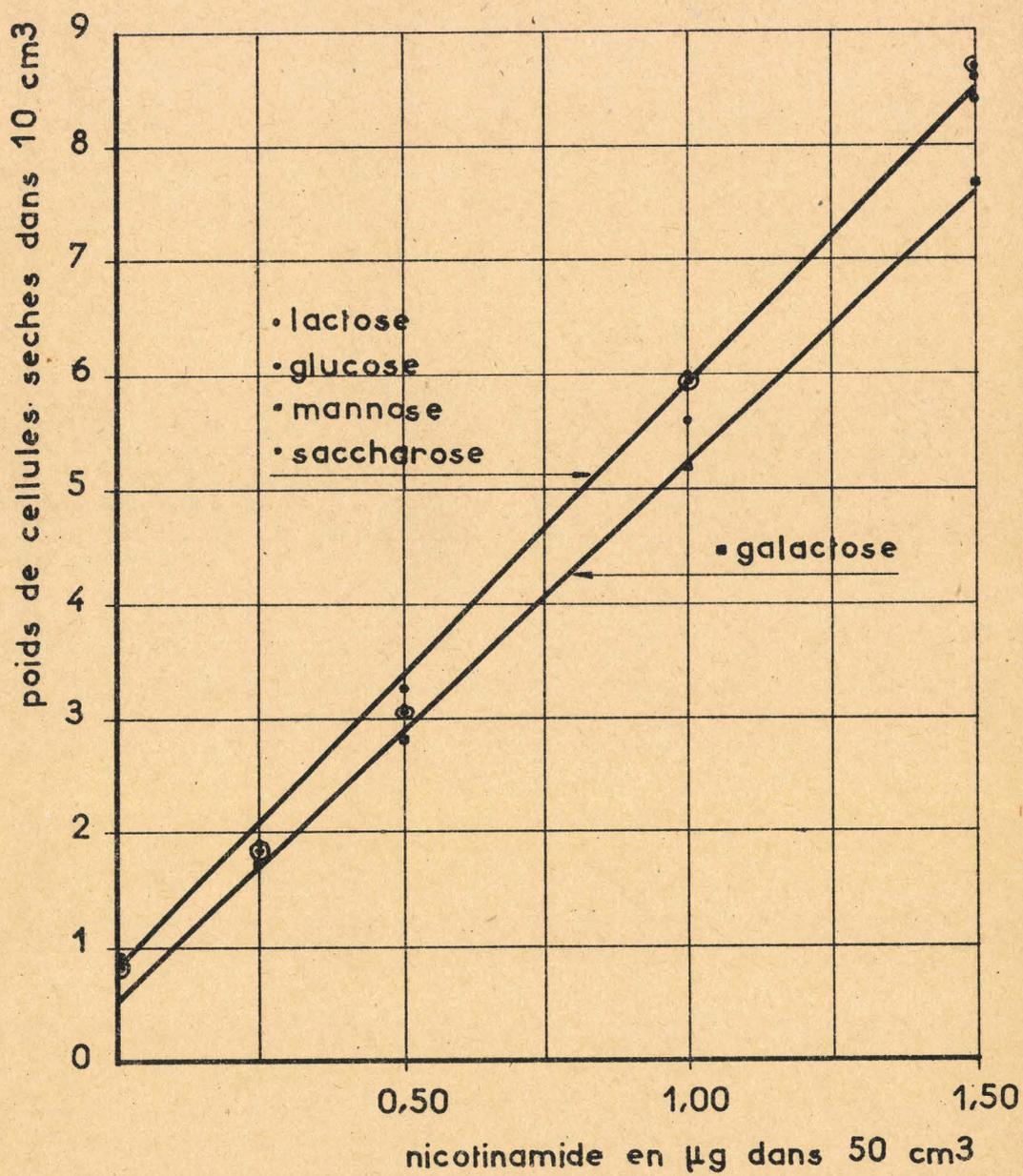
La courbe du galactose a un coefficient angulaire plus faible, mais demeure une droite et traduit graphiquement, comme pour les autres sucres, la proportionnalité entre la teneur en nicotinamide et la richesse en cellules de levures produites.

TABLEAU L

Nicotinamide en μg dans 50 cm^3	Sucres entrant dans la composition du milieu de base									
	Lactose		Glucose		Mannose		Saccharose		Galactose	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
0,00	71	0,80	81	0,95	69	0,80	-	-	-	-
0,25	145	1,85	145	1,85	148	1,90	-	-	137	1,75
0,50	218	3,05	221	3,10	219	3,05	228	3,25	204	2,75
1,00	326	6,00	324	5,95	324	5,95	314	5,60	300	5,20
1,50	387	8,70	385	8,60	387	8,70	381	8,40	364	7,65

Colonne 1 = Opacité en divisions du tambour ($N = n - n_0$)
Colonne 2 = Poids de cellules sèches en mg dans 10 cm^3

GRAPHIQUE XIII



VERIFICATION DE L'HYPOTHESE DU FACTEUR DE CROISSANCE

Tout ce qui précède apporte, semble-t-il, suffisamment de preuves expérimentales pour affirmer la véracité de l'hypothèse selon laquelle la nicotinamide serait pour "saccharomyces lactis β " un facteur de croissance indispensable et non synthétisé.

Nous voulons cependant rapporter les résultats d'une expérience destinée à vérifier, si besoin en était, cette hypothèse.

Nous avons étudié 2 séries de boîtes de Roux contenant:
1ère Série: 50 cm³ de milieu de base additionnés de 0,25 μ g de nicotinamide

2ème Série: 50 cm³ de milieu de base additionnés de 0,50 μ g de nicotinamide.

Après stérilisation et ensemencement, nous avons suivi l'évolution de la prolifération microbienne à l'électrophotomètre jusqu'à stabilisation des courbes (c'est à dire après 120 heures) - palier A (graphique XIV).

A ce moment, nous avons ajouté aseptiquement dans chaque série: 0,50 μ g de nicotinamide, ce qui portait la teneur finale en cette vitamine à :

1ère Série : 0,25 μ g + 0,50 μ g = 0,75 μ g dans 50 cm³

2ème Série : 0,50 μ g + 0,50 μ g = 1,00 μ g dans 50 cm³

et à partir de ce moment, nous avons à nouveau suivi durant 120 h. la courbe de croissance de chaque série jusqu'au palier B (graphique XIV)

Nous avons enfin ajouté, de la même manière 0,50 μ g de nicotinamide à chaque série, soit la teneur finale de:

1ère Série : 0,75 μ g + 0,50 μ g = 1,25 μ g dans 50 cm³

2ème Série : 1,00 μ g + 0,50 μ g = 1,50 μ g dans 50 cm³

et suivi de même la croissance durant 120 h. jusqu'au palier C (graphique XIV).

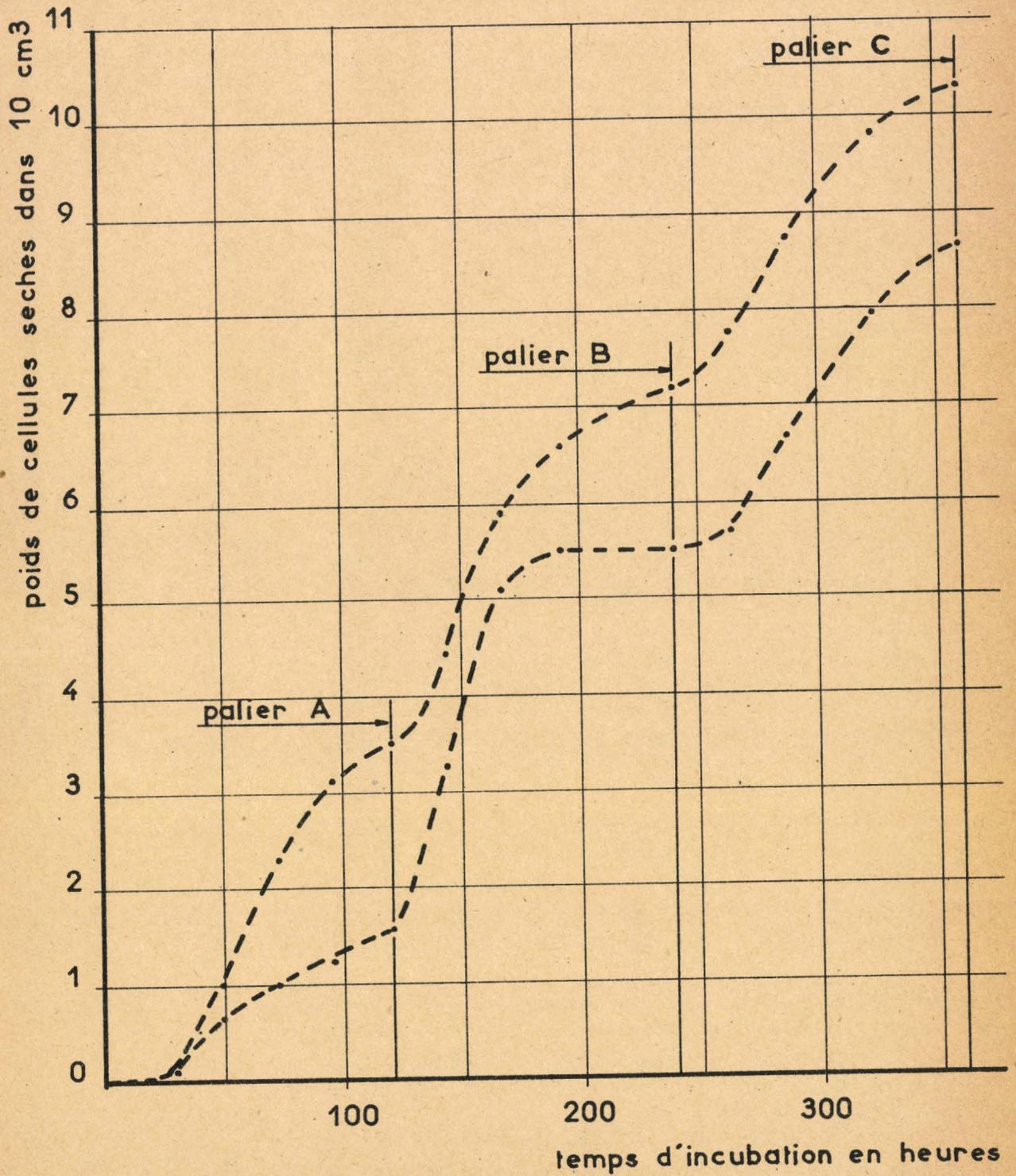
Le tableau M donne les résultats numériques de cet essai représentés ensuite par le graphique XIV (poids de cellules sèches dans 10 cm³ en fonction de la quantité de nicotinamide dans 50 cm³)

TABLEAU M

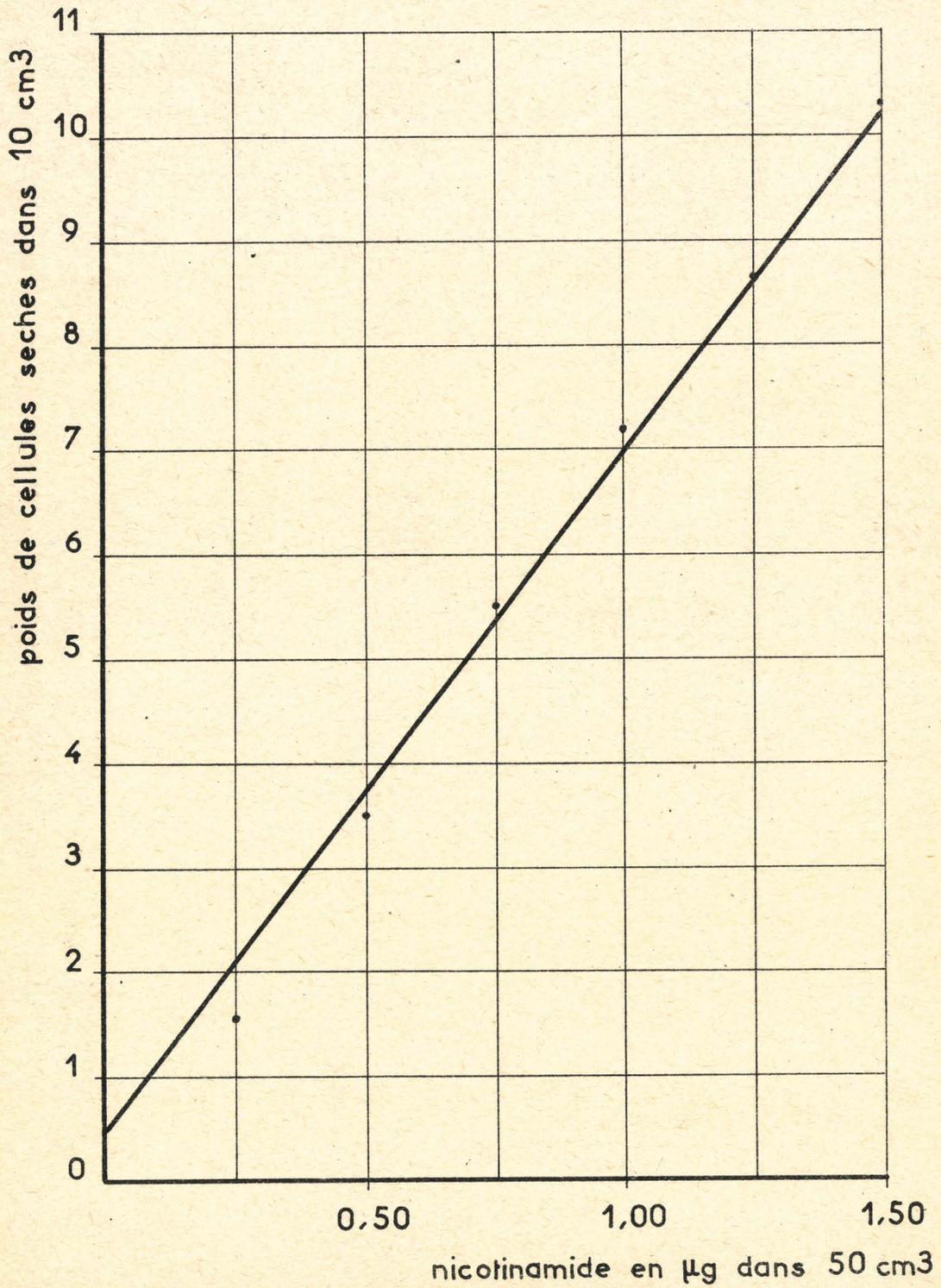
Durée d'incubation en heures	Série à 0,25 μg dans 50 cm^3		Série à 0,50 μg dans 50 cm^3	
	1	2	1	2
29	8	0,10	9	0,10
49	59	0,65	86	1,00
72	82	1,00	172	2,30
96	103	1,25	220	3,05
120	125	1,55	237	3,50
Palier A	Addition de 0,50 μg de nicotinamide			
	0,25 + 0,50 = 0,75 μg		0,50 + 0,50 = 1,00 μg	
144	228	3,25	273	4,45
168	296	5,10	323	5,90
192	310	5,50	341	6,60
240	310	5,50	355	7,20
Palier B	Addition de 0,50 μg de nicotinamide			
	0,75 + 0,50 = 1,25 μg		1,00 + 0,50 = 1,50 μg	
264	317	5,70	367	7,80
288	344	6,70	388	8,75
324	371	7,95	407	9,80
360	386	8,65	415	10,30
Palier C				
Colonne 1 = Opacité en Divisions du Tambour ($N = n - n_0$)				
Colonne 2 = Poids de cellules sèches en mg dans 10 cm^3				

Si nous prenons, pour chaque dose de nicotinamide, la

GRAPHIQUE XIV



GRAPHIQUE XV



valeur maxima de poids de cellules sèches formées (Valeur donnée après 120 h. par les paliers) et que, graphiquement, nous l'exprimions en fonction de cette dose de vitamine (graphique XV), nous obtenons la courbe étalon habituelle.

Cette constatation suffit à elle seule à confirmer l'hypothèse émise.

FORMES DE LA VITAMINE DOSEES PAR LA LEVURE.

"Saccharomyces lactis β " est sensible aux différentes formes de la vitamine telles qu'on les trouve dans les milieux complexes étudiés (produits alimentaires).

En effectuant des dosages sur des lysats de levures obtenus par congélation rapide, plusieurs fois répétée, suivie de liquéfaction, d'une suspension de levure de boulangerie (matériel riche en vitamine étudiée) dans l'eau bi-distillée, nous avons obtenu des résultats identiques (tableau N) dans les deux cas envisagés :

1er cas : dosage sur le lysat tel quel : la vitamine se trouve sous sa forme complexe et combinée.

2ème cas : dosage sur le lysat après hydrolyse acide (selon les deux méthodes classiques décrites) destinée à libérer la vitamine.

TABLEAU N

Volume d'extrait servant au dosage (en cm ³ dans 50 cm ³)	Opacités exprimées en Divisions du tambour de l'électrophotomètre		
	sur le lysat direct	sur le lysat après hydrolyse par SO ₄ H ₂ N 30' à 120°	par ClH à 25 % 2 h. à 100°
1	168	168	169
2	249	247	248
3	295	291	291

PROTOCOLE DE DOSAGE SUR DES QUANTITES PLUS FAIBLES

Pour la mise au point de ces méthodes de dosage, nous avons opéré sur des quantités de liquide relativement importantes (50 cm³ pour chaque essai).

Nous avons vérifié qu'il était possible, dans la pratique, de réduire ces volumes à 20 cm³ par exemple, ce qui a pour avantage de diminuer les quantités de milieu de culture utilisées, dont la préparation est toujours onéreuse, et de simplifier le matériel; les boîtes de Roux peuvent être remplacées par des fioles coniques de 150 cm³ par exemple. La liqueur étalon de nicotinamide sera plus diluée : 1 cm³ de solution stock pour 500 cm³ de volume final; dans ces conditions, chaque centimètre cube de solution diluée correspond à 0,20 μ g de vitanine.

La courbe étalon sera composée de :

0 - 0,50 - 1 - 2 - 3 cm³ de sol. diluée (de ni-
soit 0 - 0,10 - 0,20 - 0,40 - 0,60 μ g } coti-
namide

Chaque vase à épreuve (tubes à essais de 18 x 180 ou fioles coniques de 150 cm³) étant complété à 10 cm³ avec de l'eau bidistillée, sera additionné de 10 cm³ de milieu de culture de base (à concentration double du milieu habituel) pour faire le volume final de 20 cm³.

Les extraits servant au dosage devront être également plus dilués et renfermer de 0,10 à 0,20 μ g de nicotinamide par cm³.

L'ensemencement se fera avec 5 gouttes d'inoculum réparties au moyen d'une pipette Pasteur stérile. Nous avons vérifié qu'une légère différence de volume d'inoculum n'était pas une cause d'erreur pour le dosage.

C H A P I T R E G

QUELQUES DOSAGES EFFECTUES AU MOYEN DE CETTE METHODE

Nous avons eu l'occasion d'effectuer de nombreux dosages en utilisant surtout la méthode fondée sur l'influence de la nicotinamide sur la multiplication cellulaire de "Saccharomyces lactis β ", c'est-à-dire celle faisant appel à la fonction végétative du microorganisme.

Nous pensons qu'il peut être intéressant d'en rapporter ici quelques exemples en détail et surtout de comparer nos résultats avec ceux que donnent les auteurs ayant travaillé sur le même matériel en employant des méthodes différentes.

DOSAGES de NICOTINAMIDE SUR QUELQUES PRODUITS LAITIERS.

Nous avons étudié , du point de vue de leur richesse en nicotinamide :

- le lait de vache:
 - lait entier frais
 - lait entier acidifié par prolifération de la flore lactique spontanée.
 - lait écrémé
 - lait concentré sucré
- la crème fraîche
- les différentes grandes familles de fromage
 - fromage dit "à pâte fraîche" type : petit suisse
 - fromage dit "moisi"
 - moisissure externe, type : camembert
 - moisissure interne, type : roquefort
 - fromage dit "à pâte pressée"
 - pâte pressée non cuite, type : Saint Paulin
 - pâte pressée et cuite, type : Gruyère

Les extraits furent préparés comme nous l'avons indiqué antérieurement; le dosage, effectué en fioles de Roux, portait sur un volume final de 50 cm³; la stérilisation, conduite durant 20 minutes à 115°, était suivie de l'ensemencement à la dose de 1 cm³ d'inoculum pour 50 cm³.

Cas du lait de vache.

Courbe étalon : Tableau 0 et graphique XVI.

TABLEAU 0

Echelle μ g de nicotinamide dans 50 cm ³	Opacité N Divisions (N = n - n ₀)	Poids de cellules sèches en mg/10 cm ³ (d'après gr. VII)
0,00	77	0,90
0,25	140	1,80
0,50	234	3,40
1,00	318	5,75
1,50	375	8,20

Dosage : Tableau P et graphique XVI (Voir tableau P : page 51)

Discussion :

Le lait de vache est pauvre en nicotinamide, de plus, les teneurs données par divers auteurs sont souvent très différentes.

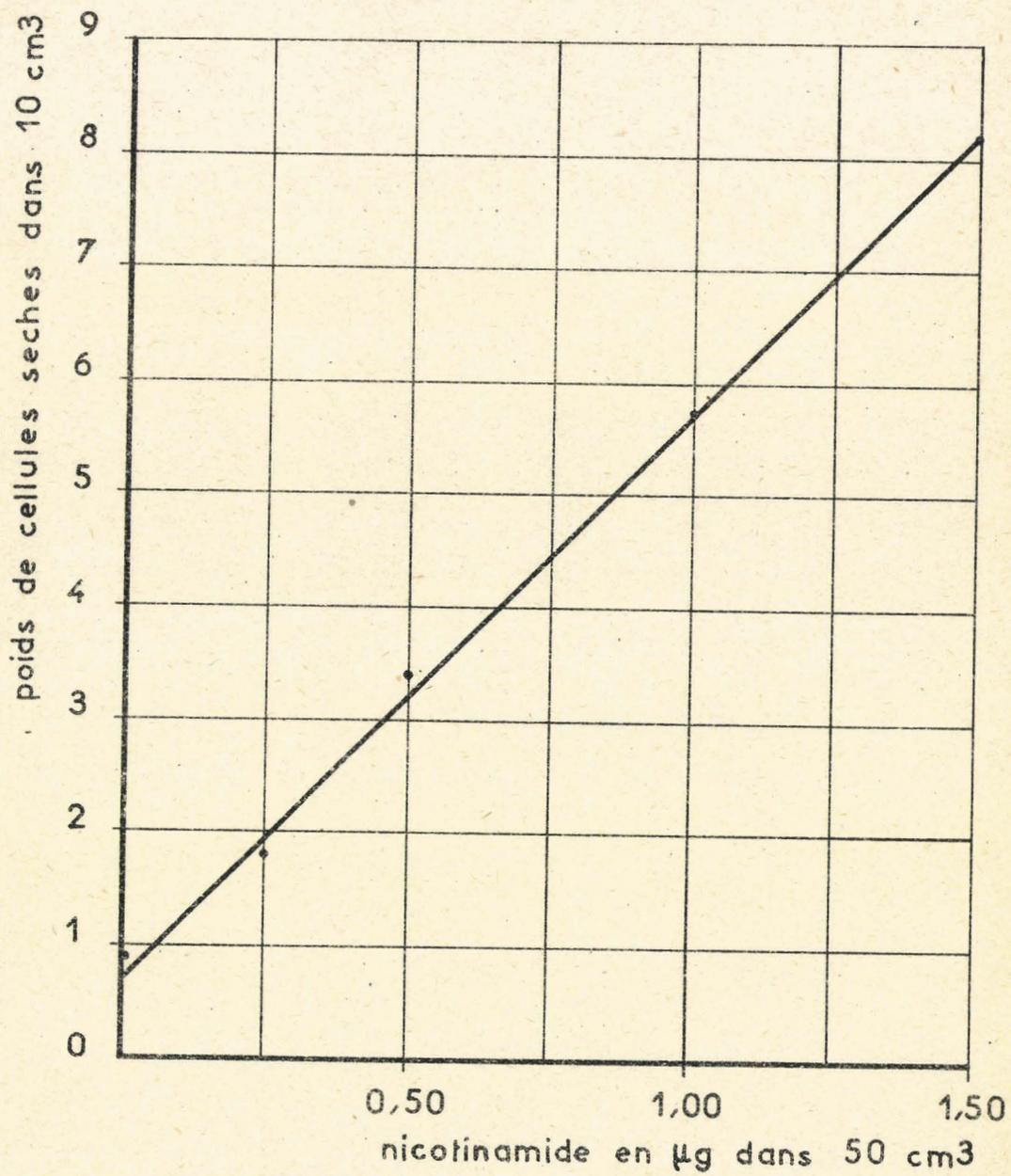
Déterminées par dosage chimique ou microbiologique, elles sont suivant les auteurs de l'ordre de :

- traces à 0,50 μ g/gramme (25)
- 1,10 μ g/gramme (26)
- 1,50 à 4,50 μ g/gramme (27)
- 4,50 μ g/gramme (28)

T A B L E A U P

Produit étudié	Préparation de l'extrait		Volume de l'extrait utilisé pour le dosage	Résultats après 120 h.	Correspondance en Nicotiramide (d'après la courbe étalon)		Valeur moyenne	Nicotinamide dans le produit étudié en μg par gramme
	Poids de produit hydrolysé	Volume final de l'extrait			Opacité (N - n ₀) (d'après gr. VII)	50 cm ³ dans les 50 cm ³ de milieu		
Lait entier frais	10gr, 381	50 cm ³	1 cm ³	117	0,14	0,14/1 = 0,14	0,155	$\frac{0,155 \times 50}{10,381} = 0,75$
				I76	0,32	0,32/2 = 0,16		
				226	0,50	0,50/3 = 0,17		
				257	0,65	0,65-0,50=0,15		
Lait entier acidifié	9gr, 722	50 cm ³	1 cm ³	I08	0,11	0,11/1 = 0,11	0,127	$\frac{0,127 \times 50}{9,722} = 0,65$
				213	0,43	0,43/3 = 0,14		
				254	0,63	0,63-0,50=0,13		
Lait écrémé	10gr, 263	50 cm ³	1 cm ³	I10	0,12	0,12/1 = 0,12	0,13	$\frac{0,13 \times 50}{10,263} = 0,65$
				I68	0,29	0,29/2 = 0,14		
				210	0,42	0,42/3 = 0,14		
				252	0,62	0,62-0,50=0,12		
Lait concentré sucré	4gr, 061	50 cm ³	1 cm ³	I52	0,24	0,24/1 = 0,24	0,26	$\frac{0,26 \times 50}{4,061} = 3,20$
				231	0,52	0,52/2 = 0,26		
				291	0,85	0,85/3 = 0,28		
				277	0,76	0,76-0,50=0,26		

GRAPHIQUE XVI



Nos résultats, de 0,65 à 0,75 $\mu\text{g}/\text{gramme}$, se trouvent encadrés par ces différentes valeurs.

Cette faible teneur du lait en nicotinamide pouvait être attribuée, jusqu'à ces dernières années, au fait que la vache ne synthétisait peut-être pas cette vitamine (29), mais des travaux récents ont démontré que cette synthèse était réalisée chez la vache à partir du tryptophane (30). De plus, les microorganismes du tube digestif sont capables de produire, chez les ruminants, une quantité de nicotinamide suffisante pour couvrir la totalité des besoins de l'organisme (31).

Par conséquent, les facteurs extérieurs tels que l'alimentation ne peuvent être mis en cause pour expliquer ce phénomène (32).

D'autre part, il n'existe pas de différence entre le lait entier frais et le lait entier acidifié, ce qui tend à prouver que les ferments lactiques qui constituent la flore banale des laits ne synthétisent pas la nicotinamide.

Il n'existe pas non plus de différence entre le lait entier et le lait écrémé: le beurre est donc quasi privé de nicotinamide, comme l'indique d'ailleurs Morel en donnant pour un beurre le taux de : 0,06 à 0,08 $\mu\text{g}/\text{gramme}$ (29 p.91)

Cas de la crème :

Courbe étalon : Tableau Q et graphique XVII

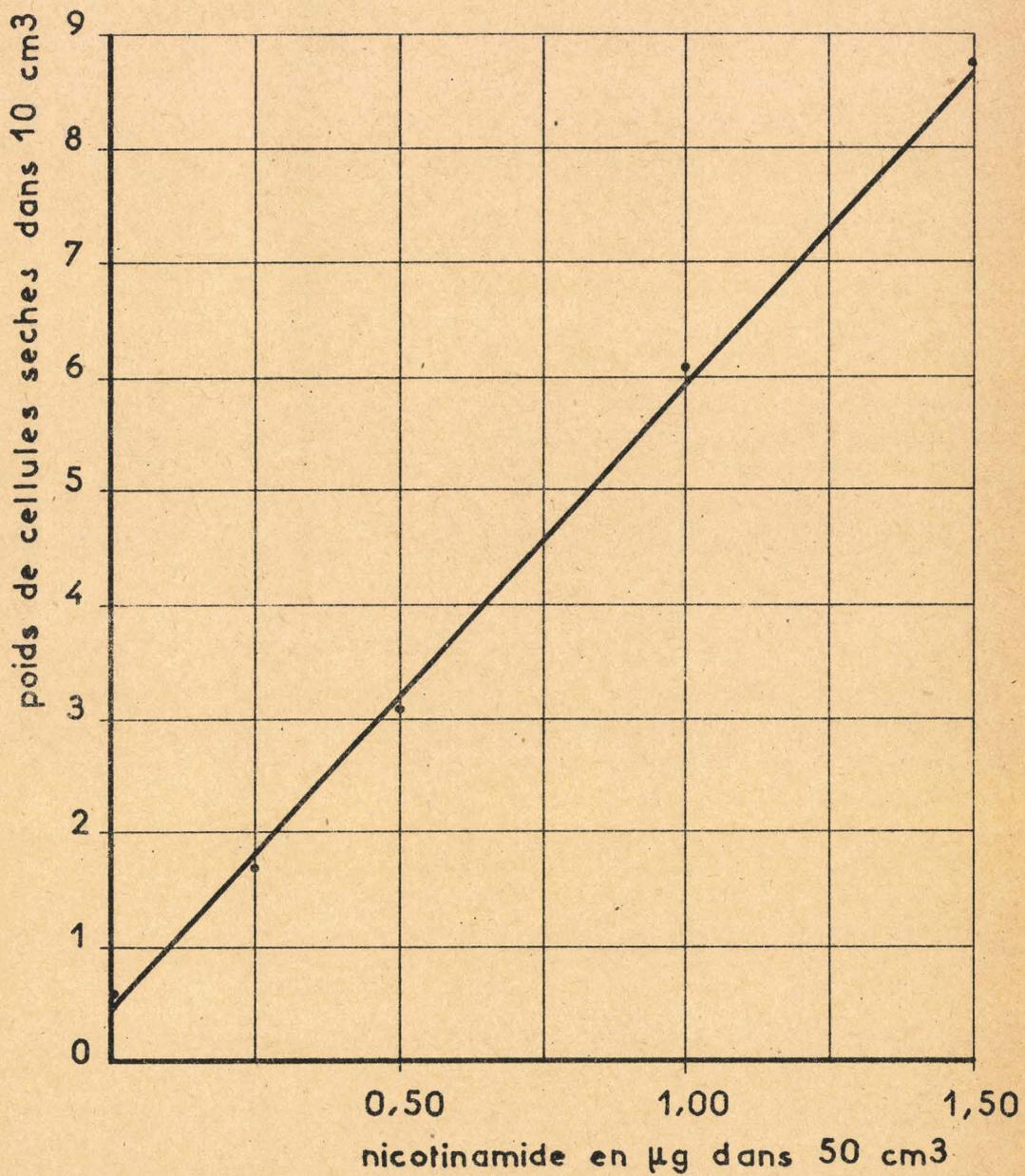
T A B L E A U Q

Echelle μg de nicotinamide dans 50 cm^3	Opacité N Divisions (N = n - n ₀)	Poids de cellules sèches en $\text{mg}/10 \text{ cm}^3$ (d'après gr. VII)
0,00	53	0,60
0,25	134	1,70
0,50	221	3,10
1,00	329	6,10
1,50	388	8,75

T A B L E A U R

Produit étudié	Préparation de l'extrait Poids de produit hydrolysé	Volume de l'extrait utilisé pour le dosage	Résultats après 120 h. Opacité (N = n - n ₀)	Poids de cellules (d'après gr. VII)	Correspondance en Nicotinamide (d'après la courbe étalon)	Valeur moyenne	Nicotinamide dans le produit étudié en μg par gramme
Crème	8gr, 070	50 cm ³	82	0,95	0,08	0,08/1 = 0,08	$\frac{0,08 \times 50}{8,07} = 0,50$
		2 cm ³	115	1,40	0,15	0,15/2 = 0,07	
		3 cm ³	155	2,00	0,26	0,26/3 = 0,09	
		1 cm ³ + 0,50 μg Nicotinamide	245	3,70	0,58	0,58 - 0,50 = 0,08	

GRAPHIQUE XVII



Dosage : Tableau R et Graphique XVII (voir tableau R : page 54)

Discussion :

Nous n'avons pas trouvé de résultats analytiques concernant la richesse des crèmes fraîches en nicotinamide.

Par contre, si nous examinons une crème titrant 30 % de matières grasses, nous pouvons la considérer comme étant composée de l'ensemble suivant:

Beurre (exprimé en matière grasse pure)	30 %
Lait écrémé (diluant)	70 %

Nous avons démontré et admis avec Morel que le beurre ne renfermait que des traces de nicotinamide; la totalité de cette vitamine retrouvée dans la crème serait donc apportée par le lait écrémé (à $0,65 \mu\text{g}/\text{gramme}$)

soit : pour 1 g de crème : $0,65 \times \frac{70}{100} = 0,45 \mu\text{g}$, valeur tout à fait comparable à celle trouvée par le dosage qui est de $0,50 \mu\text{g}/\text{gramme}$ de crème.

Cas du fromage

Courbe étalon : Tableau Q et graphique XVII
(Voir cas de la crème)

Dosage : Tableau S et graphique XVII (voir tableau S : pages 57-58)

Discussion :

Dans un travail récent sur la teneur de différents types de fromages en vitamines et notamment en nicotinamide (33) les auteurs ont trouvé :

Petit suisse à 30 % M.G.	: $3 \mu\text{g}$
Brie gras	: $7 \mu\text{g}$
Camembert à 45 % M.G.	: $8,8$ à $10,5 \mu\text{g}$
Roquefort à 45 % M.G.	: $4,3$ à $8,5 \mu\text{g}$
Port-salut gras	: $0,70 \mu\text{g}$
Gruyère à 45 % M.G.	: $1,80 \mu\text{g}$

(Valeurs exprimées pour 1 gramme de fromage)

T A B L E A U S

Produit étudié	Préparation de l'extrait	Volume de l'extrait utilisé pour le dosage	Résultats après 120 h.	Correspondance en Nicotinamide (d'après la courbe étalon)		Valeur moyenne	Nicotinamide dans le produit étudié en μg par gramme
				Opacité ($N - n_0$)	Poids de cellules (d'après gr. VII)		
Petit suisse à 45% M.G.	7gr, 892	50 cm^3	202	2,70	0,39	0,39/I = 0,39	$\frac{0,375 \times 50}{7,892} = 2,40$
			284	4,75	0,77	0,77/2 = 0,38	
			341	6,60	I, II	I, II/3 = 0,37	
			308	5,40	0,89	0,89-0,50=0,39	
Coulomier à 45% M.G.	4gr, 202	50 cm^3	290	4,90	0,80	0,80/I = 0,80	$\frac{0,80 \times 50}{4,202} = 9,50$
			401	9,50	env. I, 64	I, 64/2 = 0,82	
			361	7,50	I, 28	I, 28-0,50=0,78	
Roquefort à 45% M.G.	8gr, 000	50 cm^3	287	4,85	0,79	0,79/I = 0,79	$\frac{0,75 \times 50}{8,000} = 4,70$
			384	8,55	I, 47	I, 47/2 = 0,73	
			433	en dehors de la courbe-étalon			
			356	7,25	I, 23	I, 23-0,50=0,73	

T A B L E A U S (Suite)

Produit étudié	Préparation de l'extrait		Volume de l'extrait utilisé pour le dosage	Résultats après 120 h.		Correspondance en Nicotinamide (d'après la courbe étalon)	Valeur moyenne	Nicotinamide dans le produit étudié en μg par gramme
	Poids de produit hydrolysé	Volume final de l'extrait		Opacité (N = n - n ₀)	Poids de cellules (d'après gr. VII)			
Saint-Paulin à 40 % M.G.	7gr, 769	50 cm ³	1 cm ³	89	1,05	0,09	0,09/1 = 0,09	$\frac{0,09 \times 50}{7,769} = 0,60$
			2 cm ³	126	1,55	0,18	0,18/2 = 0,09	
			1 cm ³ +0,50 μg Nicotinamide	245	3,75	0,59	0,59-0,50=0,09	
Gruyère à 45 % M.G.	8gr, 215	50 cm ³	1 cm ³	85	1,00	0,08	0,08/1 = 0,08	$\frac{0,075 \times 50}{8,215} = 0,45$
			2 cm ³	133	1,35	0,15	0,15/2 = 0,07	
			3 cm ³	137	1,75	0,22	0,22/3 = 0,07	
			1 cm ³ +0,50 μg Nicotinamide	244	3,70	0,58	0,58-0,50=0,08	

Si nous remarquons que le brie, le camembert et le coulommier sont, par leur technique de fabrication et surtout par leur affinage (croûte moisie par : *Penicillium candidum*), des fromages extrêmement voisins; si nous considérons que le Saint Paulin est la nouvelle dénomination donnée à l'ancien fromage connu sous le nom de Port Salut, la comparaison entre les valeurs ci-dessus et les nôtres devient chose facile et permet de remarquer la parfaite concordance des résultats.

La forte teneur en nicotinamide des fromages moisissés: ceux à moisissure externe, sur lesquels se développe le *P. Candidum*, tels que le brie, le camembert, le coulommier, et ceux à moisissure interne, à l'intérieur desquels se développe le *P. Glaucum*, tel que le roquefort, prouve la faculté qu'ont ces microorganismes de synthétiser cette vitamine.

Cette remarque avait d'ailleurs déjà été faite par divers auteurs (33, 34) qui indiquent entre les parties moisies et les parties non moisies d'un même fromage les différences suivantes.

TABLEAU T

(Teneur en nicotinamide des fromages moisissés)			
	d'après (34)	d'après (33)	
Camembert	(partie moisie	25 $\mu\text{g/g}$	23 $\mu\text{g/g}$
	(partie non moisie	3 $\mu\text{g/g}$	7,5 $\mu\text{g/g}$
Bleu d'Auvergne (fromage type Roquefort)	(partie moisie	-	8,6 $\mu\text{g/g}$
	(partie non moisie	-	1,7 $\mu\text{g/g}$

Par contre, les fromages à pâte pressée, tels que le gruyère et le Saint-Paulin, qui subissent un affinage plus

lent et exempt de moisissures, se révèlent très pauvres en nicotinamide.

DOSAGES DE NICOTINAMIDE SUR QUELQUES AUTRES PRODUITS ALI-MENTAIRES.

Nous avons dosé la nicotinamide sur :

- des produits végétaux:
 - la tomate
 - la pomme de terre
 - la salade
 - le riz
 - la carotte
 - le haricot sec
- la levure pressée de boulangerie
- le pain

Cas des produits végétaux

Courbe étalon : Tableau U et graphique XVIII

TABLEAU U

Echelle μ g de nicotinamide dans 50 cm ³	Opacité N Divisions (N = n - n ₀)	Poids de cellules sèches en mg/10 cm ³ (d'après gr. VII)
0,00	48	0,55
0,25	130	1,65
0,50	221	3,10
1,00	325	6,00
1,50	381	8,40

Dosage : Tableau V et graphique XVIII

(Voir tableau V : pages 61-62)

Discussion :

De grands écarts existent entre les teneurs en

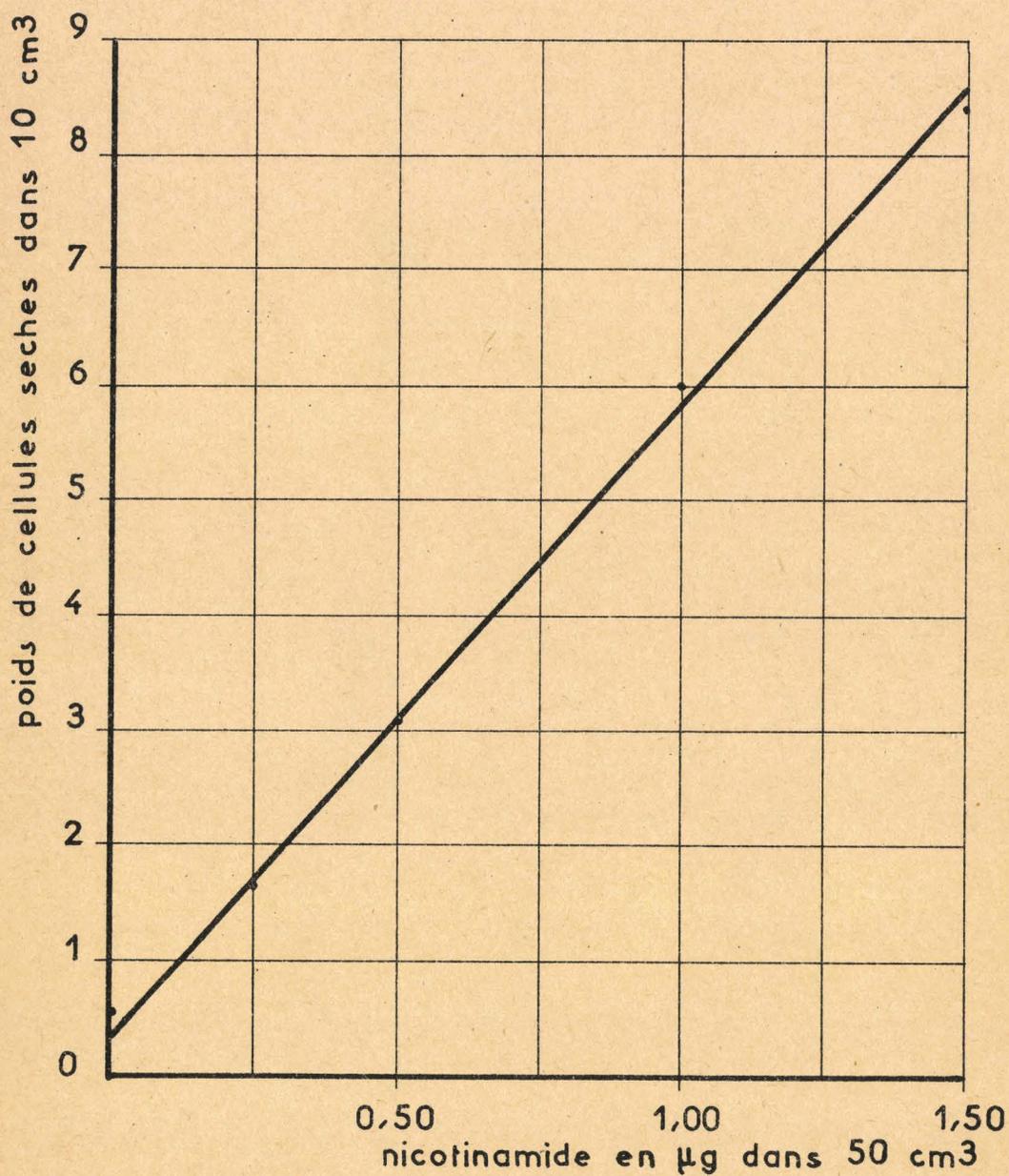
T A B L E A U V

Produit étudié	Préparation de l'extrait		Volume de l'extrait utilisé pour le dosage	Résultats après 120 k. Opacité (N = n - n ₀) d'après gr. VII)	Correspondance en Nicotiramide (d'après la courbe étalon)		Valeur moyenne	Nicotinamide dans le produit étudié en µg par gramme
	Poids de produit hydro-lysé	Volume final de l'extrait			dans les 50 cm ³ de milieu	rapportée au cm ³ d'extrait		
Tomate	0gr, 578	50 cm ³	1 cm ³	I88	2,50	0,39	0,39/I = 0,39	$\frac{0,35 \times 50}{0,578} = 30$
			2 cm ³	257	4,00	0,67	0,67/2 = 0,34	
			3 cm ³	321	5,85	I,00	I,00/3 = 0,33	
			1cm ³ + 0,50 µg Nicotinamide	292	4,95	0,84	0,84-0,50=0,34	
Pomme de terre	0gr, 391	50 cm ³	1 cm ³	I93	2,55	0,40	0,40/ I = 0,40	$\frac{0,375 \times 50}{0,391} = 48$
			2 cm ³	274	4,45	0,75	0,75/ 2 = 0,38	
			3 cm ³	338	6,50	I, I2	I, I2/ 3 = 0,34	
			I cm ³ + 0,50 µg Nicotinamide	298	5,15	0,88	0,88-0,50=0,38	
Salade	0gr, 976	50 cm ³	1 cm ³	I76	2,35	0,36	0,36/I = 0,36	$\frac{0,34 \times 50}{0,976} = 17,50$
			2 cm ³	265	4,25	0,71	0,71/2 = 0,36	
			3 cm ³	316	5,65	0,97	0,97/3 = 0,32	
			I cm ³ + 0,50 µg Nicotinamide	289	4,90	0,83	0,83-0,50=0,33	

T A B L E A U V (Suite)

Produit étudié	Préparation de l'extrait	Volume de l'extrait utilisé pour le dosage	Résultats après 120 h.		Correspondance en Nicotinamide (d'après la courbe étalon)		Valeur moyenne	Nicotinamide dans le produit étudié en μ g par gramme
			Opacité (N - n ₀)	Poids de cellules (d'après gr. VII)	dans les 50 cm ³ de milieu	rapportée au cm ³ d'extrait		
Riz	50 cm ³	1 cm ³	74	0,85	0,09	0,09/1 = 0,09	0,08	$\frac{0,08 \times 50}{0,089} = 45$
		2 cm ³	96	1,15	0,14	0,14/2 = 0,07		
		3 cm ³	156	2,05	0,31	0,31/3 = 0,10		
		1 cm ³ +0,50 μ g Nicotinamide	237	3,50	0,57	0,57-0,50=0,07		
Carotte	50 cm ³	1 cm ³	262	4,15	0,69	0,69/1 = 0,69		
		2 cm ³	343	6,70	1,16	1,16/2 = 0,58		
		3 cm ³	414	10,20	env. 1,82	1,82/3 = 0,61		
		1 cm ³ +0,50 μ g Nicotinamide	329	6,15	1,06	1,06-0,50=0,56		
Haricot sec	50 cm ³	1 cm ³	344	6,75	1,17	1,17/1 = 1,17		
		2 cm ³	() en dehors de la courbe étalon					
		3 cm ³						
		1 cm ³ +0,50 μ g Nicotinamide		399	9,40	1,67		
								$\frac{1,17 \times 50}{0,035} = 1670$

GRAPHIQUE XVIII



nicotinamide des produits végétaux étudiés, données par différents auteurs:

Tomate : moins de	5	μ g/gramme (35)
	3	μ g/gramme (36)
	24	μ g/gramme (37)
Pomme de terre :	10	μ g/gramme (25)
	20	μ g/gramme (35)
	31	μ g/gramme (36)
Riz :	13	μ g/gramme (36)
	17	μ g/gramme (35)
	26	μ g/gramme (38)
	70	μ g/gramme (37)
Carotte: moins de	5	μ g/gramme (35)
	4	μ g/gramme (36)
Haricot sec :	16	μ g/gramme (36)
	58	μ g/gramme (37)

Nous n'avons rien trouvé concernant la salade; nous donnons ici des valeurs pour les épinards et les choux, sans toutefois établir de comparaison rigoureuse.

Epinards :	15	μ g/gramme (36)
	17	μ g/gramme (35)
Choux:	3	μ g/gramme (35)
	4,4	μ g/gramme (36)

Dans l'ensemble, compte tenu de ces différences, nous pouvons dire que nos dosages sont, pour tous les cas envisagés, du même ordre de grandeur, sauf pour le haricot sec, au sujet duquel il convient d'ajouter quelques remarques.

Les résultats absolument disproportionnés trouvés pour cette légumineuse, de 25 à 100 fois supérieurs à ceux donnés par les auteurs, ne sont pas l'effet d'un hasard.

Nous avons retrouvé plusieurs fois des chiffres comparables, dépassant le mg de vitamine pour 1 gramme de produit!

Les dosages effectués

- sur le haricot broyé, puis hydrolysé,
 - sur le haricot bouilli dans l'eau distillée durant 2 h.30, puis hydrolysé,
 - sur le haricot autoclavé dans l'eau distillée durant 1 h.30 à 120°, puis hydrolysé,
- nous ont donné des résultats absolument identiques.

(Nous nous bornerons à résumer dans le tableau W les valeurs permettant de construire la courbe étalon et de calculer les résultats).

TABLEAU W

Courbe étalon		Dosage			
Echelle µg de nico- tinamide dans 50 cm ³	Poids de cellules sèches en mg dans 10 cm ³ (d'après gr. VII)	Volume de l'extrait utilisé pour le dosage	Valeurs moyennes pour les 3 traitements		
			Résultats après 120 h. (Poids de cellules d'après gr.VII)	Correspondance en Nicotinamide (d'après la courbe étalon)	dans les 50 cm ³ de milieu
0	0,70	1 cm ³	4,10	0,59	0,59/1=0,59
0,25	1,80				
0,50	3,25	2 cm ³	6,45	0,96	0,96/2=0,48
1,00	6,75				
1,50	10	3 cm ³	8,60	1,31	1,31/3=0,44

l'extrait renferme : 0,40 mg de haricot sec par cm³
chaque cm³ apporte la valeur moyenne de 0,50 µg de nicotinamide
soit par gramme de haricot sec : $\frac{0,50 \times 1000}{0,40} = 1250 \mu\text{g}$

" Saccharomyces lactis β " dose-t-il des précurseurs ou des dérivés de la nicotinamide que ne doseraient pas les méthodes microbiologiques utilisées par les autres auteurs?

Produit étudié	Préparation de l'extrait		Volume de l'extrait utilisé pour le dosage	Résultats après 120 h.		Correspondance en Nicotiramide (d'après la courbe étalon)		Valeur moyenne	Nicotinamide dans le produit étudié en μg par gramme
	Poids de produit hydrolysé	Volume final de l'extrait		Opacité (N = n - n ₀)	Poids de cellules (d'après gr. VII)	dans les 50 cm ³ de milieu	rapportée au cm ³ d'extrait		

T A B L E A U X

Levure pressée de boulangerie	Ogr, I63	I00 cm ³	I cm ³	I22	I,50	0,17	0,17/1 = 0,17	0,17 0,163 = I04
			2 cm ³	I79	2,40	0,33	0,33/2 = 0,16	
			3 cm ³	234	3,45	0,53	0,53/3 = 0,18	

T A B L E A U Y

Pain	Ogr, 49I	50 cm ³	I cm ³	I4I	I,80	0,26	0,26/1 = 0,26	0,25 0,49I = 25
			2 cm ³	2I9	3,05	0,49	0,49/2 = 0,24	
			3 cm ³	27I	4,40	0,74	0,74/3 = 0,25	
			I cm ³ +0,50 μg Nicotinamide	273	4,45	0,75	0,75-0,50=0,25	

Doserait-il, entre autres choses, la trigonelline, dérivé méthylé et bêtaïnisé de l'acide nicotinique qui, selon Justin-Besançon et Lwoff, est si abondante chez les végétaux? A l'heure actuelle, nous nous contenterons de signaler le fait sans pouvoir en donner l'explication.

Cas de la levure pressée de boulangerie.

Courbe étalon : Tableau Q et graphique XVII
(Voir paragraphe de la crème)

Dosage : Tableau X et graphique XVII
(Voir tableau X : page 66)

Discussion :

Nos résultats sont, dans le cas de la levure pressée, tout à fait conformes aux chiffres donnés par la littérature spécialisée, à savoir :

74 μ g/gramme selon (35)
116 μ g/gramme selon (39)
120 μ g/gramme selon (40)
127 μ g/gramme selon (36)
257 μ g/gramme selon (41)

Cas du pain :

Courbe étalon : Tableau U et graphique XVIII
(Voir paragraphe des produits végétaux)

Dosage : Tableau Y et graphique XVIII
(Voir tableau Y : page 66)

Discussion :

Tout comme dans le cas de la levure pressée, nos résultats se recoupent parfaitement avec ceux de Morel et de Kodicek, qui sont respectivement de :

24, 28, 26 μ g/gramme pour (36)
moins de 5, 25, 33 μ g/gramme pour (35)

---:---:---:---:---:---:---:---:---:---

C O N C L U S I O N

"Saccharomyces lactis β de Dombrowski" peut donc être défini comme étant un microorganisme pour lequel la nicotinamide est un facteur de croissance indispensable dont la synthèse est impossible.

Ce facteur de croissance lui est indispensable, de façon indifférente, sous les deux aspects de son métabolisme, c'est à dire pour l'élaboration de l'alcool aussi bien que pour la formation de cellules nouvelles.

Pour des doses de nicotinamide inférieures ou égales à 1,50 μ g dans 50 cm³ de milieu de culture, la production d'alcool d'une part ou de cellules de levure d'autre part, est sensiblement proportionnelle à la quantité de nicotinamide mise en présence de la culture et, dans les deux cas, une fonction graphique bien définie lie intimement une des variables à l'autre.

Nous avons donc, grâce à ce microorganisme, deux méthodes susceptibles de doser la nicotinamide dans les produits alimentaires.

La méthode fondée sur la fonction fermentative a l'avantage de ne nécessiter qu'un appareillage réduit et peut être utilisée dans le laboratoire le plus modestement équipé; de plus, les extraits peuvent être troubles; mais le dosage est assez long à effectuer.

Par contre, la méthode reposant sur la fonction végétative nécessite des extraits soigneusement préparés et bien limpides, la lecture des résultats ne peut se faire qu'avec un électrophotomètre, mais sa rapidité nous a fait porter notre choix sur elle pour les dosages que nous avons eu à effectuer.

B I B L I O G R A P H I E

- I : A. CAMUS et J. CLAVEAU:
IX^e Congrès Internat. Ind. Agricoles
C.S.4 Rome 1952
- 2 : J.E. COURTOIS:
Bull. Soc. Chim. Biol. 1951, 33, p. 1655
- 3 : Marc H. VAN LAER: La Chimie des fermentations
Tome I - Notions générales
Desoer Edit. Liège 1949
- 4 : M. ROGOSA :
J. Bacter 1943, 46, p. 435
- 5 : A. GUILLIERMOND: Les Levures
Collection Encyclopédie Scientifique,
Doin Edit. Paris 1912
- 6 : B.C. JOHNSON: Methods of Vitamin determination
Burgess Publishing Minneapolis 1948
- 7 : P. SIMONART: Introduction à la Microbiologie générale
Desoer Edit. Liège
- 8 : P. MANIL: Microbes et actions microbiennes
Desoer Edit. Liège 1945
- 9 : Methods of Vitamin Assay
Intersciences Publishers New York 1947
- 10 : M. WELSCH: Le dosage microbiologique des vitamines
Masson et Cie - Editeurs Paris 1947
- 11 : BURKHOLDER, VEIGH et MOYER:
J. Bacter 1944, 48, p. 385
- 12 : WILLIAMS, EAKIN, SNELL
J. Amer Chem. Soc. 1940, 62, p. 1204
- 13 : SNELL et WRIGHT
J. Biol. Chem 1941, 139, p. 675
- 14 : M. MARTIN et A. NOURRISSON
Ann. Fal. et Fraud. 1925, p. 236

- I5 : WILDIERS
La cellule 1901, 18, p. 313
- I6 : LWOFF
Ann. Ferment. 1936, 2, p. 419
- I7 : M. LANGERON: Précis de microscopie
Masson et Cie - Editeurs. Paris 1921
- I8 : P. MEUNIER
Bull. Soc. Chim. Biol. 1937, 19, p. 113
- I9 : P. MEUNIER
Ann. des ferment. 1936, 2, p. 278
- 20 : A. LWOFF et A. QUERIDO
C.R. Soc. de Biol. 1938, 129, p. 1039
- 21 : L.CHEVILLARD, R.CONDEMINE, G.GUILLOT, C.MARNAY, Y.RAOUL.
Ann. Nutri. et Aliment. 1952, 6, p. 185
- 22 : FRITZ GSTIRNER: Chemisch-physikalische Vitaminbestimmungsmethoden.
Ferdinand Enke-Verlag. Stuttgart
- 23 : STRONG et CARPENTER
Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 1942, 14, p. 909
- 24 : BAUERNFEIND, SOTIER, BORUFF.
Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 1942, 14, p. 666
- 25 : H. KRINGSTAD et F. THORESEN
Nord. Med. 1940 p. 2248
- 26 : J.M. ROSELL et J. MINUT
Le Lait 1952, 32, p. 490
- 27 : A. LWOFF et M. MOREL
Semaine Hop. Paris 1941, 17, p. 749
- 28 : D. MELNICK et H. FIELD
J. Biol. Chem. 1940, 134, p. I
- 29 : L. JUSTIN-BESANCON et A. LWOFF: Vitamine antipellagreuse et avitaminose nicotinique.
Masson et Cie - Editeurs. Paris 1942
- 30 : FUMIO Itô:
Analysé in Chemical Abstracts 1951, 45, 10.337

- 31 : R.G. WILLIAMS et coll: The biochemistry of B vitamins
ACS Monograph. N° 110 p. 298
- 32 : MOREL et BARATTE:
Ann. Inst. Pasteur 1942, 68, 538
- 33 : R. CAILLEAU, J. ADRIAN, J. LEVY:
Ann. Agronomiques 1949, 19, p. 443
- 34 : P. BURKHOLDER, J. COLLIER et D. MOYER
Food Res. 1943, 8, p. 314
- 35 : E. KODICEK:
Bioch. Jl 1940, 34, p. 724
- 36 : M. MOREL
C.R. Acad. Sci. 1941, 213, p. 530
- 37 : DEL REGNO, A. RIENZO, A. VESCIA
Quad. Nutri. 1940, 7, p. 241
- 38 : M. SWAMINATHAN
Ind. J. Med. Res. 1938, 26, p. 427
- 39 : H. KRINGSTAD et T. NAESS
Zeit Physiol Chem. 1939, 260, p. 108
- 40 : P. KARRER et H. KELLER
Helv. Chim. Acta 1939, 32, p. 1292
- 41 : E. BANDIER
Bioch. Jl. 1939, 33, p. 1130

--:--:--:--:--:--:--:--:--:--

SECONDE THESE

PROPOSITIONS DONNEES

PAR LA FACULTE

ETUDE DES SOUS-PRODUITS DE LA FERMENTATION
DANS LES BOISSONS FERMENTEES

Vu et Approuvé:

Lille, le 20 Juin 1953

LE DOYEN DE LA FACULTE DES SCIENCES.

H. LEFEBVRE

Vu et permis d'imprimer:

Lille, le 7 Juillet 1953

LE RECTEUR DE L'ACADEMIE DE LILLE,

M. SOURIAU