

INTRODUCTION

Parmi les fermentations, nombreuses sont celles qui produisent des acides gras volatils comme termes de réactions intermédiaires ou finales.

L'étude de la nature et de la quantité des acides apparus peut nous renseigner efficacement sur les mécanismes de transformation, sur leurs vitesses et sur les facteurs susceptibles de les modifier.

Malgré l'importance de ces phénomènes biologiques dans l'Industrie et l'Agriculture, peu de méthodes pratiques et rapides ont été proposées pour la séparation et le dosage des acides gras volatils.

En présence de cet état de chose, M. Ducellier, Chef de Travaux à l'Institut Agricole d'Algérie, spécialisé dans l'étude des fermentations méthaniques, très intéressé par le problème du dosage des acides gras volatils, nous avait demandé d'essayer de mettre au point une méthode simple permettant d'obtenir des tests durables et dosables par conductimétrie.

Le but de M. Ducellier était, en effet, de pouvoir disposer d'un processus d'analyse dont les manipulations devaient être assez réduites et assez peu compliquées pour être exécutées par tout laboratoire d'analyses agricoles ayant un matériel et des opérateurs non spécialisés : c'est-à-dire d'une méthode pouvant faire l'objet d'une grande diffusion et applicable aux nombreux problèmes rencontrés dans les multiples fermentations.

Au cours d'un stage de chromatographie aux laboratoires de M. E. Lederer, Maître de Conférences à la Faculté des Sciences de Paris, Directeur de Recherches au Centre National de la Recherche Scientifique, que nous remercions pour son accueil très aimable, nous avons été initié aux techniques les plus récentes. Puis, ce n'est qu'après plus de deux mille essais que nous avons pu préciser les conditions d'obtention de chromatogrammes permanents et pouvant être dosés convenablement par conductimétrie.

Dans la première partie de notre thèse sont exposées d'abord les anciennes méthodes chimiques utilisant des précipitations, des cristallisations ou des distillations qui s'avèrent à la fois longues, délicates et insuffisantes ; puis, les principes de chromatographie décrits plus récemment, fournissant au problème une solution plus satisfaisante.

Dans la seconde partie, nous basant sur ces principes de chromatographie, nous décrivons une méthode que nous avons mise au point, qui se caractérise par sa simplicité et qui ne demande qu'un minimum de matériel et d'appareillage coûteux et délicat à manipuler.

Nous terminons notre thèse en donnant des exemples d'application de cette méthode à diverses fermentations de produits végétaux et notamment de cellulose.

Nous remercions M. Ducellier, Chef de Travaux à l'E.N.A.A., qui fut l'instigateur de nos recherches en chromatographie et qui a suivi et guidé notre travail par de précieux conseils.

Nous remercions également M. le Professeur Beltran, Chef du Laboratoire de Technologie, qui nous a admis dans son service ; M. Deloye, Directeur de l'E.N.A.A. ; M. Barbut, Inspecteur Général de l'Agriculture en Algérie, auprès desquels nous avons toujours trouvé la plus entière compréhension, ce qui nous a permis de mener à bien ce travail.

PREMIERE PARTIE

**ETUDE HISTORIQUE
ET CRITIQUE
DES TRAVAUX ANTERIEURS**

CHAPITRE I

METHODES DIVERSES

Nous avons dit ci-dessus que le problème de caractérisation, de séparation et de dosage des acides volatils de la série grasse n'admettait pas avant l'application de la chromatographie de solution acceptable. Nous allons donc examiner maintenant ces diverses méthodes imparfaites, puis l'apport de la chromatographie au cours de ces dernières années.

Voici comment R. Truchet résumait la situation dans le *Traité de chimie organique de Grignard*, édition de 1939 : « Quant aux mélanges organiques que l'on rencontre souvent dans l'étude des fermentations ou des corps gras, le premier problème qui se pose est de déterminer la nature des acides en présence. En admettant qu'il soit résolu, on peut aborder la question du dosage de ces acides, mais il n'existe pas de méthodes sûres pour le traiter. »

En effet, si la caractérisation d'un seul de ces acides se fait assez facilement par les constantes physiques ou par cristallisation de certains dérivés..., le mélange de deux ou plusieurs acides n'est résolu qu'avec difficultés, car les méthodes employées dans le cas d'acides purs ne peuvent être à ce moment-là utilisés.

— Par exemple, Denigès [1] présente une méthode basée sur la formation de microcristaux de sels d'argent dont la structure est caractéristique. Nous avons essayé cette méthode de précipitation par le nitrate d'argent ammoniacal au début de notre étude des acides gras volatils : la précipitation donne des résultats assez constants si l'on ne s'écarte pas trop de certaines conditions expérimentales et si l'on s'adresse à un seul acide. Mais les résultats sont peu sûrs dans le cas d'un mélange, même de deux acides.

— D'autres séparations suivies de caractérisations moins simples ont été décrites par Phelps et Palmer [2] en ce qui concerne les acides butyrique, acétique, formique et les différentes solubilités de leurs sels de quinine dans le tétrachlorure de carbone.

— D'autre part, d'après Bosshard et Comte [3], les acides formique, acétique, propionique, butyrique peuvent aussi être séparés en utilisant successivement l'insolubilité du propionate de plomb, du formate de zinc dans l'alcool et les différences de solubilité des acétates et butyrates d'argent dans l'eau.

TABLEAU I

| | Acide formique | Acide acétique | Acide propionique | Acide butyrique | Acide valérianique |
|--------------|-------------------|-------------------|----------------------|--------------------|-----------------------|
| 10 cc | 3,5 | 5,9 | 11,5 | 17,3 | 30,5 |
| 20 cc | 7,2 | 12,2 | 22,8 | 32,7 | 53 |
| 30 cc | 11,3 | 18,7 | 33,5 | 47 | 69,5 |
| 40 cc | 15,5 | 25,6 | 44 | 58,5 | 81 |
| 50 cc | 20,2 | 32,7 | 54 | 68,8 | 88,5 |
| 60 cc | 25,5 | 40,4 | 63,3 | 77,5 | 93,5 |
| 70 cc | 31,1 | 48,7 | 72,5 | 84,3 | 96,5 |
| 80 cc | 38,5 | 57,5 | 81 | 90,5 | 98,3 |
| 90 cc | 48 | 67,5 | 88,5 | 94,6 | 99,5 |
| 100 cc | 59 | 80 | 95 | 97,5 | 100 |

Série de nombres évalués en centièmes et obtenus avec chaque acide volatil mis dans 110 cm³ d'eau à distiller et recueilli par fraction de 10 cm³.

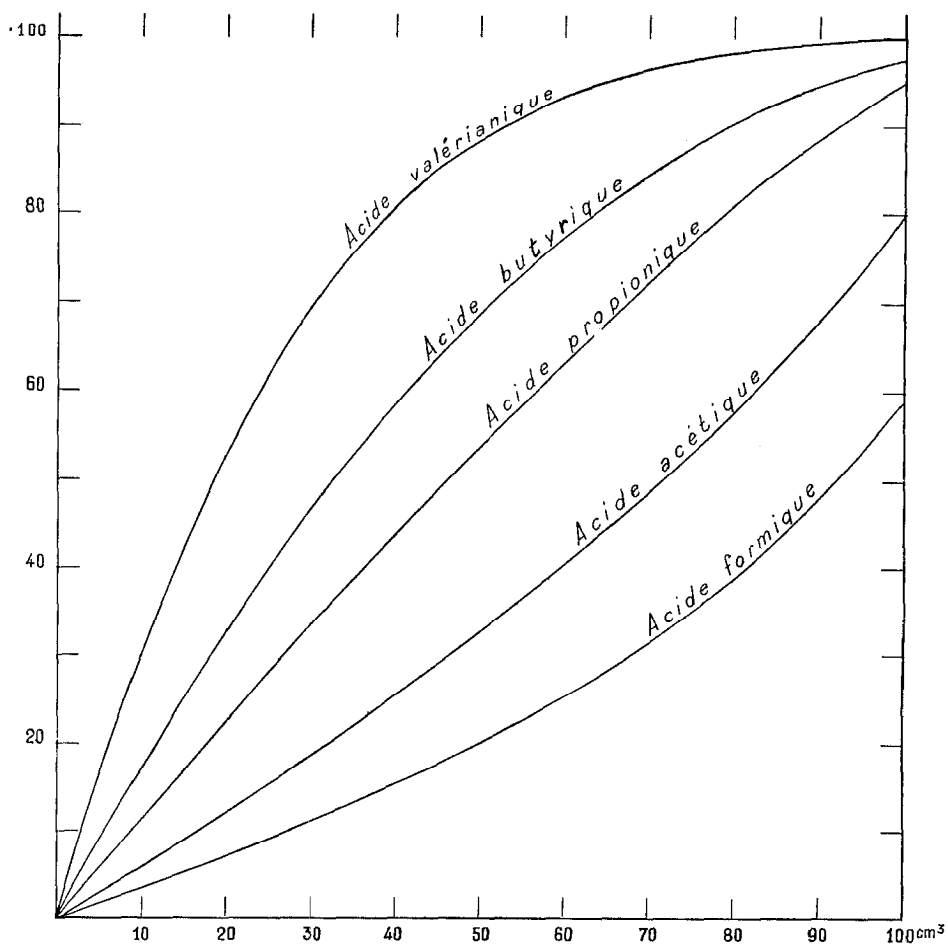


FIGURE I

Courbes de distillation de Duclaux (Traduction graphique du tableau I)

— G. Bertrand [4] donne aussi une caractérisation basée sur la précipitation des sels d'argent, puis sur la coloration obtenue avec une solution de sulfate de cuivre et avec une solution de perchlorure de fer...

— La technique de Behrens-Kley [5] repose également sur des phénomènes de solubilité et de cristallisation : on utilise d'abord l'insolubilité du formiate et de l'acétate de calcium et la solubilité des sels calciques des acides supérieurs dans l'alcool absolu ; ensuite, dans la fraction insoluble, l'acétate et le formiate sont caractérisés par formation de cristaux de formiate de cérium et d'acétate double de sodium et d'uranium. Enfin, dans la fraction soluble, les acides supérieurs sont caractérisés par action de nitrate de cuivre, nitrate d'argent...

Toutes ces méthodes qualitatives ne peuvent convenir que si le mélange ne comporte qu'un nombre restreint d'acides et s'avèrent inefficaces quant aux mélanges complexes en provenance de fermentation.

En ce qui concerne maintenant le dosage des mélanges de différents acides, on trouve également des techniques inexploitablement quand le nombre d'acides en présence est supérieur à deux.

— Avec deux acides, on utilise avec succès les différences de coefficient de partage entre deux solvants : l'eau et l'éther par exemple. En agitant une solution aqueuse de deux acides avec de l'éther et en mesurant les quantités et les titres des solutions obtenues, on en déduit un système d'équations à deux inconnues qui, résolu, donne les quantités des deux acides en présence [6] [7].

— Ce défaut qui empêche la résolution des mélanges complexes se retrouve dans la méthode la plus employée : celle de Duclaux [8] [9] [10] basée sur la distillation fractionnée d'une solution aqueuse d'acides gras.

Si l'on distille une solution aqueuse d'un seul acide gras volatil, on arrive en considérant la quantité de solution alcaline nécessaire pour titrer chaque fraction du distillat et en faisant chaque fois le rapport :

$$\frac{\text{quantité de liqueur alcaline nécessaire par chaque fraction}}{\text{quantité de liqueur alcaline nécessaire par toute la solution à distiller}}$$

à une série de nombres qui ont permis à Duclaux de formuler les lois suivantes :

« 1) La succession des nombres dans cette série d'opérations est caractéristique de l'acide volatil employé.

« 2) Il existe un rapport constant entre la quantité d'acide introduite dans le ballon et la quantité qui a distillé à un moment quelconque, de sorte que de la quantité passée dans les 10, 20, 30 ou 40 premiers centimètres cubes, on peut conclure à la quantité totale d'acide introduite dans le ballon à distillation. »

Des études approfondies de ces distillations ont permis, en outre, à Duclaux d'énoncer une troisième loi :

« 3) S'il y a plusieurs acides mélangés, chacun se comporte comme s'il était seul et suit les lois de sa distillation propre. »

Si dans l'analyse ne se trouve qu'un seul acide, on obtient une série de nombres (Tableau I) se traduisant par une courbe régulière caractéristique de l'acide (Graphique de la figure 1). Le dosage est alors facile.

Si dans l'analyse se trouvent deux acides, on aura alors une série de nombres et de courbes qui seront compris entre les nombres et les courbes que donnerait chacun des acides s'il était seul.

x et y étant les quantités d'alcali saturant respectivement la totalité de chaque acide dans le ballon à distiller,
 a_1, a_2, a_3, \dots } étant les coefficients propres à chacun de ces acides pour une
 b_1, b_2, b_3, \dots } fraction de distillat d'ordre donné (d'après le tableau de la figure 1)

et

A_1, A_2, A_3, \dots } les quantités d'alcali saturant la totalité des acides dans chaque fraction de distillat,

on obtient la série suivante d'équations :

$$\begin{aligned} x \cdot a_1 + y \cdot b_1 &= A_1 \\ x \cdot a_2 + y \cdot b_2 &= A_2 \\ x \cdot a_3 + y \cdot b_3 &= A_3 \\ &\dots \end{aligned}$$

Ces équations, prises deux à deux, admettent des solutions dont on prend les moyennes pour valeurs de x et y . On arrive ainsi, d'après Denigès [11] à « des résultats qui sont rigoureux en théorie mais seulement approchés dans la pratique ».

Par le tracé des courbes de distillation et la comparaison avec les courbes étalon, on peut également déterminer la composition et le titre du mélange d'acides à étudier.

Si dans l'analyse on a maintenant plus de deux acides volatils, on peut théoriquement résoudre une combinaison comportant autant d'acides que l'on peut obtenir d'équations de la forme :

$$\begin{aligned} x \cdot a_1 + y \cdot b_1 + z \cdot c_1 + w \cdot d_1 \dots &= A_1 \\ x \cdot a_2 + y \cdot b_2 + z \cdot c_2 + w \cdot d_2 \dots &= A_2 \\ \dots \dots \dots \dots \dots \dots \dots \dots &\dots \\ x \cdot a_n + y \cdot b_n + z \cdot c_n + w \cdot d_n \dots &= A_n \end{aligned}$$

obtenues par généralisation des formules vues dans le cas de deux acides. Mais toujours d'après Denigès [12], il arrive « qu'en réalité au delà de deux acides, des causes de perturbation latérales à l'acte distillatoire faussent le plus souvent les résultats ».

N'oublions pas aussi que n'ayant pas de méthode de caractérisation sûre de chaque acide d'un mélange complexe, nous ne pouvons savoir quels acides sont présents et par conséquent poser les équations avec certitude. Et il arrive bien souvent que l'on prétende doser uniquement deux acides d'un mélange sans savoir si ce mélange est plus complexe, ajoutant ainsi de nouvelles erreurs à une méthode qui en possède déjà.

Ces erreurs se font dans la technique du Docteur Flieg [13] lors de l'analyse d'ensilage. En effet, dans ce type d'analyse on considère uniquement et comme s'ils

étaient seuls, les acides acétique et butyrique, alors que dans les ensilages on trouve beaucoup d'autres acides (jusqu'à six) et en proportion non négligeable.

Dans un rapport de F. Anstett [14] décrivant la méthode du Dr Flieg figurent des calculs basés sur des nombres un peu trop précis pour la méthode employée. Par exemple, il est considéré, dans la distillation effectuée avec un appareillage donné, pour un volume donné... qu'il passe dans les 100 cc de tête :

24,01 % de l'acide butyrique total

et

37,95 % de l'acide acétique total

ce qui conduit au résultat suivant :

1,159 % pour la teneur en acide acétique de l'ensilage. On voit donc que les techniques d'analyse des acides gras volatils avaient besoin de perfectionnements. Ceux-ci ont été apportés depuis quelques années par la chromatographie dont nous allons analyser les différentes méthodes.

CHAPITRE II

METHODES CHROMATOGRAPHIQUES

C'est essentiellement la chromatographie de partage qui résout le problème de séparation de ces acides gras volatils. Examinons en premier lieu une méthode un peu particulière : la chromatographie en phase liquide.

— La méthode de Craig [15] [16], appelée aussi « countercurrent distribution », ou chromatographie en phase liquide, fait également appel aux différences entre les coefficients de partage des diverses substances relativement à deux solvants non miscibles.

Le matériel utilisé diffère de celui que l'on emploie habituellement dans les laboratoires de chromatographie ; en effet, l'appareil est constitué d'une série de tubes fermés à une extrémité, superposés de façon à avoir les ouvertures face à face et dont les séparations coïncident avec la séparation des deux couches de solvants quand ceux-ci remplissent les tubes. (Figure 2).

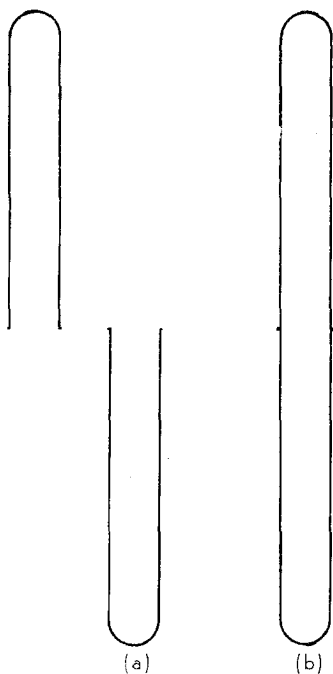


FIGURE 2
 (a) Tubes vides et séparés
 (b) Tubes pleins et superposés

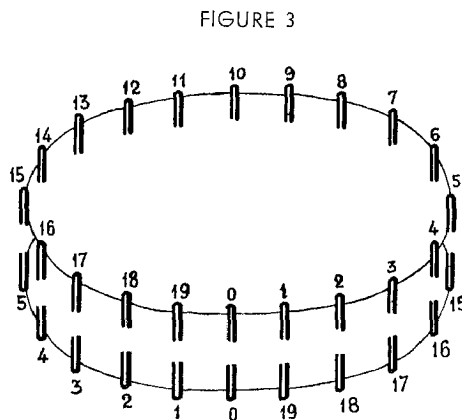


FIGURE 3

Avec deux jeux de vingt tubes, les tubes inférieurs et supérieurs étant numérotés de 0 à 19 en sens inverse et superposés comme l'indique la figure 3, on réalise le contre courant de la manière suivante :

On introduit la matière à analyser dans les tubes numéros 0 et on agite. Après repos, on fait une rotation de façon à avoir la superposition suivante des tubes contenant de la substance :

19.... 0
0....19

L'opération est ensuite renouvelée de façon à obtenir les combinaisons suivantes :

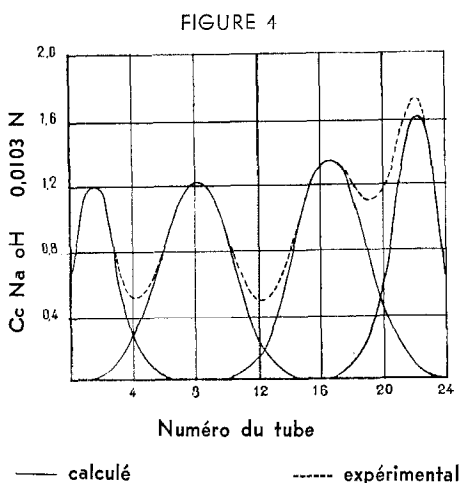
18....19.... 0
0....19....18

puis :

17....18....19.... 0
0....19....18....17

et ainsi de suite de façon à utiliser tous les tubes.

| | | | | | | | | | |
|---|----|----|----|----|-------|----|----|----|---|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | 17 | 18 | 19 | 0 |
| 0 | 19 | 18 | 17 | 16 | | 4 | 3 | 2 | 1 |



Le calcul de la répartition théorique et le dosage expérimental des quantités d'acides en fonction du numéro du tube sont représentés dans le graphique suivant (Figure 4) où l'on a pris pour exemple la distribution de quatre acides gras (acétique, propionique, butyrique, valériannique) entre l'éther isopropylique et un tampon phosphaté après 25 transferts [17] [18]. La précision du dosage est dans ce cas de 2 à 3%. Mais c'est une méthode délicate, longue, nécessitant un important appareillage et que par conséquent nous n'avons pas employée.

— Il y a lieu de mentionner aussi comme méthode assez précise mais peu accessible : la chromatographie de partage dont la phase mobile est gazeuse et la phase fixe liquide imprégnant un support inerte. [19] [20] [21] [22]

Avec cette assez récente forme de chromatographie, il est possible de séparer les différents acides gras volatils jusqu'en leurs isomères et d'en donner le dosage.

Cette technique qui est supérieure à toutes les autres ne peut actuellement être très diffusée car elle nécessite un appareillage très coûteux et un personnel qualifié. Des simplifications permettront peut-être dans l'avenir de généraliser son emploi.

— La chromatographie classique de partage sur colonne d'emploi plus commo-

de s'adresse pour le cas des acides gras au gel de silice ou à la Célite comme support de la phase aqueuse et à divers solvants et éluants, à savoir :

Chloroforme - Butanol [23]
Benzène - Butanol [24]
Tétrachlorure de carbone - Butanol [25]

L'analyse qualitative se fait par la mesure du R_f des acides dont le cheminement et la position sont repérés grâce à la présence d'un indicateur de pH au sein de la colonne.

Le R_f qui est caractéristique d'un acide dans des conditions d'expérience données, s'exprime par le rapport de la vitesse d'entraînement de la zone acide à la vitesse de progression du front liquide (ou du solvant), ou pratiquement le rapport des deux cheminements à un instant donné.

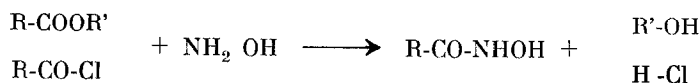
L'analyse quantitative se fait alors par titration de l'éluat au moyen de KOH 0,005 N par exemple [26].

Pour des raisons de simplicité de manipulation de matériel et de rendement (possibilité de remplacer facilement 40 colonnes effectuant 40 séparations simultanées par une seule cuve de dimensions moyennes et 4 feuilles de papier), nous avons préféré la chromatographie de partage sur papier. Mais n'oublions pas que, par contre, la chromatographie sur colonne s'avère apte à séparer les isomères des acides volatils, ce qui est assez difficile avec la technique sur papier [27].

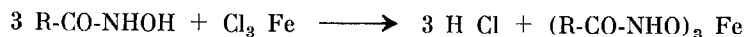
— La séparation par chromatographie sur papier se fait suivant de nombreuses techniques résumées par Asselineau [28] et par E. et M. Lederer [29].

Toutes ces techniques sont dominées par le fait que les acides étant volatils on doit s'adresser à des dérivés ou des sels qui présentent une certaine stabilité.

— Parmi les dérivés citons les hydrazides R- CO- NH- NH₂ dont les méthodes de préparation et de séparation sont données par Satake et Seki [30] et les acides hydroxamiques R- CO- NHOH d'où dérivent les hydroxamates et qui résultent de l'action d'un chlorure d'acide ou d'un ester sur l'hydroxylamine [31]



La séparation se faisant avec divers solvants, en particulier l'alcool amylique [32] [33] et la révélation par une pulvérisation d'une solution de chlorure ferrique engendrant un complexe d'intense couleur rouge :



La détermination quantitative se fait alors en introduisant la tache dans un tube avec une certaine quantité d'eau, de chlorure ferrique, etc., puis par mesure de la densité optique, ou bien par mesure directe sur le papier du maximum de densité de la couleur [34]. Mais ces méthodes ne sont pas assez commodes pour nous qui travaillons sur des acides gras en solution aqueuse puisque ceux-ci sont recueillis par distillation à la vapeur d'eau. Dans ces conditions l'emploi de cette méthode nécessiterait par exemple la formation des sels de sodium par neutralisation de la solution, puis l'évaporation à sec et ensuite l'estérification. De plus cette estérification n'est pas toujours quantitative et peut entraîner des erreurs dans le dosage.

— Parmi les sels de ces acides, qui font l'objet d'une séparation sur papier, citons les quatre principaux : sodium, ammonium, morpholine, éthylamine.

Les sels de sodium séparés par Brown [35] ne sont pas très employés car les premiers termes de la série en C_1 , C_2 et C_3 migrent difficilement et les taches obtenues avec tous les acides ne sont pas aussi nettes que celles obtenues avec les autres sels.

Les sels d'ammonium ont été séparés par plusieurs auteurs : Kennedy et Barker [36], Isherwood [37] et Lederer [38], à l'aide de divers solvants :

100 cm³ éthanol à 95 %, 1 cm³ NH₄ OH concentré
7 volumes n-propanol, 3 volumes NH₄ OH concentré
et butanol saturé avec NH₄ OH 1,5 N

Nous avons essayé la séparation des sels d'ammonium avec ce dernier solvant, mais comme la stabilité n'est pas aussi bonne qu'avec les sels d'éthylamine ou de morpholine, nous avons préféré ces derniers.

Les sels de morpholine ont été employés par J. Guillaume et R. Osteux [39] avec divers solvants tel que butanol-cyclohexane-propylène-glycol-ammoniaque-morpholine-eau 30/30/10/0,7/0,07/3,5 dans le but de séparer divers acides isomères et l'acide formique de l'acide acétique dont les R_f sont sensiblement égaux dans ces dernières méthodes.

Enfin, les sels d'éthylamine ont été utilisés par Hiscox et Berridge dont le travail est cité, avec plus de détails, dans la deuxième partie de notre thèse ; ce sont ces sels que nous avons finalement avec ceux de morpholine, employés le plus généralement.

En ce qui concerne l'analyse quantitative dans cette chromatographie sur papier, on emploie la méthode générale de mesure de la surface des taches dont les variations sont d'après les études de Fisher, Parsons et Morrison [40] [41], proportionnelles au logarithme de la quantité de substance se trouvant dans ces taches.

Mais cette méthode simple présente quelques inconvénients : après révélation des taches par pulvérisation ou par immersion dans une solution d'indicateur de pH, on obtient des taches dont le contour n'est pas toujours très net et par suite des mesures de surface où le facteur personnel entre en jeu. De plus, cette surface est susceptible de varier avec la quantité d'indicateur, surtout si celui-ci a été additionné d'acide comme cela se fait souvent. Ensuite il faut considérer que les dimensions de la tache varient avec la longueur du développement du chromatogramme [42] [43], le rayon du spot de départ et le type de papier employé. Ce papier doit, en outre, être très uniforme tel que le papier Whatman n° 1 « pour chromatographie » qui a été jugé convenable pour ces estimations d'acides gras volatils [38].

Ces conditions obligent donc à faire des comparaisons de surfaces en faisant courir sur la même feuille de papier une gamme de taches étalon et les taches à évaluer.

Il est alors possible d'après Reid et Lederer [38], d'arriver à une précision de l'ordre de 2-4,5 % en employant le pourpre de bromocrésol comme indicateur et une légère exposition aux vapeurs d'ammoniaque.

Cependant, dans cette méthode, il n'est pas tenu compte des pertes plus ou moins notables que peut provoquer la dissociation des sels lors du séchage.

En effet, ces sels d'acides et de bases faibles sont susceptibles de se dissocier en leurs composants : ces composants étant volatils se dispersent alors dans l'atmosphère.

Etant donné la délicatesse de la méthode, nous avons préféré une méthode conductimétrique qui est susceptible de bien contrôler les pertes et les différentes phases de l'analyse chromatographique.

On voit donc que les méthodes d'étude de mélanges d'acides gras volatils que nous venons de passer en revue sont assez nombreuses, que les plus satisfaisantes sont offertes par la chromatographie et que la recherche de la simplicité nous a conduit parmi ces dernières à l'étude des sels d'éthylamine.

En résumé, dans notre travail nous sommes partis de la méthode enseignée dans les laboratoires de M. E. Lederer et nous avons conçu et mis au point une technique simple d'obtention de chromatogrammes permanents et de dosage par conductimétrie différentielle, qui peut être non seulement appliquée à l'analyse des acides gras volatils de fermentation mais encore généralisée à l'occasion d'autres travaux de chromatographie.

Cette méthode a été ensuite appliquée, au laboratoire de M. Ducellier, de l'Institut Agricole d'Algérie, à l'étude de la production des acides gras volatils dans diverses fermentations de matières végétales.