VII. SUR LA FORMATION DES ÉTHERS PHOSPHORÉS PENDANT LA FERMENTATION ALCOOLIQUE.

(Communication préliminaire.)

PAR ALEXANDRE LEBEDEV.

Lab. de technol. chim. agric. de l'Inst. Polytechn. de Done.

(Received January 23rd, 1918.)

IL y a quelques années j'ai démontré [1909, 1910, 1911] que pendant la fermentation du sucre l'éther phosphoré d'un hexose se formait. Dans le schéma que j'ai donné j'ai admis que préalablement il se formait un triose-phosphate. Cette supposition a été appuyée par le fait que la dioxyacétone donnait en fermentant un hexose-phosphate identique, évidemment par la condensation de l'éther phosphoré du triose [Lebedev, 1911, 2, 3; 1914; Lebedev et Griaznov, 1912]. En vue de l'importance de cette question, j'ai repris depuis une année une étude minutieuse pour voir si ce point de vue était juste. En modifiant la méthode dont je me suis servi auparavant pour l'isolement de l'éther et ayant pris une autre levure, j'ai pu, après un long et assidu travail, enfin constater d'une manière irréfutable la formation d'un éther ou plutôt d'un mélange des éthers phosphorés qui m'a donné les *p*-bromphénylhydrazone, *p*-bromphénylosazone et phénylosazone ayant un autre point de fusion et une autre composition que les combinaisons correspondantes, données par l'hexose-biphosphate. Les circonstances qui ne dépendent pas de moi m'ont obligé malheureusement d'interrompre pour une demi année l'étude commencée avec tant de succès; c'est pourquoi je me suis résolu de publier le résultat obtenu sans attendre l'accomplissement du travail en train ayant le but de jeter une lumière sur la décomposition primaire du hexose.

Méthode. 50 gr. de levure de Lebedev + 100 gr. de saccharose + 35 gr. de Na_2HPO_4 + 17 gr. de NaH_2PO_4 + 500 gr. d'eau + 1 cc. de toluène. Pour interrompre la fermentation, on ajoutait au moment voulu 2 ltr. d'alcool à 97°. On essorait le résidu à la trompe, on le lavait par de l'alcool dilué (4 : 1) et on le traitait par l'eau à plusieurs reprises; le filtrat (300 cc.) a été précipité par de l'alcool (1200 cc.). Après avoir laissé reposer le tout pendant 12 heures,

on a transvasé l'alcool qui a été au dessus du résidu, on a redissous celui-ci dans l'eau et précipité par 3 volumes d'alcool. (La dernière fois on a précipité par 2 vol. d'alcool.) Par ce procédé on obtient 2 couches de liquide: la supérieure blanchâtre, opaque et très visqueuse, l'inférieure jaunâtre, presque transparente et moins visqueuse. Il était évident qu'il y avait au moins 2 substances différentes. Les deux couches ont été séparées à l'aide d'un entonnoir à robinet et chacune d'elles a été précipitée par l'acétate de plomb. Le résidu a été lavé avec une solution faible d'acétate de plomb et essoré à la trompe. La résidu a été délayé dans l'eau et traité par H_2S . Le filtrat a été traité avec de la phénylhydrazine à 100° ou avec une solution alcoolique de *p*-bromphénylhydrazine à 35° . On séchait les précipités après recristallisation dans l'appareil d'Abderhalden, modifié par moi [1911, 1, p. 257] à 37° et on les analysait. On a dosé le P par l'excellente méthode de Neumann.

Dans quelques expériences, avant de traiter avec de l'acétate de plomb, j'enlevais l'acide phosphorique au moyen du mélange magnésien. Sans décrire ici en détails toutes les expériences nombreuses que j'ai faites dans des conditions différentes, je n'en ferai connaître que quelques-unes, pour les autres je donnerai plus bas l'aperçu général des dosages des P et N des osazones recristallisées, obtenues ordinairement par l'action de la phénylhydrazine sur le mélange des deux couches. Il faut les envisager pour le moment comme des expériences d'orientation.

1. La fermentation allait 2 h. à 35° . L'osazone obtenue de la couche supérieure, recristallisée une fois de l'alcool à 85° . P—2.96 %. De grands faisceaux de très longues aiguilles d'une couleur orange. Le point de fusion 142° . L'osazone de la couche inférieure avait le point de fusion $142-144^\circ$. P—4.42 %.

2. La durée de la fermentation 4 h. à 25° . L'osazone de la couche supérieure. P—3.96 %. N—20.54 %. L'osazone de la couche inférieure. P—4.21 %.

3. L'osazone de la couche supérieure 6 fois recristallisée. P—1.89 %. Lamelles jaunes. F. $141-142^\circ$. Il est à remarquer qu'après le traitement de la solution des éthers phosphorés avec de la phénylhydrazine à 100° on obtient souvent de très longues et larges lamelles jaunes qui après la recristallisation se transforment en aiguilles de couleur jaune ou orange. Il arrive cependant que la forme des lamelles persiste malgré plusieurs recristallisations, néanmoins le point de fusion ne change pas d'une manière sensible, en balançant dans des limites assez étroites autour de 142° , et la couleur reste toujours jaune foncée.

4. Supposant que les éthers phosphorés donnent des sels d'une différente solubilité, j'ai appliqué la précipitation fractionnée par l'acétate de plomb. Pour la première fraction j'ai pris à peu près une moitié de la quantité qui était nécessaire pour faire la précipitation complète des éthers. Le dépôt a été essoré et le filtrat traité de nouveau par l'acétate de plomb. Ainsi a-t-on obtenu une fraction qui traitée par de la phénylhydrazine a donné l'osazone de la composition suivante: N—15·96 et 16·28 (deux dosages); P—4·47; C—54·70 et H—5·63.

Il est curieux de noter ici que ces nombres, à l'exception de celui de C (l'osazone est très difficile à brûler), correspondent presque exactement à la formule:

c'est à dire à l'osazone de l'éther phosphoré composé qui contient pour au moins¹ une molécule de H_3PO_4 une molécule de hexose et une molécule de triose.

	P	N	C	H
Calc. pour l'osaz. du hexose-triose-phosph.	4·51	16·28	57·56	5·38
Trouv. „ „ „ „	4·47	16·12	54·70	5·63
Calc. „ „ hexose-biphosphate	5·68	15·38	52·75	5·68.

Je ne regarde point cette supposition comme démontrée, mais je ne doute pas que les recherches ultérieures fourniront un très important résultat.

Je donne ici 2 séries de nombres pour P et N des osazones obtenues dans les expériences, dont la température variait de 25 à 35° et la durée de 2 à 5½ h. Après la fermentation pendant 9½ h. on n'a pu obtenir *aucune* osazone. C'est la meilleure preuve que le mélange d'éthers se forme au début de la fermentation et qu'il est fermentescible; d'ailleurs on peut facilement le démontrer par l'expérience directe. Le maximum de la quantité d'éthers se forme à 35° après 2 h. et à 25° après 4–5 h., si l'on a, bien entendu, une levure très active.

Voici un exemple du rapport de la couche supérieure à la couche inférieure du liquide sirupeux. A 35° après 2 h. la couche supérieure contenait 15 cc., la couche inférieure—30 cc. Après 4 h. la couche supérieure—20 cc.; la couche inférieure—25 cc. La couche supérieure est plus soluble dans l'eau que la couche inférieure, de sorte que la quantité de celle-là dépend aussi de la quantité d'alcool employé pour la précipitation. D'autre part ces 2 couches

¹ Sous l'action de la phénylhydrazine une partie de H_3PO_4 pourrait se séparer de l'éther phosphoré.

se dissolvent en partie l'une dans l'autre, ce qui empêche extrêmement la séparation par des méthodes purement physiques.

Dans de différentes expériences on a obtenu pour P et N des chiffres que l'on peut diviser en deux groupes.

1. 4.55, 4.37, 4.32, 4.29, 4.82, 4.85, 4.42, 4.21. Moyen: 4.48 % de P.
2. 5.48, 5.39, 5.84, 5.72, 6.01. Moyen: 5.69 % de P.
1. 21.20, 21.14, 19.12, 21.10, 20.54, 18.46. Moyen: 20.26 % de N.
2. 15.96, 16.65, 16.28, 16.82. Moyen: 16.43 % de N.

Le point de fusion variait entre 137° et 150° (toutes les osazones ont été recristallisées au moins une fois). Pour les osazones non recristallisées le point de fusion le plus bas a été 136°. Je rappellerai encore une fois que l'osazone du hexose-biphosphate a le point de fusion 150–152° et contient 5.68 % de P et 15.38 % de N. L'attention est frappée involontairement par le fait qu'on a obtenu dans quelques expériences des osazones qui contenaient 21.20 et 21.14 (deux dosages de la même substance) et 21.10 % de N. Ces nombres ne diffèrent que très peu de celui pour N de la triosazone, à savoir 20.9 %. Néanmoins, l'osazone qui a donné 21.20 et 21.14 de N contenait 5.84 % de P et avait le point de fusion 138–139° (recristallisée 5 fois); celle qui a donné 21.10 % de N contenait 5.31 % de P et avait comme point de fusion 141–142°. De sorte que si l'on se contente, comme on le fait souvent en analysant des osazones, de ne doser que l'azote, sans faire en outre attention au point de fusion, on peut croire qu'on aie à faire avec une triosazone.

Il est à remarquer que c'était justement moi [Lebedev, 1909, p. 123; 1910, p. 223; 1911, 1, p. 256] qui ai obtenu pour la première fois les hydrazones et osazones contenant du phosphore; avant cette découverte on pouvait bien facilement commettre une grave erreur.

Les chiffres pour P, 3.96, 2.96 et 1.89 %, disent en faveur de la supposition que le mélange d'osazones contienne une petite quantité d'osazone qui, ne contenant pas de P et étant moins soluble, s'accumule peu à peu à chaque recristallisation; cependant il est peu probable que ce soit l'osazone du triose, premièrement, à cause de sa grande solubilité dans l'alcool, deuxièmement, par le fait que les chiffres pour N, au lieu de devenir plus grandes, deviennent, au contraire, plus petites. On peut admettre que pendant l'action de la phénylhydrazine en solution acide à 100° une très faible partie du mélange des éthers se décompose en mettant en liberté le sucre qui donne ensuite l'osazone correspondante ou que l'acide phosphorique se sépare partialement du phosphate de l'osazone. J'observais depuis longtemps une chose pareille sous l'action de l'alcali faible sur l'osazone-phosphate; l'osazone qui s'en

séparait avait le point de fusion 215° [Lebedev, 1910, pp. 218-9]. J'ai l'intention de faire plus tard des expériences analogues sur ce sujet.

Quoi qu'il en soit je n'ai jamais obtenu une osazone qui n'aurait pas contenu du phosphore; c'est pourquoi il ne peut y avoir aucune doute qu'Ivanov a fait une erreur [Ivanov, 1907] dans cette question, ce qu'il a d'ailleurs reconnu lui-même [Ivanov, 1915].

Il suit alors de tous les faits rapportés plus haut qu'en disposant les expériences d'une manière convenable on peut isoler un mélange d'éthers phosphorés dont les constituants varient probablement non seulement au point de vue quantitatif, mais aussi qualitatif, selon les conditions, comme, par exemple, la température, la durée de la fermentation, la quantité de sucre ou de phosphate, la réaction du milieu, etc.

Ivanov précipitait l'éther phosphoré après 24 h. par l'acétate de cuivre, mais après un laps de temps si long il pourrait arriver que l'éther avait été fermenté presque entièrement ou même totalement, de sorte qu'il n'y en restait que très peu ou même pas du tout dans le précipité. Ainsi dit-il que l'osazone obtenue après la fermentation du glucose avait au début un point de fusion 142° , mais après quelques recristallisations 127° seulement. Ce fait montre clairement qu'il y avait un mélange qui consistait probablement d'une très petite quantité d'osazone de hexose-biphosphate et d'une très grande quantité d'acétylphénylhydrazine qui se forme, comme on le sait, facilement sous l'action de la phénylhydrazine sur l'acide acétique. Les cristaux ne se purifient que difficilement et ont ordinairement une couleur un peu jaunâtre. Il est évident qu'Ivanov, faisant le dosage de N dans cette substance, a commis une erreur ayant obtenu 20.9 % au lieu de 18.7 %. Une telle erreur est possible si l'on n'est pas suffisamment habitué au dosage de N ou si la substance analysée n'était pas bien purifiée. Le mélange pourrait contenir, outre de l'hexose-phosphate, encore de l'hexose-triose-phosphate et triose-phosphate, sans parler d'autres éthers d'une pareille composition. Cette admission n'a aucun rapport au travail cité d'Ivanov, mais, comme j'ai déjà dit plus haut, a pour point de départ le fait, établi pour la première fois par moi, que la dioxyacétone se transforme pendant la fermentation en hexose-phosphate.

Aussi ai-je commencé des expériences dans lesquelles je me suis servi de la *p*-bromphénylhydrazine; bien que je n'aie fait que 2 expériences, il y a tout lieu à croire que la continuation de celles-ci aura une grande importance pour l'établissement de la formule des éthers, puisque on obtient les hydrazones en forme bien cristalline. La *p*-bromphénylhydrazone se forme en solution

alcoolique après quelques minutes déjà; elle est de la couleur blanche de neige (F. 112–114°), mais après quelque temps, surtout sous l'action de la lumière, elle devient peu à peu jaunâtre, en se transformant évidemment en *p*-bromphénylosazone, ayant le point de fusion 141–142° (jaunes lamelles). Celle-ci, recristallisée une fois, donne de très minces et très longues aiguilles jaunes, entrelacées, qui au microscope ont un aspect de la ouate de verre. F. 143–145°. Je rappelle que les *p*-bromphénylhydrazone et *p*-bromphénylosazone, également obtenues pour la première fois par moi [Lebedev, 1909, 1910, 1911, 1], ont comme point de fusion 128° resp. 165° (non recristallisées). La hydrazone, étant presque insoluble dans l'eau, se dissout facilement dans $N/2$ NaOH avec une jolie couleur rosée. P—6.87 et 6.76 %; calculé pour *p*-bromphénylhydrazone du hexose-biphosphate—7.02 %.

Je n'ai pas encore analysé la *p*-bromphénylosazone. J'ai fait quelques analyses des sels amorphes de Ba, obtenus d'après 2 méthodes.

1. La solution du sel de Ba a été précipité par l'alcool à 97° en proportion 1 : 1; le précipité a été lavé par un mélange d'alcool et d'eau (1 : 1), dissous dans l'eau et précipité de nouveau par un volume égal d'alcool. Ba—41.55 %; P—8.30 %.

2. Le sel de Ba a été précipité par ébullition, filtré, lavé par l'eau bouillante, redissous et précipité de nouveau par ébullition. On a obtenu 40.87 % de Ba. Ba et P, calculés pour hexose-biphosphate, 44.92 % resp. 10.16 %.

Bien que les analyses de toutes les substances décrites plus haut ne soient pas encore complètes, on voit clairement qu'on a à faire avec un mélange au moins de deux éthers phosphorés. Par ce fait le cas devient difficile à résoudre, mais je ne doute pas que j'y réussirai tout de même, étant donné que toutes les substances, à l'exception des sels, sont cristallines et qu'on peut en avoir tant que l'on veut.

La réponse à la question de la décomposition du sucre dépend de la résolution du problème que je me suis posé, indépendamment des travaux de qui que ce soit, depuis si longtemps.

Je me réserve donc de continuer les recherches dans la direction indiquée dans ce mémoire.

REFERENCES.

- Ivanov (1907), *Zeitsch. physiol. Chem.*, **50**, 281.
 — (1915), *J. Microbiol.* (Pétrograd), **2**, 403.
 Lebedev (1909), *Biochem. Zeitsch.*, **20**, 114.
 — (1910), *Biochem. Zeitsch.*, **23**, 213.
 — (1911, 1), *Biochem. Zeitsch.*, **26**, 248.
 — (1911, 2), *Compt. Rend.*, **153**, 136.
 — (1911, 3), *Ber.*, **44**, 2932.
 — (1914), *Ber.*, **47**, 660.
 Lebedev and Griaznov (1912), *Ber.*, **45**, 3256.