

FERMENTATION ALCOOLIQUE : OBSERVATIONS CINETIQUES

P. STREHAIANO **, M. MORENO * et G. GOMA *

* Institut National des Sciences Appliquées
Laboratoire de Génie Biochimique
Avenue de Rangueil - 31077 Toulouse Cédex

** Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse
145, avenue de Muret - 31076 Toulouse Cédex

INTRODUCTION

La connaissance du vin, tant sur les plans de l'élaboration que des traitements et analyses, a fait, en peu de temps, de remarquables progrès.

Nous citerons, par exemple, l'ensemble des travaux de Ribéreau-Gayon, Bremond, Jaulmes...

Cependant, l'étape « fermentation » reste certainement peu connue fondamentalement.

Bien sûr, sur le plan pratique, depuis les travaux de Pasteur, l'influence de facteurs tels que l'aération, la température, etc... est reconnue et précisée (LAFON, 1955 ; CASTELLI, 1941) et le praticien les maîtrise de mieux en mieux (levures sèches et sélectionnées, aération, chauffage et refroidissement...).

Toutefois, on ne peut dire que les mécanismes de la fermentation alcoolique soient tous parfaitement connus (rôle du sucre, de l'alcool, de l'oxygène...) ni que leur contrôle ne soit encore entaché d'empirisme, l'absence de données quantitatives en étant souvent à l'origine.

Les travaux s'appuyant sur une analyse cinétique des paramètres de la fermentation sont un apport nouveau au niveau des connaissances fondamentales de la biologie des microorganismes et doivent conduire à une meilleure maîtrise de la fermentation, en particulier dans le domaine récemment développé de la vinification continue (BARRE et COMBE, 1975). Le but de cet exposé est, en s'appuyant sur les analyses

- du comportement des levures au cours de la fermentation,
- des liaisons entre la production d'alcool et la croissance,
- de l'évolution des rendements,

de mettre en évidence quelques caractéristiques et facteurs limitants de la fermentation alcoolique, telle qu'elle est mise en œuvre en Œnologie. Certaines différences de comportement par rapport aux fermentations classiques seront discutées.

Rappels sur les dynamiques de populations

L'analyse des courbes de croissance de populations microbiennes met en évidence l'existence de plusieurs phases (MONOD, 1942) :

- phase de latence,
- » de croissance exponentielle,
- » de décélération de la croissance,
- » stationnaire,
- » de déclin.

Ces différents stades dans la croissance, discutés par ailleurs (MONOD, 1942 ; RIBÉREAU-GAYON et *al.*, 1975 ; RIVIÈRE, 1975 ; AIBA et *al.*, 1973) sont caractéristiques de croissances dont les processus limitants ne sont liés qu'aux concentrations en substrat.

Mais une telle analyse reste-t-elle valable dans le cas de croissances accompagnées de production de métabolites comme la fermentation alcoolique ? La réponse à cette question ne peut être approchée que par l'étude des variables de la croissance :

- . variables de concentration : les concentrations en sucre (S), alcool (P), en biomasse (X) exprimées en $g \cdot l^{-1}$, sont représentatives à l'instant t , de l'état du système.
- . variables de vitesse : par définition, la vitesse r d'un processus discontinu est la dérivée par rapport au temps de la courbe d'évolution de la concentration. On définira respectivement les vitesses de production de biomasse r_x , d'éthanol r_p , de consommation de substrat r_s . Les vitesses sont exprimées en $g \cdot l^{-1} \cdot h^{-1}$ et sont très souvent identifiées aux productivités instantanées de réacteurs et des activités biologiques.
- . variables de vitesses spécifiques : ce sont les vitesses rapportées à la quantité donnée de microorganismes, le plus souvent l'unité de biomasse sèche (g). On définit ainsi le taux de croissance $\mu = \frac{r_x}{X}$, la vitesse spécifique de production d'alcool $\nu_p = \frac{r_p}{X}$, de consommation de substrat $\nu_s = \frac{r_s}{X}$. Dans tous les cas, μ , ν_p , ν_s sont exprimés en h^{-1} .

- paramètres de rendement : les rendements peuvent être exprimés par rapport à la production d'éthanol R_p , ou de levures R_X . On les définit ainsi :

$$R_X = \frac{r_x}{r_s}, \quad R_p = \frac{r_p}{r_s}$$

ou, en culture discontinue

$$R_X = \frac{X_f - X_o}{S_o - S_f}, \quad R_p = \frac{P_f}{S_o - S_f}$$

Notons que ces rendements ne sont que des rendements apparents puisqu'ils n'intègrent pas les pertes éventuelles, dues par exemple à l'évaporation pour l'alcool.

- paramètres cinétiques : les paramètres cinétiques sont les constantes utilisées pour décrire par des lois mathématiques les comportements cinétiques de production de microorganismes et de métabolites.

De l'étude de ces variables et paramètres ont été déduites diverses lois de croissance et de production, lois que nous allons rappeler en nous limitant à celles nécessaires à la compréhension de cet exposé. Pour des raisons évidentes, l'essentiel des travaux de modélisation a porté sur les productions de biomasse et d'éthanol, variables directrices de la fermentation et facilement accessibles.

En règle générale, le taux de croissance μ est fonction des paramètres d'état : X, S, P, et des variables de commande : pH, température, ... ; pour une commande donnée, μ est fonction de X, S, P.

On doit à MONOD (1942) l'expression la plus simple caractérisant la croissance microbienne. Le modèle, inspiré de la cinétique Michaelienne, postule que le taux de croissance ne dépend que de la concentration en substrat limitant S ; la densité en microorganismes et la teneur en métabolites n'intervenant pas.

Cette loi de MONOD s'écrit :

$$\mu = \mu_m \frac{S}{K_s + S}$$

μ étant le taux de croissance maximal obtenu au cours de la phase exponentielle de croissance et K_s la constante de saturation caractéristique.

Il est apparu rapidement que ce modèle était insuffisant pour représenter les cinétiques de croissance en fermentation alcoolique.

Notamment, il a été observé que le substrat et le produit (respectivement glucose et éthanol) ont une fonction inhibitrice et de répression importante sur la croissance.

Divers modèles ont été proposés pour rendre compte de ces phénomènes parmi lesquels ceux de AIBA et *al.*, (1968).

$$\mu = \mu_0 e^{-k_{1p}} \frac{S}{K_s + S}$$

puis de YAROVENKO et *al.* (1973)

$$\mu = \mu_m \frac{K_p}{K_p + p}$$

Il faut cependant remarquer qu'actuellement aucun modèle simple et directement utilisable n'intègre ces phénomènes de limitation et d'inhibition par le sucre et de répression par l'alcool.

Pour le praticien, le but de la fermentation est de transformer le sucre en alcool et métabolites secondaires ; il est donc souhaitable de connaître les relations éventuelles entre les paramètres de la croissance des levures et ceux de la production d'alcool. Pour AIYAR et LUEDEKING (1966) la vitesse de production d'alcool est fonction de la population existante (X) et de sa vitesse d'accroissement r_x :

$$r_p = \alpha r_x + \beta X$$

D'ores et déjà, il est à mentionner que cette relation n'est pas totalement vérifiée en fermentation alcoolique discontinue.

Dans notre travail, par le choix des conditions opératoires et des paramètres étudiés nous avons voulu aborder l'étude cinétique de la fermentation alcoolique sous un angle plus pratique en particulier en nous intéressant aux problèmes de rendements et productivités.

MATERIELS ET METHODES

Appareillage

Les fermentations sont réalisées en discontinu dans des cuves de 30 litres ; la température est réglée à 30 °C et l'agitation maintenue à 150 tours par minute.

Les conditions d'anaérobiose, considérée atteinte lorsque la sonde d'oxygène dissous dans le milieu indique la valeur zéro, sont obtenues par un balayage d'azote type U.

L'ensemble de l'appareillage est stérilisé avant chaque expérimentation par la vapeur à 120 °C.

Milieu

Le milieu synthétique utilisé ne diffère de celui de NAGATANI et *al.* (1968) que par la concentration en extrait de levure abaissée à 1 g.l⁻¹. Sa composition est la suivante :

KH ₂ PO ₄	5 g.l ⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g.l ⁻¹
Mg SO ₄ , 7H ₂ O	0,4 g.l ⁻¹
extrait de levure	1 g.l ⁻¹

Le substrat carboné est le glucose en concentrations variables de 20 à 250 g.l⁻¹.

Le pH, ajusté à 3,75, n'est pas réglé.

Ce milieu est stérilisé par la vapeur, dans le fermenteur.

Souche

La souche de levure utilisée est une *Saccharomyces cerevisiae*, clone UG 5 (STREHAIANO, 1973).

Techniques analytiques

La population levurienne est évaluée par sa biomasse (X) exprimée en g.l⁻¹ et déterminée par gravimétrie après filtration sur membrane de 0,45 µ. de porosité et séchage sous vide à 60 °C.

La teneur en glucose (S) exprimée en g.l⁻¹ est mesurée par dosage colorimétrique au dinitrosalicylate de sodium.

L'éthanol produit (P) exprimé pour des raisons d'homogénéité en g.l⁻¹ est dosé par chromatographie en phase gazeuse [colonne de chromosorb W 80-100 mesh imprégné de carbowax 20 M].

Observations expérimentales

Dans la figure 1 sont portées les courbes de production de biomasse et d'éthanol et de consommation de substrat pour une concentration initiale en sucre de 100 g.l⁻¹.

Pour les autres valeurs de S₀ étudiées, ces courbes ont des allures comparables ; dans le tableau I sont rassemblées les valeurs observées des différents paramètres en fonction de S₀.

A partir de ce tableau, nous pouvons représenter l'évolution des rendement globaux sur le produit et la biomasse en fonction de S₀ (figure 2).

Ces premiers résultats concernent les paramètres statiques de la fermentation ; du point de vue cinétique, l'influence de S₀ sur l'évolution

du taux de croissance est matérialisée par les courbes de la figure 3. Nous utilisons en abscisse le temps réduit τ qui permet de comparer sur une même échelle des fermentations de durées différentes.

TABEAU I
Variations des variables de fermentation en fonction de la concentration initiale en glucose

S	t_f	X formé $X_f - X_0$	p produit $p_m - p_0$	S consommé $S - S_f$	R_X	R_p	p
19,0	19	1,26	8,5	19	0,072	0,45	0,45
50,5	40	1,90	21,6	50	0,038	0,43	0,54
99,9	110	1,28	45	99	0,0146	0,455	0,41
125,0	105	0,85	44,6	125	0,0068	0,357	0,42
260,0	330	1,45	59,2	225	0,0064	0,263	0,18

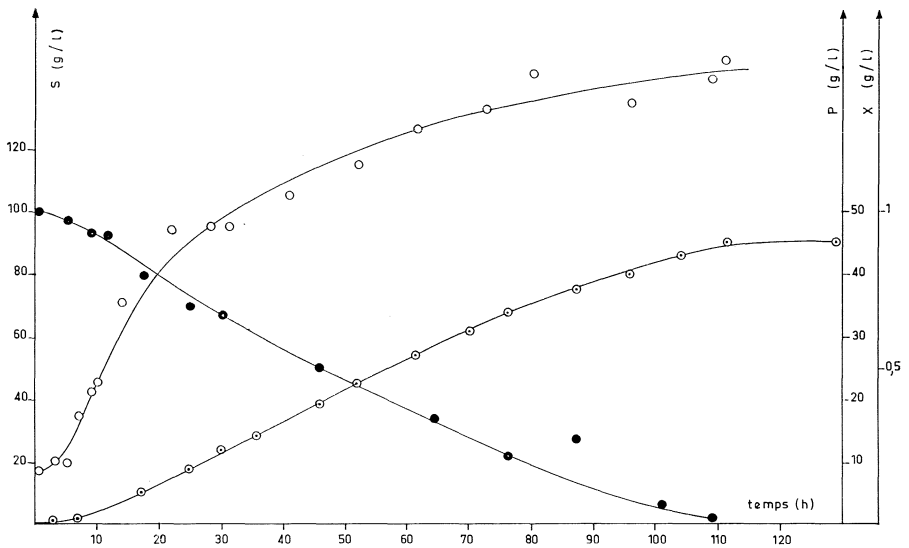


Fig. 1. — Evolutions de la biomasse (X : g. l⁻¹), de la concentration en éthanol (P : g. l⁻¹), et en substrat (S : g. l⁻¹) au cours du temps lors de la fermentation du glucose par *S. cerevisiae* UG 5.

Sur le plan de la production d'alcool (objectif principal de la fermentation), nos travaux ne permettent pas de dire que le modèle de AIYAR et LUEDEKING, précédemment cité, soit toujours vérifié, notamment au niveau des faibles taux de croissance.

De plus, l'analyse des variations de $\nu_p = f(\mu)$ en fonction des diverses valeurs de S_0 , ne montre pas de relation simple, vérifiée sur toute la durée de la fermentation.

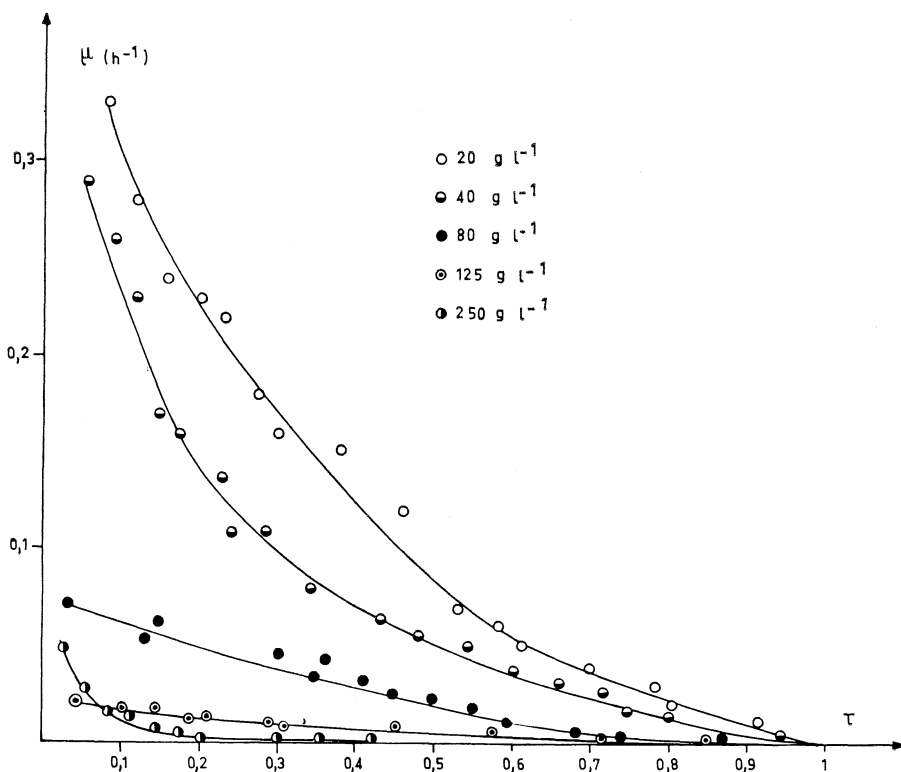


Fig. 2. — Influence de la concentration initiale en substrat sur l'évolution du taux de croissance de la levure en fonction du temps réduit ($\tau = \frac{t}{t_f}$)

DISCUSSION

Nous avons vu que l'analyse classique de la croissance fait état de quatre phases.

Dans les fermentations que nous avons décrites, si les phases de latence et d'induction sont observées, jamais, dans nos conditions d'anaérobiose, la phase exponentielle de croissance n'a pu être mise en évidence (figure 1). Cette phase de prolifération n'est jamais exponentielle, mais, au mieux, linéaire, et toujours en ralentissement : le taux de croissance atteint très rapidement son maximum pour décroître ensuite (figure 3).

La figure 3 représente l'effet inhibiteur important de S_0 sur le taux de croissance : le taux de croissance maximum μ_m passe de $0,4 \text{ h}^{-1}$ pour $S_0 = 20 \text{ g. l}^{-1}$ à $0,05 \text{ h}^{-1}$ pour $S_0 = 250 \text{ g. l}^{-1}$.

Il est d'ailleurs remarquable que, pour des concentrations en sucre initiales proches de celles du moût de raisin, l'essentiel de la fermentation s'effectue à un taux de croissance très faible, inférieur à $10^{-2} \mu_m$.

Sur la figure 4, est portée, pour les diverses valeurs de S_0 , la fraction de fermentation s'effectuant avec un taux de croissance supérieur à $10^{-2} \mu_m$, i.e. $\mu > 0,004 \text{ h}^{-1}$, qui correspond à un temps de génération de 172 heures.

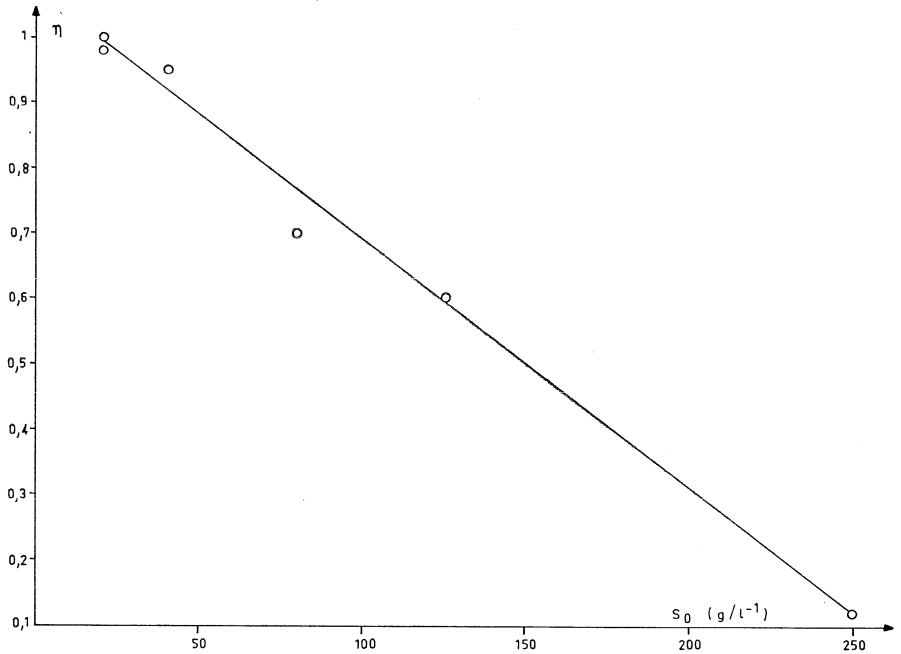


Fig. 3. — Influence de la concentration initiale sur la fraction de croissance s'effectuant à un taux supérieur au $\frac{1}{100}$ du taux maximum.

De plus, quelle que soit la valeur de S_0 , la biomasse formée dans nos conditions de fermentation, n'excède jamais $1,9 \text{ g.l}^{-1}$ (tableau I).

L'absence de phase exponentielle de croissance (impliquant le déroulement de la fermentation à un taux de croissance faible et toujours décroissant) ainsi que la limitation à 2 g.l^{-1} de la biomasse formée peuvent s'expliquer par un déficit en oxygène et par l'action inhibitrice de l'éthanol.

Le rôle de l'oxygène en tant que nutriment (par opposition à son rôle d'accepteur d'électrons) fait actuellement l'objet de nombreux travaux ; cette fonction de l'oxygène peut d'ailleurs être assurée par l'apport d'ergostérol (SCHATZMANN et FIECHTER, 1976).

Les productivités en éthanol obtenues sont de 0,4 — 0,5 g.l⁻¹.h⁻¹ (valeurs classiquement admises en fermentation discontinue) excepté pour les fortes valeurs de S₀ et, par exemple, pour S₀ = 250 g.l⁻¹ p n'est plus que de 0,18 g.l⁻¹.h⁻¹.

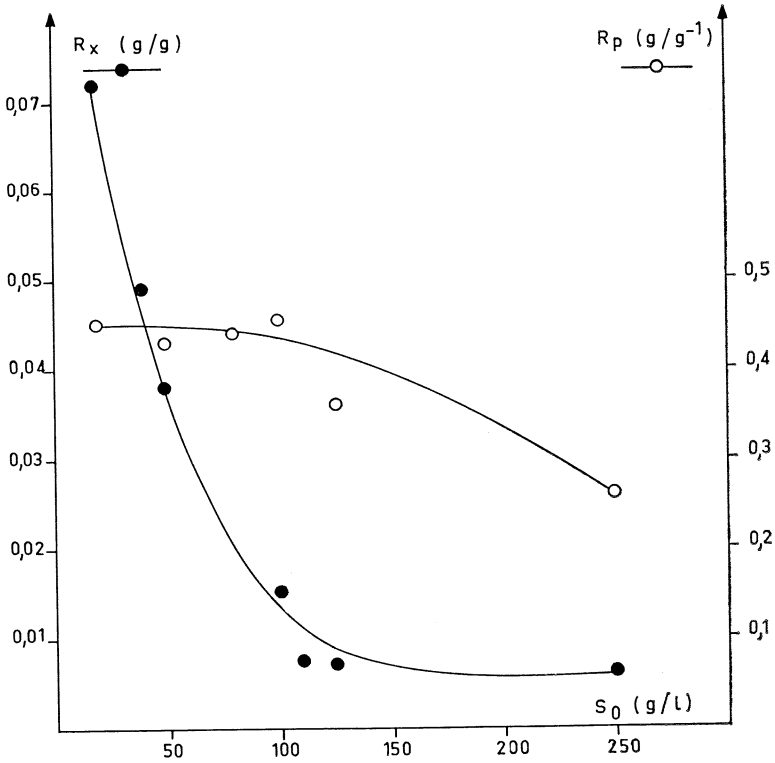


Fig. 4. — Influence de la concentration initiale en substrat (S₀ : g.l⁻¹) sur l'évolution du taux de conversion du glucose en biomasse R_x : g.g⁻¹) et du glucose en éthanol (R_p : g.g⁻¹)

Ces différentes observations sur les variations du taux de croissance et de la productivité en éthanol, liées aux courbes d'évolution des rendements en biomasse R_x et en produit R_p de la figure 2 ainsi que la figure 3 soulignent la double inhibition par le substrat initial et le produit ; elles expliquent également qu'une consommation partielle du glucose initial ne se traduise pas par un accroissement des paramètres de croissance.

Ceci met en évidence le rôle prépondérant de l'inhibition par le produit.

CONCLUSION

L'observation du comportement dynamique des levures en fermentation alcoolique, sous des conditions d'anaérobiose stricte (contrôlée par une sonde d'oxygène polarographique) fait apparaître que :

1/ — phénoménologiquement, la croissance n'est pas de même nature que celle observée en fermentations « classiques », puisque jamais n'apparaît de phase exponentielle de croissance.

2/ — Les phénomènes d'inhibition contrôlent dès le départ de la croissance la production de levures et d'éthanol. L'inhibition causée par le substrat (ici glucose) est irréversible : la diminution de concentration en glucose avec l'avancement de la réaction ne se traduit pas par une augmentation de la vitesse de croissance. L'inhibition par le substrat semble relayée par celle due à l'éthanol.

3/ — Il n'existe pas de couplages simples entre la croissance et la production d'éthanol.

La fermentation alcoolique, utilisée depuis des millénaires, n'a pas livré encore tous ses secrets : si certains de ses mécanismes biochimiques sont connus, l'analyse des comportements cinétiques pose à l'heure actuelle des problèmes quant :

— aux mécanismes réellement limitant la production,

— aux voies les plus rationnelles pour mettre en œuvre les fermentations alcooliques au sens de l'optimum des productivités et des rendements.

Nomenclature et abréviations

X	concentration en biomasse : g.l ⁻¹
X _o	» » au temps initial (inoculum)
X _f	» » final
X _m	» » maximale observée
S	concentration en sucre : g.l ⁻¹
S _o	» » au temps initial
S _f	» » final
p	concentration en éthanol :g.l ⁻¹
p _m	» » maximale
p _f	» » finale
t	temps en heures
t _f	temps final : la fermentation est considérée comme terminée lorsqu'il n'y a plus ni production d'éthanol, ni consommation de sucre.

$$\tau = \frac{t}{t_f} = \text{temps réduit}$$

$$r_x, r_p, r_s = \text{vitesse de croissance, de production d'éthanol, de consommation de substrat : g l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}.$$

$$\mu = \frac{1}{X} r_x = \text{taux de croissance : h}^{-1}.$$

μ_m = taux de croissance maximal.

$v_p = \frac{1}{X} r_p$ = vitesse spécifique de production d'éthanol : $g \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$.

$v_s = \frac{1}{X} r_s$ = vitesse spécifique de consommation de sucre : $g \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$.

$R_x = \frac{X_f - X_o}{S_o - S_f} =$ Rendement global de conversion du sucre en biomasse : $g \cdot g^{-1}$.

$R_p = \frac{p_f}{S_o - S_f} =$ Rendement global de conversion du sucre en alcool : $g \cdot g^{-1}$.

$p = \frac{p_m}{t_f} =$ Productivité : $g \cdot l^{-1} \cdot h^{-1}$.

Manuscrit reçu le 24 juillet 1979.

RÉSUMÉ

Dans un premier temps, les concepts cinétiques nécessaires à la compréhension et à la mise en œuvre de la fermentation alcoolique sont discutés.

Dans un deuxième temps, à la lumière des résultats expérimentaux, nous montrons l'influence de la concentration initiale en sucre (glucose) sur les rendements en biomasse et en éthanol, sur la densité cellulaire et la vitesse moyenne de production d'éthanol. La concentration cellulaire est relativement faible ($1,5$ à 3 gl^{-1}) et ce, quelle que soit la concentration initiale en substrat.

Après avoir discuté cette observation, nous montrons qu'il n'existe pas de phase exponentielle de croissance et que, lorsque la concentration initiale en sucre augmente, la fraction de temps de fermentation qui s'effectue à un taux de croissance supérieur à $10^{-2} \mu_m$ diminue très sensiblement.

SUMMARY

In that work, kinetic concepts concerning understanding and process of alcoholic fermentation are discussed. Referring to experimental results, it is shown that yield of biomass and of ethanol, cell density and mean speed of ethanol production are in connection with the initial level of glucose. Cell concentration is relatively low without any correlation with the initial concentration of substrate.

It is shown that exponential growing phase does not exist; when increases the initial level of glucose decreases strongly the time of fermentation occurring with a level growing higher than $10^{-2} \mu_m$.

ZUSAMMENFASSUNG

Im ersten Punkt werden die notwendigen kinetischen Begriffe zur Erläuterung des Gärablaufes diskutiert.

Im zweiten Punkt werden bezüglich der experimentellen Daten der Einfluß des initialen Zuckergehaltes (Glukose) auf den Gehalt an Biomasse und Äthanol, ferner auf die Zellulosemenge und die mittlere Geschwindigkeit der Äthanolproduktion gezeigt. Die Zellkonzentration ist relativ niedrig (1,5 bis 3 g/l⁻¹), und zwar unabhängig von der Höhe der initialen Substratkonzentration.

Nach der Diskussion dieser Beobachtungen wird, daß es keinen spontanen Gärungsanstieg gibt und daß, wenn die initiale Zuckerkonzentration größer wird, die Zeitfraktion der Gärung, die bei einem Wachstumsverhältnis höher als 10⁻² verläuft, sehr stark empfindlich reagiert.

RESUMEN

Se discuten los conceptos cinéticos necesarios para la comprensión y realización de la fermentación alcohólica. Asimismo se muestra, a la luz de los resultados experimentales, la influencia de la concentración inicial de azúcar (glucosa) sobre los rendimientos de biomasa y etanol, la densidad celular y la velocidad media de producción del etanol. La concentración celular es relativamente baja (1,5 a 3 gl⁻¹) fuere cual fuere la concentración inicial en el substrato. Después de discutir esta observación los autores muestran que no existe fase exponencial de crecimiento y que, cuando la concentración inicial de azúcar aumenta, el tiempo de fermentación para una tasa de crecimiento superior a 10⁻² μ_m disminuye muy sensiblemente.

RIASSUNTO

In un primo tempo, i concetti cinetici necessari alla comprensione ed alla messa in opera della fermentazione alcoolica sono discussi.

In un secondo tempo, alla luce di risultati sperimentali, dimostriamo l'influenza della concentrazione iniziale in succhero (glucosio) sui rendimenti in biomassa ed in etanol, sulla densità cellulare e la velocità media di produzione d'etanol. La concentrazione cellulare è relativamente debole (1,5 a 3 gl/1) qualsiasi la concentrazione iniziale in sostrato.

Dopo aver discusso questi osservazione, dimostriamo che non esista fase esponenziale di crescita e quando la concentrazione iniziale in zucchero, aumenta, la frazione di tempo di fermentazione che si effettua a un rapporto di crescita superiore a 10⁻² μ_m , diminuisce sensibilmente.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AIBA S., SHODA M. et NAGATANI M., 1968. Kinetics of product inhibition in alcohol fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. X, 845-864.

AIBA S., HUMPHREY A. et MILLIS N., 1973. *Biochemical Engineering*, University of Tokyo Press ed., Tokyo.

- AIYAR A.S. et LUEDEKING R., 1966. A kinetic study of the alcoholic fermentation of glucose by *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioeng. and Food Processing Chemical Engineering Progress Symposium Series*, Vol. 62, n° 69, 55-59.
- BARRE P. et COMBE P., 1975. Un fermenteur de laboratoire pour l'étude de la fermentation alcoolique continue à masse volumique constante des jus de raisin. *Revue des Fermentations et des Industries Alimentaires*, T. 30, n° 3, 67-72.
- CASTELLI T., 1941. *Ann. Microbiol.*, 2, 8, cité par RIBÉREAU-GAYON J. et al., 1975. *Sciences et Techniques du Vin*, T. 2, 300.
- LAFON M., 1955. Contribution à l'étude de la formation des produits secondaires de la fermentation alcoolique. *Thèse Sciences*, Bordeaux.
- MONOD J., 1942. *Recherches sur la croissance des cultures microbiennes*. Hermann éd. Paris.
- NAGATANI M., SHODA M. et AIBA S., 1968. Kinetics of product inhibition in alcohol fermentation. *J. Ferment. Technol.*, Vol. 46, n° 3, 241-248.
- RIBÉREAU-GAYON J., PEYNAUD E., RIBÉREAU-GAYON P. et SUDRAUD P., 1975. *Sciences et Techniques du Vin*, T. 2, Dunod éd., Paris.
- RIVIÈRE J., 1975. *Les applications industrielles de la microbiologie*. Masson éd., Paris.
- SCHATZMANN H. et FIECHTER A., 1976. Anaerobic chemostat experiments with *Saccharomyces cerevisiae*. *Fifth International Fermentation Symposium*, Berlin, p. 112.
- STREHAIANO P., 1973. La sélection clonale de levures et son application à l'élaboration d'un vin mousseux. *Thèse Doc. Ing.*, Toulouse.
- YAROVENKO V.L. et NAKHMANOVITH B.M., 1973. Kinetics of product synthesis in continuous alcoholic fermentation. *Pure Appl. Chemistry*, Vol. 36, n° 3, 397-405.