

ESSAIS DE BILANS DE LA FERMENTATION ALCOOLIQUE
DUE AUX CELLULES DE LEVURES

par

L. GENEVOIS

Faculté des Sciences de Bordeaux (France)

I. LES DIVERS PRODUITS DE LA FERMENTATION ANAÉROBIE

1. Essai d'un bilan des produits secondaires de la fermentation

Très peu d'auteurs se sont attachés à établir un bilan complet de la fermentation alcoolique. Récemment, E. PEYNAUD, au laboratoire de Bordeaux, s'est attaché à suivre les divers produits formés par la levure vivante à côté de l'alcool; les premiers résultats relatifs à l'acide acétique ont paru déjà en 1939¹; les résultats principaux ont été publiés en 1946, 1947² et 1948. Ils vérifient une hypothèse sur l'origine des produits formés publiés par l'auteur de ces lignes dès 1936³. Le travail analytique considérable fourni par PEYNAUD n'a pas eu pour seul résultat d'accumuler des chiffres, ou même de vérifier des hypothèses; il a apporté quelques notions nouvelles plus ou moins inattendues.

L'hypothèse publiée en 1936³ et vérifiée depuis, était la suivante: le glycérol prend naissance dans une fermentation glycéropyravique:

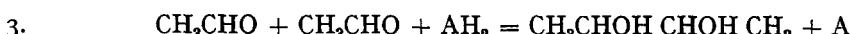


L'acide pyruvique formé est décarboxylé en acétaldéhyde; l'acétaldéhyde est dirigé vers 3 voies différentes:

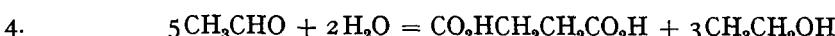
2. a) elle est dismutée en alcool et acide acétique



b) elle est condensée en acétylméthylcarbinol, réduit ensuite en 2-3 butyléneglycol



c) elle est condensée en acide succinique, avec formation corrélative de 3 molécules d'alcool



La voie a avait été décrite par C. NEUBERG sous le nom de fermentation alcaline; la voie b avait été décrite par le même auteur pour levures fermentant en présence d'acétaldéhyde; la voie c n'avait à ma connaissance pas été envisagée. PASTEUR avait déjà en 1861 affirmé que l'acide succinique ne pouvait provenir que du sucre, car la masse d'acide succinique formée pouvait atteindre 2 fois la masse de levure formée; EHRLICH avait fait en 1911 une autre hypothèse, qui a été depuis généralement admise sans preuve expérimentale sérieuse, à savoir que l'acide succinique proviendrait de

l'acide glutamique. Malheureusement, les levures sont pauvres en acide glutamique, et la quantité d'acide succinique trouvée est 20 fois au moins la quantité d'acide glutamique de la levure qui l'a engendrée; les huiles de fusel apparaissent effectivement en quantités 10 à 20 fois plus faibles que l'acide succinique, ce que montrent par exemple les travaux de CLAUDON ET MORIN en 1887.

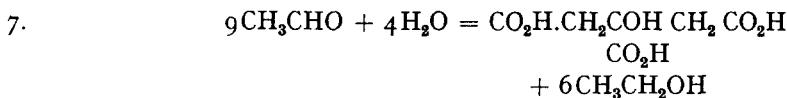
L'hypothèse de 1936 conduit à une équation que voici: entre le nombre g de molécules de glycérol, a d'acide acétique, b de butyléneglycol, m d'acétylmethylcarbinol, s d'acide succinique, h d'acétaldéhyde *présentes côte à côte dans le milieu à un moment quelconque de la fermentation*, doit exister la relation:

$$5. \quad g = 2a + b + 2m + 5s + h.$$

L'analyse de plus de 60 fermentations conduites dans des milieux divers, et avec diverses levures, a permis à E. PEYNAUD d'établir l'équation empirique^{4, 5, 7}:

$$6. \quad \sum = 2a + b + 2m + 5s + h = 0.9 g$$

ce qui signifie que 10% de l'acétaldéhyde donne des produits qui échappent pour le moment à l'analyse. PEYNAUD a trouvé qu'il se formait un peu d'acide citrique, ou du moins d'un acide en ayant tous les caractères analytiques (insolubilité du sel de baryum dans l'alcool à 30°, formation d'acétone par oxydation permanganique à l'ébullition à p_H 4^{10, 11}). Si l'on admet que l'acide citrique se forme suivant l'équation de bilan suivante (qui n'a nullement l'ambition de représenter la marche réelle de la formation de l'acide citrique):



l'introduction de l'acide citrique c avec le coefficient 9 dans l'équation 6 aboutit à un bilan se bouclant aux erreurs expérimentales près:

$$8. \quad 2a + b + 2m + 5s + h + 9c = g$$

2. Relation entre le CO_2 et l'alcool

Des équations 2, 3, et 4, on peut déduire de même une relation entre le CO_2 dégagé au cours de la fermentation et l'alcool formé; comme un certain nombre de molécules d'acétaldéhyde donnent autre chose que de l'alcool, on doit trouver plus de molécules K de CO_2 que de molécules d'alcool A , et la différence $K-A$ est donnée par:

$$9. \quad K-A = a + 2b + 2m + 2s + 3c + h$$

Cette dernière équation est particulièrement difficile à vérifier, car la différence $K-A$ est de l'ordre de 2% de K ou A ; pour mesurer cette différence d'une façon utile, il faudrait doser K et A à 1/10000^{ème} près, ce qui présente des difficultés techniques considérables, aussi bien pour le CO_2 (qui est très soluble dans l'eau) que pour l'alcool (qui est souillé d'huiles de fusel).

Il faut remarquer qu'au début de la fermentation, la différence $K-A$ est bien supérieure à 2%. Il est commode d'exprimer $K-A$ en fonction du glycérol g , en partant de l'équation 8.

10.

$$K - A = g + b - (a + 3s + 6c)$$

L'ordre de grandeur du phénomène est donné par la valeur de g ; or, comme nous le verrons plus loin, au début d'une fermentation, g représente 20 ou 30%, voire plus, si l'on se rapproche du début de la fermentation, des molécules de sucre fermentées; on doit donc mesurer aisément $K - A$ au début de la fermentation. La solubilité du CO_2 introduit une cause d'erreur grave, qui a fait croire à certains expérimentateurs qu'il se formait au début de la fermentation plus d'alcool que de CO_2 . En réalité, il ne peut pas se former une molécule d'alcool sans décarboxylation, et libération de CO_2 ; l'inverse n'est pas vrai; il peut apparaître du CO_2 , sans libération d'alcool, par exemple, lorsqu'il se fait de l'acétaldéhyde, de l'acétylméthylcarbinol ou du butyléneglycol.

3. Méthodes d'addition ou de soustraction d'acétaldehyde

Les hypothèses faites précédemment ont été démontrées par PEYNAUD, non seulement par l'analyse d'un grand nombre de fermentations produites en milieu stérile par des levures pures et sélectionnées, mais encore par l'analyse de fermentations en milieux modifiés, et modifiés de deux façons:

a) par addition progressive d'acétaldéhyde au milieu⁶, on augmente les quantités d'acide acétique, d'acide succinique, de butyléneglycol, qui se forment; on double ces quantités; les 3 corps se comportent de la même façon.

b) par addition progressive de dimédon au milieu, on diminue la quantité d'acétaldéhyde libre, on "capture" l'acétaldéhyde, et on diminue dans des proportions considérables les trois corps qui en dérivent; on peut réduire l'acide acétique formé au $\frac{1}{5}$ de sa valeur dans le témoin.

A côté de ces résultats prévus, des notions nouvelles, les unes attendues, les autres complètement inattendues, ont apparu.

4. Rôle du milieu et de la race

Deux notions nouvelles et non surprenantes ont été apportées:

1. Les proportions d'acides acétique et succinique, et de butyléneglycol, par rapport au glycérol formé, varient beaucoup en fonction du milieu, non seulement du p_H , mais encore de beaucoup d'autres facteurs (GENEVOIS, PEYNAUD, RIBEREAU-GAYON⁷.)

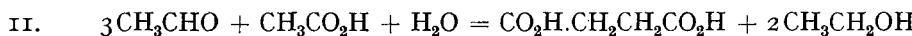
2. Dans un même milieu (jus de raisin filtré et stérilisé) les diverses races de levure se comportent très différemment; il est commode de considérer le rapport $\frac{a}{s}$ de l'acide acétique à l'acide succinique, et le rapport $\frac{b}{g}$ du butyléneglycol au glycérol. Le rapport $\frac{a}{s}$ varie de 0.5 à 3, le rapport $\frac{b}{g}$ de 0.04 à 0.12 (PEYNAUD, RIBEREAU-GAYON⁸).

Ainsi la fermentation alcoolique, qui, d'après des dosages simples d'alcool et de CO_2 , varie très peu en fonction du milieu et de la race de levure, est au contraire une fonction très sensible du milieu et de la race, si l'on considère les produits accessoires issus de la dismutation de l'acétaldéhyde.

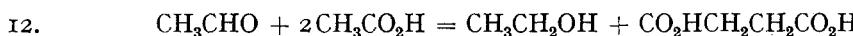
Acide acétique, butyléneglycol, acétylméthylcarbinol sont des éléments très importants de l'appréciation des vins, de sorte que nous saisissons comment des levures différentes peuvent donner des vins différents à partir d'un même moût.

5. La réduction de l'acide acétique

Une notion nouvelle et tout à fait inattendue a été apportée par PEYNAUD¹: l'acide acétique peut à la fois apparaître et disparaître au cours d'une même fermentation; il se forme en quantités relativement grandes au début, puis sa formation s'arrête, et on assiste à la disparition de proportions importantes (parfois les $\frac{2}{3}$) de l'acide acétique formé (Fig. 2). L'acidé acétique est peut-être réduit en alcool, car les acides propionique et butyrique donnent un peu d'alcools propylique et butylique. Corrélativement, il apparaît dans le milieu de l'acide succinique. Tout se passe, au point de vue du bilan, comme si l'on avait la réaction.



On peut encore supposer la réaction



Comme 1 molécule d'acide acétique correspond à 2 molécules d'acétaldéhyde, d'après (2), rien n'est changé au bilan 5, quelle que soit l'hypothèse adoptée.

L'équation (11) laisse prévoir que la quantité d'acide acétique qui sera réduite sera toujours inférieure à la quantité d'acide succinique formée. Dans la fermentation d'une molécule de glucose (180 g) il se forme de 4 à 6 millimolécules d'acide succinique; effectivement, la réduction de l'acide acétique ne dépasse pas 5 millimolécules par litre, et cela lorsque l'on ajoute un excès (12.4 millimolécules) d'acide acétique au début de la fermentation. Lorsque la levure réduit son propre acide acétique, la quantité réduite ne dépasse pas 3 millimolécules.

Ce phénomène de réduction dépend du milieu; si l'on ajoute un sel de cuivre au milieu, 20 mg par exemple, la réduction de l'acide acétique est empêchée; le cuivre forme des complexes avec la cystéine et la glutathion, et c'est peut-être là le mécanisme de son action. Si l'on ajoute au contraire de la cystéine au milieu, le maximum d'acide acétique et la teneur finale en acide acétique sont nettement plus faibles (Fig. 3).

Ce phénomène dépend de la levure: il est des levures réductrices, qui font disparaître les $\frac{2}{3}$ de l'acide acétique qu'elles produisent; on observe en fin de fermentation un p_{H} bas, de l'ordre de 9. Il est au contraire des levures sans action sur l'acide acétique qu'elles forment; ces levures donnent au milieu où elles fermentent, un p_{H} relativement

TABLEAU
PRODUITS FORMÉS AU COURS D'UN

Temps Jours	Sucres g	Alcool degrés	Glycérol Mill.	Cations				Somme
				Acid.	Alcal.	NH_3		
0	166		0	95	61	1.9		158
1	134	2°.2	53	104	61.7	0.4		166
2	86	5°.0	58	107	62	0.4		169
3	56.5	6°.8	67	107	62	0.3		169
8	6.5	9°.9	82	112	62.4	0.3		175
Bilan				+ 17	+ 1.4	— 1.6		+ 16.8

Cation et anions sont exprimés en milliéquivalents par litre.

Aux cations: Acid. signifie Acidité de titration (à pH 7.5).

Alcal. signifie Alcalinité des cendres.

élevé de 12 à 16. Il est des levures ayant une action modérée sur l'acide acétique; on observe alors des p_H de 10 à 11. Des études ultérieures préciseront les substances qui sont à l'origine de ces différences.

II. ÉTUDE EXPÉRIMENTALE DES PRODUITS FORMÉS AU COURS DE LA FERMENTATION

1. *Le départ de la fermentation*

Le Tableau I, emprunté à E. PEYNAUD² (1947) montre l'évolution d'une fermentation d'un moût du cépage de raisin rouge petit Verdot, à 25°. Le moût a été stérilisé au moment de la récolte, conservé en bouteilles, ensemencé ensuite au laboratoire d'une levure pure particulièrement réductrice. On a supposé que le bitartrate ne précipitait pas, et le bilan a été calculé en rajoutant le bitartrate précipité à celui subsistant dans le milieu. Les équilibres de précipitation de bitartrate sont en effet fort longs à atteindre. Des échantillons de chaque stade de fermentation ayant été prélevés et conservés, un tableau a pu être dressé en tenant compte du bitartrate précipité, l'équilibre de solubilité ayant été réalisé (PEYNAUD²).

La fermentation est partie rapidement, de sorte que, au bout de 24 heures, 32 g de glucose et de lévulose avaient déjà fermenté, ce sucre représente 178 millimolécules; il a engendré 53 millimolécules de glycérol; 30% du sucre ont donc suivi la voie de la fermentation glycéropyravique. Si l'on pouvait suivre le sort des 20 premières millimolécules de sucre fermentées, il est probable que la fermentation glycéropyravique prédominerait.

En même temps que le glycérol, on voit apparaître 2 millimolécules d'acide lactique, ce qui montre qu'au départ de la fermentation alcoolique, 1% au moins du sucre emprunte la voie de la fermentation lactique. Cette proportion s'élèvera sensiblement à la fin: les 50 derniers grammes — 280 millimolécules — engendreront 5 millimolécules d'acide lactique, ce qui représente 1.8% du sucre consommé. Si l'acide lactique était dû à des bactéries, on n'observerait pas ce phénomène: les bactéries lactiques sont toujours inhibées par l'alcool, en sorte que l'on verrait se former plus d'acide lactique au début qu'à la fin de la fermentation.

Outre l'acide lactique, il apparaît au début de la fermentation de l'acide acétique, 5.5 milliéquivalents, de l'acide succinique, 2.9 milliéquivalents, de l'acide citrique

I

FERMENTATION ALCOOLIQUE

Anions							
Tart.	Mal.	Citr.	Acét.	Succin.	Lact.	Phosph.	Somme
101	46.5	3.5	1.0	0		1.5	153
101	45	4.0	6.5	2.9	2.0	1.5	163
101	45	4.2	5.5	7.1	3.2	1.5	167
101	43.5	4.5	5.0	8.7	4.0	1.5	167
101	41.4	4.7	3.8	11.2	9.0	1.0	172
	— 5.1	+ 1.2	+ 2.8	+ 11.2	+ 9		+ 19.1

0.5 milliéquivalents. Si l'on suit ces acides au cours de la fermentation, on observe l'augmentation progressive des acides succinique et citrique, mais par contre on voit disparaître progressivement l'acide acétique, sur 6.5 milliéquivalents au bout de 24 heures de fermentation, 2.7 disparaissent, et il ne reste finalement que 3.8 milliéquivalents.

En fin de fermentation, il est apparu 11.2 milliéquivalents d'acide succinique, 9 d'acide lactique, 2.8 d'acide acétique, 1.2 d'acide citrique. Considérer l'acidité formée au cours de la fermentation comme due au seul acide succinique est donc ignorer la complexité du phénomène.

2. L'acide lactique

PEYNAUD² a dosé l'acide lactique formé au cours de la fermentation d'un moût de raisin à 156 g de sucre au litre, de p_H 3.26, par 15 levures pures, retirées presque toutes de vins de la Gironde; il a trouvé de 5 à 7 milliéquivalents d'acide lactique formé, ce qui, ramené à 180 g de sucre, représente de 6.0 à 8.5 milliéquivalents.

Il a fait fermenter un moût de raisin à 180 g de sucre du litre, qu'il a ajusté à des p_H allant de 2.7 à 7.0; une levure de *Fronsac* a donné des quantités d'acide lactique allant de 5.4 à 6.7 milliéquivalents, sans relation avec le p_H ; une levure de *Saint-Emilion* a donné de 5.1 à 6.3 milliéquivalents, également sans relation avec le p_H . L'acide lactique est donc un produit très constant de la fermentation par les levures, qui ne varie pratiquement pas entre de larges limites de p_H .

3. Formation et disparition de l'acide acétique

La formation d'acide acétique varie énormément:

1. Avec la race de levure.
2. Avec les conditions de milieu.

Avec la plupart des levures, l'acide acétique formé passe par un maximum, parfois tout au début de la fermentation, le plus souvent lorsque la moitié ou les deux tiers du sucre ont fermenté. Ce maximum est compris entre 2 et 9 milliéquivalents par litre;

l'acide acétique en fin de fermentation est compris entre 1 et 8 milliéquivalents, tout cela pour des fermentations suivies dans des jus de raisin filtrés et stériles (PEYNAUD^{1, 2}) (Fig. 1).

Dans les conditions de la vinification normale, la proportion d'acide acétique formée est beaucoup plus élevée, les vins contiennent normalement de 10 à 20 milliéquivalents d'acide acétique que l'on peut attribuer à la fermentation alcoolique, indépendamment de la pique acétique, ou des traces d'acide acétiques formées dans la fermentation malolactique (GENEVOIS, PEYNAUD, RIBEREAU-GAYON³).

La formation d'acide acétique en fonction du p_H présente toujours un

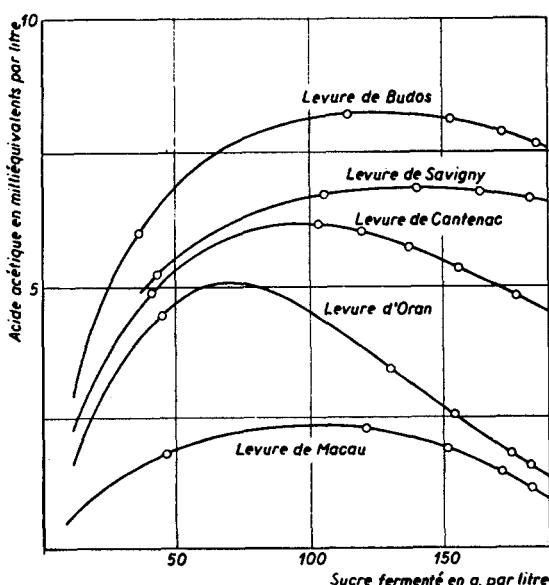


Fig. 1

minimum, minimum dont la valeur absolue est très variable selon la race, de 2 à 10 milliéquivalents, et qui se produit pour des p_H allant de 3.5 à 5 (PEYNAUD²) (Fig. 2).

En milieu neutre (p_H 7), la production d'acide acétique va de 15 à 25 milliéquivalents par litre, selon la race et augmente rapidement avec le p_H . On tend vers la "fermentation alcaline" de C. NEUBERG. Cu empêche la réduction, la cystéine favorise la réduction de l'acide acétique (Fig. 3).

4. Formation d'acide citrique au cours de la fermentation

La levure forme, en anaérobiose, une petite quantité d'un acide ayant tous les caractères analytiques de l'acide citrique. Cet acide a été recherché dans la fermentation d'un moût de raison à 166 g de sucres, contenant déjà 4 milliéquivalents d'acide citrique au litre. 7 levures différentes ont donné des quantités d'acide citrique supplémentaires allant de 1 à 2 milliéquivalents par litre. On peut se demander si cet acide citrique ne provient pas

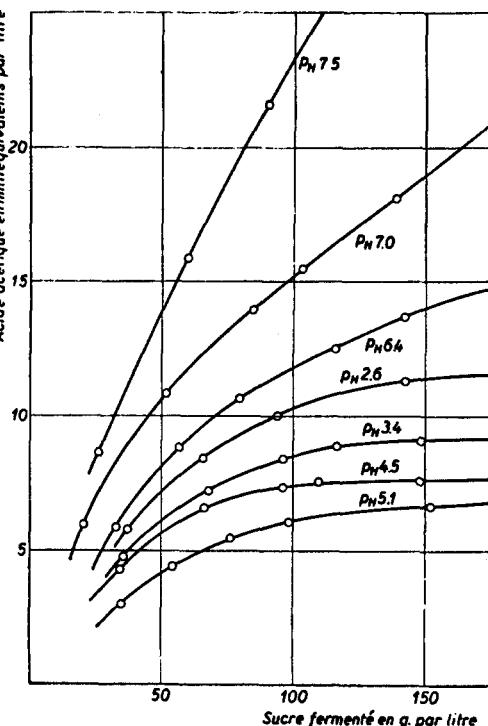


Fig. 2

de l'acide malique présent normalement dans le moût. La levure détruit en effet de 10 à 20% de l'acide malique présent, en passant par le stade d'acide oxalacétique; or l'acide oxalacétique réagit biochimiquement avec l'acide pyruvique pour donner de l'acide citrique. Mais l'expérience montre que les quantités d'acide citrique formées sont indépendantes des quantités d'acide malique présentes, ou transformées.

Si l'on fait fermenter 5 fois un même milieu, auquel on ajoute après chaque fermentation du sucre après élimination de l'alcool, on observe la formation de quantités régulièrement croissantes d'acide citrique, de 1.5 milliéquivalents à chaque opération (PEYNAUD^{2, 10}).

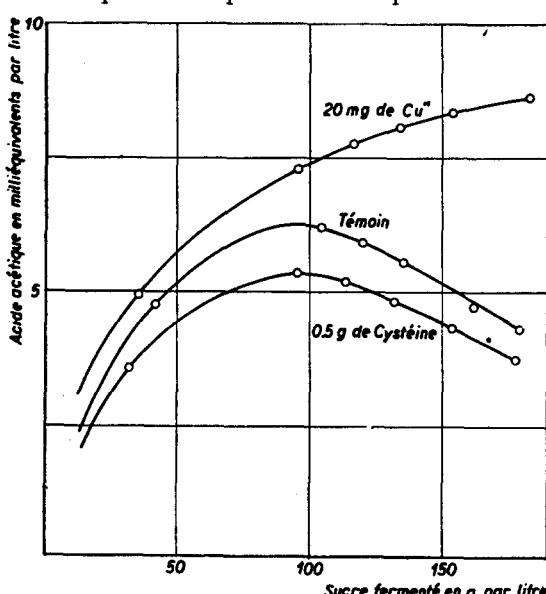


Fig. 3

III. INFLUENCE DES ADDITIONS OU SOUSTRACTIONS D'ACÉTALDEHYDE SUR LA
FERMENTATION ALCOOLIQUE

1. Addition d'acétaldehyde

Il est impossible d'ajouter brutalement de l'acétaldéhyde au milieu de fermentation, car l'éthanal est toxique pour la levure à des doses supérieures à M/100. Il faut ajouter l'éthanal lentement, à raison de 0.2 g par jour et par litre, par exemple, pendant 10 jours; la fermentation est simplement un peu ralenti. La levure arrive ainsi à transformer en 10 jours 2 g d'acétaldéhyde, pour 190 g de sucre fermenté, ce qui représente 5% du nombre des molécules de sucre fermentées. Cela suffit pour modifier profondément les quantités de produits secondaires de la fermentation (GENEVOIS, PEYNAUD, RIBÉREAU-GAYON⁷).

L'expérience a été répétée avec deux levures: une levure de vin rouge typique, levure de Pomerol, une levure industrielle de boulangerie.

Les résultats sont portés sur le Tableau II, dans les deux cas, les trois produits secondaires de la fermentation, acides acétique et succinique, et butyléneglycol, augmentent massivement.

TABLEAU II

ADDITION D'ACÉTALDÉHYDE À DEUX FERMENTATIONS (JUS DE RAISON À 190 g DE SUCRE)
MILLIMOLÉCULES POUR 10 LITRES DE MILIEU FERMENTÉ (SAUF POUR L'ALCOOL)

Levure	Aldehyde ajoutée	Alcool	Glycérol	Acides		Acétyl méthyl carbinol	Butylène glycol	Aldéhyde restant	Σ	Σ g
				Acétique	Succin.					
Pomerol	0 502	11°0 11°2	570 500	92 144	33 73	0.2 0.3	34 93	8 69	363	83
		+ 0.2	— 70	+ 52	+ 40	+ 0.1	+ 59	+ 61		
Boulangerie	0 502	10°8 11°0	580 510	37 109	51 84	0.6 10.3	42 119	8 28	406	85
		+ 0.2	— 70	+ 72	+ 33	+ 9.7	77	+ 20		

L'expérience consiste à comparer une fermentation de jus de raisin (190 g de sucre réducteur par litre, $p_H = 3.17$) recevant 0.2 g d'acétaldéhyde par jour, à une fermentation témoin, marchant parallèlement, avec la même levure.

La levure de Pomerol fait passer l'acide succinique de 33 à 73 millimolécules pour 10 litres, l'acide acétique de 92 à 144, le butyléneglycol de 34 à 93, l'acide succinique augmente de 120%, le butyléneglycol de 160%, 45% de l'acétaldéhyde ajoutée sont passés à former de l'acide succinique et de l'alcool selon l'équation 4. La levure de boulangerie "travaille" moins l'acétaldéhyde à l'état d'acide succinique, néanmoins 34% de l'aldéhyde se retrouve encore dans l'acide succinique et l'alcool correspondant. Chaque levure possède sa façon personnelle de distribuer l'acétaldéhyde entre les acides acétique et succinique, le butyléneglycol et l'acétylméthylcarbinol.

2. *Addition de dimédon*

Le moyen le moins brutal de soustraire de l'acétaldéhyde au milieu de fermentation, consiste à ajouter du dimédon (PEYNAUD²). Le dimédon étant très peu soluble dans l'eau, il faut l'ajouter en solution alcoolique; pour qu'il reste convenablement en solution, il faut que la teneur initiale du milieu en alcool soit de 4° environ; pour qu'il réagisse assez vite avec l'aldéhyde, il faut que le p_H du milieu soit d'au moins 4 et de préférence 6. Le Tableau III porte deux fermentations, réalisées dans du jus de raisin à 4° d'alcool, à p_H 4.0 et 6.5, chaque fois avec et sans dimédon. Sans dimédon, l'acide acétique apparaît dès les premiers jours de fermentation, puis n'augmente plus que lentement; avec dimédon, la formation d'acide acétique est très faible au début, et se poursuit lentement, au cours de toute la fermentation.

TABLEAU III
ACTION DU DIMÉDON SUR LA FORMATION D'ACIDE ACÉTIQUE
JUS DE RAISIN À 4° D'ALCOOL ET À 1% DE DIMÉDON

p_H du milieu	Témoin			+ 1% dimédon		
	Temps Jours	Sucre fermenté g	Acide Acétique Milliéqu.	Temps Jours	Sucre fermenté g	Acide Acétique Milliéqu.
4.0	3	56	3.6	5	36	0.9
	4	96	4.1	7	68	1.2
	5	125	4.3	12	133	2.2
6.5	3	48	9.3	3	26	1.0
	5	105	17.3	5	89	2.9
	6	125	20.3	6	105	4.3

A p_H 4, le dimédon réagissant lentement, la formation d'acide acétique est réduite à la moitié de sa valeur normale. A p_H 6.5, le dimédon réagissant mieux, l'acide acétique est réduit à 21% de la valeur du témoin.

IV. BILAN DES PRODUITS SECONDAIRES DE LA FERMENTATION

1. *Milieu constitué par du jus de raisin stérilisé*

Sur un même jus de raisin à 190 g de sucre au litre, de p_H = 3.17, ont fermenté 29 levures différentes de provenances très variées: 16 levures de vins rouges de la Gironde, 2 levures ayant poussé spontanément sur des jus de raisins concentrés, 1 levure de vin blanc, 1 levure de boulangerie, et 9 levures de vins suisses (PEYNAUD¹³). Les dosages ont porté sur les substances figurant dans les bilans (5) et (6), savoir: glycérol (g), acides acétique (a) et succinique (s), acétylméthylcarbinol (m), 2-3 butyléneglycol (b), acétaldéhyde (h). La production de glycérol a relativement peu varié d'une levure à l'autre: 52 à 75 millimolécules par litre; l'acide acétique a varié de 3 à 12, l'acide succinique de 4.8 à 9, l'acétylméthylcarbinol de 0.02 à 0.11, le butyléneglycol de 3 à 6, l'acétaldéhyde de 1.5 à 4, le tout en millimolécules. Malgré ces grandes variations, dues à la diversité des races physiologiques de levure, le bilan 6 se vérifie aux erreurs d'expériences près (Tableau IV) (GENEVOIS, PEYNAUD, RIBÉREAU-GAYON²). Si l'on appelle Σ la somme:

$$\Sigma = 5s + 2a + 2m + b + h$$

on observe que le rapport $\frac{\Sigma}{g}$ est compris entre 0.82 et 0.96, les chiffres les plus fréquent étant voisins de 0.90.

TABLEAU IV

BILAN DES PRODUITS SECONDAIRES DE LA FERMENTATION

FERMENTATIONS SUR JUS DE RAISIN STÉRILE (J) ET SUR SOLUTION DE SACCHAROSE (S)
MILLIMOLÉCULES POUR 10 LITRES

Levure	Type	Milieu	g	a	s	m	b	h	Σ	$100 \frac{\Sigma}{g}$	$\frac{a}{s}$	$1000 \frac{b}{g}$
Margaux	Succinogène	J	650	43	77	0.2	36	37	544	84	0.56	55
		S	840	153	68	0.4	85	10	741	88	2.2	101
Boulanger	Id. glycol.	J	640	37	80	0.7	55	26	555	86	0.7	84
		S	820	153	65	0.5	83	10	784	89	2.4	101
La Tresne	Equilibré	J	610	78	70	0.3	33	33	572	93	1.1	55
		S	780	220	40	0.4	84	7	731	92	5.5	106
Malvoisie	Id. glycol.	J	600	59	60	1.1	57	27	502	83	1.0	95
		S	750	160	59	0.9	71	4	640	85	2.7	94
Pauillac	Acétogène	J	630	84	58	0.4	34	31	523	83	1.4	54
		S	750	218	38	0.6	77	5	708	94	5.7	102
Bonarda	Id. glycol.	J	610	100	48	0.7	56	31	527	86	2.0	92
		S	790	233	36	0.5	59	8	713	90	6.5	75

Glycol. = abréviation pour "butylèneglycologène"

Il reste donc un ou plusieurs constituants, dérivant de l'acétaldéhyde, qui restent à déterminer, mais ils ne représentent pas plus de 10 à 15% de l'acétaldéhyde dérivant de la fermentation glycéropyravique.

Il est commode de considérer le rapport de l'acide acétique à l'acide succinique $\frac{a}{s}$ et le rapport du butylèneglycol au glycérol, $\frac{b}{g}$; le rapport $\frac{a}{s}$ varie de 0.4 à 2.1, selon les levures, le rapport $\frac{b}{g}$ varie de 0.048 à 0.095, ces rapports permettent un classement physiologique des levures, en levures succinogènes ($\frac{a}{s} < 0.75$) acétogènes ($\frac{a}{s} > 1.25$) et équilibrées ($0.75 < \frac{a}{s} < 1.25$); les levures où $\frac{b}{g} > 0.070$ pourront être considérées comme glycologènes (PEYNAUD ET RIBÉREAU-GAYON^b).

On peut répartir les levures dans six catégories physiologiques différentes (Tabl. IV).

Ainsi ce travail analytique considérable aboutit à deux résultats: vérifier les hypothèses faites sur l'origine des acides acétique et succinique, et du butylèneglycol, donner une description logique des diverses races de levures.

2. Milieu constitué par une solution de saccharose et d'eau de levure

L'expérience précédente, portant sur 29 levures différentes, a été répétée sur une solution de saccharose à 180 g au litre, contenant 10% d'extrait de levure. Le p_H de ce milieu se stabilisait aux environs de 5. Les mêmes produits que précédemment ont été

dosés; ils se sont trouvés systématiquement différents (GEVENOIS, PEYNAUD, RIBÉREAU-GAYON⁷).

1. le glycérol *g* augmente de 10 à 40%
2. l'acide acétique *a* est en moyenne 3 fois plus élevé
3. l'acide succinique *s* diminue de 10 à 20%
4. le butyléneglycol *b* double généralement
5. l'acétylméthylcarbinol *m* est en quantités du même ordre
6. l'acétaldéhyde *h* tombe au quart de sa concentration.

Par contre, l'équation (6) se vérifie comme précédemment; le mécanisme de la fermentation est le même, mais la distribution de l'acétaldéhyde entre les divers produits de fermentation est différente. Le rapport $\frac{a}{s}$, au lieu de varier de 0.4 à 2.1 varie de 2.0 à 6.5; le rapport $\frac{b}{g}$ varie de 0.07 à 0.11 (Tableau IV).

Les différentes catégories de levures, caractérisées par leur fermentation sur jus de raisin filtré et stérile, présentent sur milieu au saccharose d'autres constantes, comme il est normal; chez toutes les levures, le rapport $\frac{a}{s}$ augmente considérablement, les levures succinogènes présentent des rapports $\frac{a}{s}$ de 2 à 3, au lieu de 0.4 à 0.75; les levures acétogènes présentent des rapports $\frac{a}{s}$ de 5 à 7 au lieu de 1.25 à 2. Les levures dites "équilibrées", au lieu d'un $\frac{a}{s}$ voisin de 1, donnent pour $\frac{a}{s}$ des valeurs échelonnées de 3 à 5.5. Ces trois catégories de levures se retrouvent donc sans difficulté.

Les levures qui présentaient des rapports $\frac{b}{g}$ faibles, de 0.04 à 0.07, présentent des rapports $\frac{b}{g}$ voisin de 0.10. Les levures caractérisées comme glycologènes précédemment, avec un $\frac{b}{g}$ déjà voisin de 0.10, gardent sensiblement la même valeur pour le rapport $\frac{b}{g}$, comme s'il y avait un "plafond" pour la formation de butyléneglycol.

Le rapport $\sum \frac{g}{g}$ oscille, comme précédemment, entre 0.82 et 0.95. Il a donc là une véritable "constante" biologique, indépendante dans une large mesure de la race de la levure et de la nature du milieu fermenté.

3. Fermentation dans les vins

La fermentation dans les vins est rarement une fermentation alcoolique pure; dans à peu près tous les vins non sulfités ni additionnés d'alcool, l'acide malique est transformé en acide lactique, par fermentation malolactique due à des bactéries spéciales; d'après PEYNAUD⁸, qui a soigneusement étudié ce type de fermentation à Bordeaux, il apparaît, non seulement de l'acide lactique, à raison d'une molécule par molécule d'acide malique détruit, mais encore un peu d'acide acétique, de 1 à 7 milliéquivalents par litre, qui semble provenir d'une autre source. Les chiffres les plus fréquents pour l'acide acétique ainsi formé vont de 2 à 4 milliéquivalents. Il semblerait donc que le bilan indiqué par l'équation (6) ne doive plus se vérifier. Cependant, si l'on considère

TABLEAU V

BILAN DES PRODUITS SECONDAIRES DE LA FERMENTATION DANS LES VINS ROUGES ET BLANCS

Année	Type	Vin	g	a	s	m	b	h	Σ	$100 \frac{\Sigma}{g}$	$\frac{a}{s}$	$1000 \frac{b}{g}$
1945	Rouge	Pomerol	850	112	90	0.9	81		757	89	1.24	95
1945	"	Blaye	830	163	71	0.5	79		761	90	2.16	93
1944	"	Moulis	804	122	85	1.1	65		736	91	1.4	81
1944	"	St. Emilion	654	122	51	2.2	48		551	85	2.4	73
1943	"	Listrac	862	174	84	1.1	70		840	98	2.1	81
1943	"	Bourg	890	200	71	0.5	71		827	93	2.8	80
1946	Blanc	Tuchan	590	66	65		64	16	537	91	1.0	108
1946	"	Tautavel	730	90	74		92	36	678	93	1.2	126
1945	"	Tautavel	770	99	71		94	35	682	88	1.4	122
1946	"	Frontignan	250	53	16		32	17	235	94	3.3	128

des vins jeunes, de un à deux ans d'âge, des vins pasteurisés, des vins "vinés" c'est-à-dire additionnés d'alcool au cours de la fermentation, pour garder du sucre, le bilan (6) se vérifie presque toujours.

Par exemple, sur 20 échantillons de vins rouges de la Gironde analysés par PEYNAUD⁸ au printemps 1946, 18 présentent des rapports \sum_g normaux, allant de 0.82 à 0.98 et 2 seulement des rapports supérieurs à 1, par suite d'un excès d'acide acétique.

L'expérience montre que le rapport $\frac{a}{s}$ est dans un vin rouge issu de la fermentation de la macération de la totalité de la baie de raisin fraîche, très différent de ce qu'il est dans la fermentation d'un jus de raisin filtré et stérilisé.

Dans les vins rouges, le rapport $\frac{a}{s}$ s'est toujours trouvé compris entre 1 et 3, en éliminant les échantillons contenant visiblement de l'acide acétique dû à une fermentation acétique. La valeur absolue de a va de 10 à 20 milliéquivalents, alors que sur jus de raisin stérile il va de 3 à 12; les levures françaises donnent même pour a des valeurs comprises entre 3 et 8. Même en tenant compte de l'acide acétique de la fermentation malolactique, 2 à 4, il est clair que la fermentation due aux levures se fait dans le moût naturel autrement que dans nos flacons, et que le rendement en acide acétique est au moins doublé.

Dans le cas des vins blancs du midi⁹, très riches en sucre, mutés à l'alcool en cours de fermentation, ce qui empêche l'action des bactéries malolactiques, le rapport \sum_g s'est trouvé compris entre 0.88 et 0.94. Le cas du muscat de Frontignan, muté après fermentation du quart à peine de son sucre, est très intéressant; le rapport $\frac{a}{s}$ est élevé, 3.3, comme il est normal au départ de la fermentation; le rapport $\frac{b}{g}$ est aussi remarquablement élevé, 0.13; le rapport \sum_g est normal, 0.94.

CONCLUSIONS

La détermination des produits secondaires de la fermentation, glycérol, acides acétique et succinique, acétylméthylcarbinol, butylèneglycol et acétaldehyde, présente donc un grand intérêt:

1. Toutes ces substances sont des produits normaux de la fermentation alcoolique.
2. Elles proviennent d'une fermentation glycéro-pyruvique, qui prédomine au départ de la fermentation, mais se poursuit durant toute la destruction du sucre.
3. Elles obéissent à l'équation (6).
4. Les rapports de l'acide acétique à l'acide succinique, du butylèneglycol au glycérol, varient en fonction du moment de la fermentation, de la race de levure, enfin de la nature du milieu fermenté (p_H , etc. . .).
5. Ces rapports peuvent, dans un milieu donné, servir à caractériser des races de levures.
6. L'acide acétique suit au cours de la fermentation une évolution compliquée, qui le fait apparaître, puis disparaître.
7. Dans les fermentations naturelles (vin), la considération de l'équation (6) permet de caractériser certaines altérations bactériennes graves.

CONCLUSIONS

Determination of the secondary products of alcoholic fermentation: glycerol, acetic acid, succinic acid, acetyl methyl carbinol, butyleneglycol and acetaldehyde, is of great interest, for:

1. All these compounds are normal products of alcoholic fermentation.
2. They arise from a glycero-pyruvic fermentation, which dominates in the beginning of the fermentation, but perseveres during the destruction of all the sugar.
3. They agree with equation (6).
4. The relation between acetic acid and succinic acid, as between butyleneglycol and glycerol, depends upon the phase of the fermentation, the strain of yeast, and finally also upon the nature of the medium in which fermentation takes place (p_H , etc.).
5. In a given medium these relations can serve to characterize the strains of yeasts.
6. During the fermentation acetic acid is subject to a complicated evolution, which causes it to appear and then to disappear again.
7. In natural fermentations (wine) a consideration of equation (6) enables the characterization of certain serious bacterial changes.

SCHLUSSFOLGERUNGEN

Die Bestimmung der Nebenprodukte der alkoholischen Gärung: Glycerin, Essigsäure, Bernsteinäure, Acetyl methylcarbinol, Butylenglykol und Acetaldehyd ist aus folgenden Gründen wichtig:

1. Alle diese Verbindungen sind normale Produkte der alkoholischen Gärung.
2. Sie stammen aus einer Glycero-Brenztraubensäure-Gärung, die zu Beginn der Gärung vorherrscht, aber während der ganzen Zersetzung des Zuckers fortduert.
3. Sie sind im Einklang mit Gleichung (6).
4. Das Verhältnis Essigsäure/Bernsteinsäure und Butylenglykol/Glycerin hängt von der Phase der Gärung, von dem benutzten Hefestamm und endlich von der Natur des Milieus ab, in dem die Gärung stattfindet (p_H , usw.).
5. In einem bestimmten Milieu können diese Verhältnisse zur Charakterisierung der Heferasse dienen.
6. Die Essigsäure ist während der Gärung einem komplizierten Prozess unterworfen, durch den sie zuerst auftritt und dann wieder verschwindet.
7. Bei natürlichen Gärungen (Wein) kann man durch Betrachtung der Gleichung (6) gewisse ernste bakterielle Veränderungen charakterisieren.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 PEYNAUD, *Annales des fermentations*, 5 (1939) 321, 385.
- 2 PEYNAUD, *Thèse*, Bordeaux 1946; *Industries agricoles et alimentaires*, 64 (1947) 87, 167, 301, 399.
- 3 GENEVOIS, *Bull. soc. chim. biol.*, 18 (1936) 295.
- 4 GENEVOIS, PEYNAUD, RIBÉREAU-GAYON, *Compt. rend. acad. sci.*, 223 (1946) 693.
- 5 PEYNAUD ET RIBÉREAU-GAYON, *Ibidem*, 224 (1947) 1388.
- 6 GENEVOIS, PEYNAUD, RIBÉREAU-GAYON, *Ibidem*, 224 (1947) 766.

- ⁷ GENEVOIS, PEYNAUD, RIBÉREAU-GAYON, *Ibidem*, 226 (1948) 126.
⁸ GENEVOIS, PEYNAUD, RIBÉREAU-GAYON, *Ibidem*, 226 (1948) 439.
⁹ GENEVOIS, PEYNAUD, RIBÉREAU-GAYON, *Ibidem*, 227 (1948) 227.
¹⁰ PEYNAUD, *Bull. intern. du vin*, 118 (1938) 33.
¹¹ PEYNAUD, *Ann. chim. anal.*, 28 (1946) 111.
¹² PEYNAUD, *Industries agricoles et alimentaires* (1948).

Reçu le 5 avril 1949