

# Justification de l'emploi d'un milieu synthétique pour la multiplication des levures destinées à la vinification

Autor(en): **Steinberg, B.**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **43 (1952)**

Heft 3

PDF erstellt am: **22.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-982646>

## **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

## **Haftungsausschluss**

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

## Literatur

- 1) *K. Täufel* und *R. Reiss*, Ztschr. analyt. Chem. **134**, 252 (1951).
- 2) Schweiz. Lebensmittelbuch 4. Auflage, S. 166 (1937), Verlag Zimmermann & Co. AG, Bern.
- 3) *Th. von Fellenberg*, diese Mitt. **38**, 265 (1947).
- 4) *Th. von Fellenberg*, diese Mitt. **28**, 84 (1937); **3**, 321 (1912).
- 5) *W. Schoch*, diese Mitt. **42**, 242 (1951).
- 6) Ann. chim. phys. **26**, 175 (1849).
- 7) *C. I. Kruisheer*, Z.U.L. **58**, 270 (1929).
- 8) *H. Röttgers*, Lehrbuch der Nahrungsmittelchemie, 5. Auflage, Bd. I, S. 885 (1926), Verlag von Joh. Ambrosius Barth, Leipzig; Gesetze und Verordnungen (Beilage zu Z.U.L.) **16**, 49 (1924).
- 9) Malzextrakte, Nachtrag zum Kapitel «Diätetische Nährmittel», diese Mitt. **41**, 115 (1950).
- 10) Methods of A.O.A.C., 7. Edition, 502 (1950). Published by the Association of Official Agricultural Chemists, Washington 4.

## Justification de l'emploi d'un milieu synthétique pour la multiplication des levures destinées à la vinification

Par *B. Steinberg*

(Institut de Botanique Générale de l'Université de Genève)

### Introduction

L'usage et la loi prévoient, pour la multiplication des levures de vin, l'emploi exclusif des moûts de raisin ainsi qu'il est prescrit à l'art. 422, al. 7, de l'«Ordonnance réglant le commerce des denrées alimentaires et de divers objets usuels»: «Pour la culture des levures de vin, il n'est permis d'employer que du moût de vin, et pour celle de levures de cidre, que le jus de fruit non fermenté de l'espèce correspondante.»

Cependant, l'emploi du moût offre deux inconvénients majeurs: l'inconstance de sa composition et la rareté de ce liquide qu'il faut stabiliser d'un automne à l'autre (manutentions de stérilisation, etc.). A ces caractères, s'ajoute celui de son prix élevé.

La protection prévue pour une denrée alimentaire telle que la levure et les produits qui en dérivent nécessite-t-elle réellement l'usage exclusif du moût de raisin?

Nous préconisons l'emploi d'un milieu synthétique offrant les avantages suivants:

1. Constance de sa composition.
2. Confection possible à n'importe quel moment de l'année.
3. Nature parfaitement inoffensive de tous ses constituants.
4. Similitude de sa composition avec celle du moût.
5. Prix de revient abaissé.
6. Présence de qualités appréciées de l'analyste: possibilité de varier les concentrations d'azote et de carbone, absence de viscosité, absence de couleur, absence de sédiment, limpidité.

Nous allons justifier, dans l'étude qui suit, la proposition de substituer au moût naturel un milieu synthétique «marchand» pour les destinations scientifiques et industrielles.

### I. Choix du milieu

Le milieu que nous proposons vise à remplacer le moût naturel. Il doit donc s'en rapprocher par sa composition.

#### a) Composition moyenne du moût de raisin

La quantité en sucre y est fort variable: on trouve de 8 à 25 g<sup>0</sup>/<sub>0</sub>.

La concentration en azote oscille autour de 0,18 à 1,37 g par litre. On possède peu de documents sur les diverses combinaisons azotées du moût. Les protides représentent environ 1 à 4 % de l'azote total. Par suite des activités enzymatiques, on trouve aussi de l'albumose, des peptones, des acides aminés, des amines et de l'ammoniaque.

Il y a 3 à 5 g de matières minérales par litre de moût, dont la répartition peut être admise comme suit:

P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0,4—1,3 g	Na <sub>2</sub> O	0,1 g
SO <sub>3</sub>	0,25 g	CaO	0,2 g
SiO <sub>2</sub>	traces	MgO	0,2 g
Cl	traces	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,025 g
K <sub>2</sub> O	2,5—3,5 g	AlO <sub>3</sub>	0,005 g

#### b) Origine de notre milieu

Notre milieu est une modification de celui de *Williams, Stout, Mitchell* et *McMahan* (= WSM<sub>3</sub>), préconisé pour la culture des levures et plus particulièrement destiné au dosage de l'inositol. En voici la composition originale:

		centimes
Saccharose	20,0 g	2,6
Phosphate monopotassique	2,0 g	3,6
Sulfate d'ammonium	3,0 g	1,74
l-asparagine	3,0 g	300,0
Chlorure de calcium	0,25 g	0,0108



		centimes
Sulfate de magnésium	0,25 g	0,037
Acide borique	1,0 mg	0,00022
Sulfate de zinc	1,0 mg	0,00026
Chlorure de thallium	1,0 mg	0,00045
Sulfate de manganèse	1,0 mg	0,00033
Perchlorure de fer	1,0 mg	0,00014
Sulfate de cuivre	0,1 mg	0,000043
Iodure de potassium	0,1 mg	0,000235
Hydrolysate de caséine exempt de vitamine	0,2 mg	0,0012
Pantothénate calcique	300,0 $\gamma$	0,033
Chlorhydrate de thiamine	20,0 $\gamma$	0,003
Chlorhydrate de pyridoxine	20,0 $\gamma$	0,0118
Acide folique	0,5 $\gamma$	0,07
Biotine	0,2 $\gamma$	0,00016
Eau distillée	1000,0 ml	

La formule qui précède n'est pas appropriée au but poursuivi pour les raisons suivantes:

1. Le thallium, corps dont la toxicité est grande, ne peut pas être incorporé à un mélange touchant directement ou indirectement une denrée alimentaire. La suppression du thallium n'entraîne pas de diminution de la valeur nutritive du milieu, ainsi que l'ont montré *Atkin, Williams, Schultz et Frey* (= AWSF).

2. Les sources d'azote du milieu de WSMM sont:

Sulfate d'ammonium	soit 0,657 g d'N
l-asparagine	soit 0,657 g d'N
hydrolysate de caséine exempt de vitamine	soit 0,030 g d'N

L'azote de l'asparagine du milieu original correspond à 4,10625 g de protides que nous introduisons sous forme d'hydrolysate de caséine. Cette valeur est suffisante (4,106 g/l) si l'on s'en réfère à l'analyse du moût qui indique 616,4 mg/l d'azote total, dosé par la méthode de *Kjeldahl*. L'expérience nous a montré que la collection des acides aminés représentée par l'hydrolysate de caséine exempt de vitamine a une valeur équivalente à l'asparagine. Cette substitution nous permet d'autre part d'abaisser le prix de notre milieu de 2,75 fr. par litre.

3. WSMM affirment que leur milieu est insuffisant pour assurer un développement maximum, même après addition d'inositol, substance que nous introduisons dans notre milieu à la concentration de 5,0 mg/l (prix de revient: 3,0 ct./l). D'autres facteurs de croissance, encore non identifiés, doivent être présents. Les auteurs les y introduisent sous forme de 75 mg/l de foie de veau.

Ces réserves sont sans importance dans le cas qui nous intéresse; la récolte sur milieu synthétique modifié est égale ou supérieure à celle obtenue sur le moût de raisin.

Nous avons renoncé à l'emploi du milieu AWSF. Cette solution nutritive comporte en effet de l'acide citrique, du citrate de potassium et des doses de

vitamines beaucoup plus élevées que celles du milieu WSMM; la présence de radicaux acides et alcooliques peut constituer un obstacle au cours des analyses des produits de la fermentation. La surcharge en vitamines ne se justifie pas puisque les faibles doses prévues par la formule WSMM assurent une croissance égale ou supérieure à celle obtenue sur le moût naturel.

### c) Eléments et concentrations de notre milieu

Phosphate monopotassique	2,0	g
Sulfate d'ammonium	3,0	g
Chlorure de calcium	0,25	g
Sulfate de magnésium	0,25	g
Sulfate de zinc	1,0	mg
Sulfate de manganèse	1,0	mg
Perchlorure de fer	1,0	mg
Sulfate de cuivre	0,1	mg
Iodure de potassium	0,1	mg
Acide borique	1,0	mg
Pantothénate de calcium	300,0	γ
Acide folique	0,5	γ
d-Biotine	0,25	γ
Chlorhydrate de thiamine	20,0	γ
Chlorhydrate de pyridoxine	20,0	γ
Inosit (méso)	5,0	mg
Saccharose	20,0	g
Hydrolysate de caséine exempt de vitamine	4,106	g
Eau distillée ad	1000	ml

### d) Prix de revient

Notre milieu coûte 0,33 fr. par litre tel qu'il est indiqué ci-dessus; en le modifiant pour l'étude du pouvoir alcoologène (24,38 g<sup>0</sup>/ode saccharose) il revient à 0,65 fr. alors que le prix moyen du moût de raisin est de 1,30 fr. (1951).

### e) Confection du milieu

Elle comprend 4 étapes:

1. Préparation d'une solution concentrée des éléments minéraux.

- a) Peser 20 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  et 30 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Introduire ces deux substances dans un erlenmeyer; ajouter 100 cm<sup>3</sup> d'eau distillée. Introduire dans un flacon de 1 litre (A).
- b) Peser 2,5 g de  $\text{CaCl}_2$  et la même quantité de  $\text{MgSO}_4$ . Ces deux substances, réunies dans un erlenmeyer sont additionnées de 100 cm<sup>3</sup> d'eau distillée. Introduire dans A.
- c)  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{MnSO}_4$ ,  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ . Peser 10 mg (à la balance analytique) de chacune de ces substances. Additionner chacune d'elles en erlenmeyers respectifs de 100 cm<sup>3</sup> d'eau distillée. Introduire ces 4 solutions dans A.

d)  $\text{CuSO}_4$  et KI. Peser 10 mg (à la balance analytique) de chacune de ces substances. Diluer par 1000  $\text{cm}^3$  d'eau distillée; prélever 100  $\text{cm}^3$  de chacune des solutions et les introduire dans A.

Le flacon A contient alors 800  $\text{cm}^3$ ; on prélève 80  $\text{cm}^3$  de A pour la confection d'un litre de milieu synthétique.

2. Pesée de la quantité nécessaire d'hydrolysate de caséine exempt de vitamine; à introduire «ex tempore».

3. Pesée de la saccharose. La quantité peut varier selon le but poursuivi: croissance ou fermentation.

4. Préparation des dilutions de vitamines.

a) La vitamine  $\text{B}_1$  est introduite sous forme de chlorhydrate de thiamine. Peser 20 mg et diluer selon les exigences. Elle est soluble dans l'eau, stable à la cuisson et peu sensible à l'action de la lumière et de l'air. Elle est stable en présence d'oxydants acides.

b) La vitamine  $\text{B}_6$ , introduite sous forme de chlorhydrate de pyridoxine est stable à l'air et à la lumière et supporte également une courte cuisson. Préparation par méthode de dilution.

c) L'acide pantothénique, introduit sous forme de D-pantothénate de Ca, est hygroscopique, stable à la chaleur et à la lumière.

d) La vitamine H, introduite sous forme de (+)-biotine est thermostable et sensible à l'oxygène. Elle est employée à partir d'ampoules contenant 25  $\gamma$ .

e) L'acide folique est à solubiliser dans de l'eau chaude (1 : 1000). Il se décompose à la cuisson avec des acides minéraux.

f) Le méso-inosite (Bios I) est soluble dans l'eau.

#### f) Validité du milieu

Le milieu de WSMM dont nous nous sommes inspirés est destiné à la multiplication des germes-levures les plus exigeants, il est donc valable pour l'ensemble des levures intéressant les praticiens.

#### g) Données analytiques justificatives

Les levures produites sur milieu synthétique ont-elles la même valeur «marchande» que celles produites sur le moût de raisin? Cette appréciation comporte deux étapes:

1. Estimation du pouvoir fermentaire des levures développées en milieu synthétique (pied de cuve ou semence) à l'égard de la solution nutritive synthétique (voir II).

2. Estimation du pouvoir fermentaire de la semence préparée en milieu synthétique à l'égard du moût de raisin (voir III).

De ces deux fermentations, seule la dernière sera prise en considération par le praticien et le législateur. Il n'est pas inutile de rappeler ici que le but de



notre travail n'est pas de confectionner un succédané de vin, mais qu'il se limite à la multiplication saine, rapide et économique de levures destinées à la fermentation des moûts naturels.

La connaissance de la fermentation du milieu synthétique par les levures du vigneron présente déjà une grande importance. Si, comme nous le verrons, la fermentation est complète, c'est-à-dire limitée par le taux d'alcool et non par la nature du substrat, cela indique que les levures développent au maximum leurs possibilités fermentaires. Cette première mesure du pouvoir zymasique révélera, dans une large mesure, l'aptitude d'un germe à fermenter le moût de raisin. L'évaluation du pouvoir fermentaire en milieu synthétique est plus aisée, en raison des qualités physiques du liquide de fermentation. Cet avantage, qui concerne plus l'analyste que le caviste, ne doit pas être négligé.

## *II. Fermentation du milieu synthétique*

Notre enquête porte sur les éléments suivants:

- a) la latence ou temps écoulé entre l'inoculation et le départ de la fermentation,
- b) la durée du dégagement gazeux,
- c) la quantité d'alcool produite,
- d) l'acidité produite,
- e) le pouvoir plasmogène,
- f) le bouquet,
- g) la couleur et l'amertume des levures produites.

### a) La latence

Sans émettre de proposition d'ordre systématique, nous avons jugé pratique de grouper les résultats selon les genres auxquels les germes étudiés appartiennent.

Nous pouvons distinguer:

3 souches du genre *Saccharomyces* à temps de latence plus grand sur milieu synthétique que sur moût. (Nous désignerons ces germes par le terme: M-philes.)

12 souches du même genre à temps de latence égal sur les deux milieu (MS-philes).

28 souches appartenant encore au genre *Saccharomyces* dont le temps de latence est plus petit sur milieu synthétique que sur moût (S-philes).

Le temps moyen de latence pour ces 43 souches est de 30 heures sur le moût, alors que ce même temps est de 19—20 heures sur milieu synthétique.

Pour le genre *Hansenula*, le temps de latence de toutes les souches étudiées est moindre en milieu synthétique. L'écart de ces valeurs avec celles notées sur le moût est parfois très important.

*Tableau 1*  
*Temps de latence*

Souches du genre Saccharomyces	Heures		Souches du genre Hansenula	Heures	
	Moût	Synthétique		Moût	Synthétique
122	20	20	151	68	49
123	20	24	170	84	60
124	20	28	171	84	60
127	48	20	172	84	60
128	20	20	182	68	60
129	20	20	183	84	60
130	28	20	184	68	60
131	28	20	185	84	60
133	28	20	186	84	60
134	22	16	187	72	60
135	36	22	188	84	60
136	36	12	189	72	60
137	20	12	190	84	64
138	38	16	191	84	64
139	20	16	192	84	60
141	36	16	194	88	60
142	36	16	195	88	60
143	36	16	196	68	64
144	22	16	198	88	60
147	20	16	199	88	60
149	20	12	201	88	60
150	36	12	202	84	60
152	22	18	203	72	60
153	31	18			
154	18	18			
155	18	18			
156	18	18			
157	18	18			
158	22	18			
159	34	12			
160	24	18			
161	24	12			
162	32	20			
163	34	12			
164	44	24			
165	24	24			
168	24	24			
169	24	24			
175	34	18			
176	24	24			
177	20	12			
179	34	34			
181	34	34			
208	34	12			
			Souches des genres Pichia (P) et Torulopsis (T)	Heures	
				Moût	Synthétique
			121 T	28	20
			126 T	34	20
			140 T	22	16
			148 T	22	16
			178 P	124	90
			180 P	240	100
			193 P	245	66
			200 P	84	60
			204 P	250	90
			205 P	84	44



*Tableau 2*  
*Pouvoir alcoologène*

Souches du genre Saccharomyces	g <sup>0</sup> /o d'éthanol		Souche du genre Hansenula	g <sup>0</sup> /o d'éthanol	
	Moût	Synthétique		Moût	Synthétique
122	10,625	13,750	151	8,125	1,625
123	11,875	3,375	170	3,750	3,125
124	14,375	5,000	171	2,500	6,250
127	14,375	14,375	172	4,375	5,625
128	11,250	10,000	182	1,850	4,450
129	9,375	8,750	183	3,750	8,750
130	8,750	10,000	184	3,125	6,500
131	11,250	6,000	185	4,375	4,375
132	11,875	11,875	186	3,125	6,875
133	10,000	3,250	187	5,000	5,000
134	10,625	9,375	188	4,375	6,250
135	13,750	11,875	189	4,375	8,750
136	9,375	9,375	190	4,375	4,375
137	13,125	13,125	191	3,750	6,250
138	9,375	10,625	192	2,500	6,250
139	14,375	13,750	194	4,375	3,125
141	11,250	13,125	195	2,725	9,375
142	12,500	10,625	196	3,750	6,875
143	11,875	11,875	198	3,125	4,375
144	12,500	9,375	199	10,625	8,125
147	13,750	10,000	201	3,750	3,750
149	9,375	9,375	202	3,750	4,375
150	7,250	8,750	203	3,750	7,500
152	11,875	10,625			
153	8,125	4,375			
154	10,625	10,625			
155	11,250	14,375			
156	13,750	13,750			
157	11,250	13,125			
158	13,750	11,875			
159	14,375	13,750			
160	13,750	11,750			
161	11,250	7,500			
163	14,375	10,000			
164	13,125	12,500			
165	14,375	4,375			
168	14,375	14,375			
169	14,375	14,375			
175	13,125	13,125			
176	8,125	10,000			
177	12,500	10,625			
179	13,750	13,750			
181	11,250	5,375			
197	14,375	2,500			
208	14,375	14,375			
			Souches des genres Pichia (P) et Torulopsis (T)	g <sup>0</sup> /o d'éthanol	
				Moût	Synthétique
			121 T	6,875	13,750
			126 T	14,375	13,125
			140 T	14,375	14,375
			148 T	13,750	12,500
			178 P	1,875	3,500
			180 P	1,875	1,250
			193 P	1,250	1,875
			200 P	3,750	5,000
			204 P	6,250	5,000
			205 P	10,000	13,125
			207 P	13,750	14,375

Toutes les souches étudiées de *Pichia* et de *Torulopsis* ont une fermentation plus précoce sur milieu synthétique que sur moût.

Ainsi, des 78 souches, 3 seulement fermentent plus rapidement sur moût que sur milieu synthétique. A cet égard, le milieu synthétique l'emporte sur le moût naturel, privilège qui justifie son emploi (table 1).

### b) La durée du dégagement gazeux

Les durées d'ébullition dans les deux milieux sont, à peu de choses près, les mêmes. Dans les cas où les temps d'ébullition sont différents, l'écart est proportionnel aux différences de concentration en alcool.

### c) La quantité d'alcool produite

La table 2 indique le pourcentage d'éthanol produit par chaque souche sur moût et sur milieu synthétique. (Pour la méthode analytique, cf. p. 7.)

La quantité d'alcool produite est égale sur les deux milieux pour 18 souches, supérieure sur moût pour 31 souches, supérieure sur milieu synthétique pour 29 souches. Ces mesures concernent 44 *Saccharomyces* (S), 23 *Hansenula* (H), 7 *Pichia* (P) et 4 *Torulopsis* (T).

*Tableau 3*  
*Production moyenne d'alcool en g<sup>0</sup>/o et en % du sucre dégradé*

Genre	Milieu	M-philes		MS-philes		S-philes		Moyenne	
		g <sup>0</sup> /o	%	g <sup>0</sup> /o	%	g <sup>0</sup> /o	%	g <sup>0</sup> /o	%
Saccharomyces		23 souches		13 souches		8 souches			
	Moût	12,47	86	12,65	88	9,75	68	11,65	81
	Synthétique	8,52	59	12,65	88	11,72	81	10,72	75
Hansenula		4 souches		4 souches		15 souches			
	Moût	6,86	46	4,38	30	3,54	27	4,68	32
	Synthétique	4,00	28	4,38	30	6,70	47	4,92	34
Pichia		2 souches		0 souche		5 souches			
	Moût	4,07	28			6,12	42	5,10	35
	Synthétique	3,12	22			7,65	53	5,35	37
Torulopsis		2 souches		1 souche		1 souche			
	Moût	14,06	97	14,37	100	6,87	48	12,34	80
	Synthétique	12,81	90	14,37	100	13,75	95	13,64	95

Appelons «M-phile» une levure produisant plus d'alcool sur le moût que sur le milieu synthétique, «S-phile» une levure produisant plus d'alcool sur le milieu synthétique que sur le moût, «MS-phile» une levure produisant la même quantité d'alcool sur les deux milieux. Le tableau 3 résume ces données.

Considérons tout d'abord l'ensemble des souches étudiées; leur production moyenne d'alcool s'élève sur moût à 8,292 g<sup>0</sup>/0, et sur milieu synthétique à 9,087 g<sup>0</sup>/0. Dans ces conditions, le milieu synthétique a une valeur supérieure au moût.

Considérons ensuite les pouvoirs alcoologènes de chaque genre:

1. Les souches de *Saccharomyces* fermentent, en moyenne, un peu mieux le moût que le milieu synthétique.
2. Pour les genres *Hansenula*, *Pichia* et *Torulopsis*, c'est l'inverse.

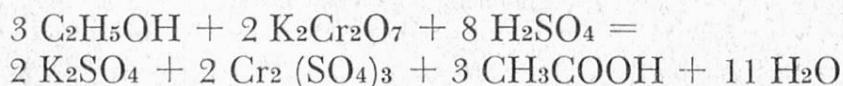
Pour les *Saccharomyces* en général, le milieu synthétique offre un léger désavantage en ce qui concerne la production d'alcool. L'adjectif «léger» se justifie puisque nous ne comptons pas moins de 14 souches transformant en alcool 95 à 100 % du sucre offert.

L'élection de certains milieux par certaines levures, désignée dans notre texte par le mot «philie», fera l'objet d'une autre communication. En effet, la préférence accordée à un milieu par tel germe particulier soulève un problème nouveau: la source en sucre étant la même partout, la production inégale d'alcool tient donc à autre chose. Puisque l'appareil enzymatique est le même dans les deux expériences, il doit y avoir une composante du milieu qui catalyse la production d'alcool ou l'inhibe.

Rappelons enfin, une fois de plus, que le but poursuivi n'est pas de faire du vin à partir d'un milieu synthétique, mais bien de développer sur ce milieu des levures aptes à fermenter le moût.

### *Dosage de l'alcool*

Afin de pouvoir faire en série et rapidement les nombreux dosages d'alcool, nous avons adopté la méthode de *Widmark*, modifiée par *Nicloux*, *Rochat* et *Naville*. Elle repose sur la transformation intégrale de l'alcool en acide acétique par oxydation en milieu sulfurique à l'aide du bichromate de potassium.



Au lieu de doser l'excès de bichromate par un titrage en retour, nous avons employé la technique suivante: à l'aide d'une éprouvette de Bang, étalonnée au préalable, on verse goutte à goutte la solution de bichromate. Tant qu'il y a de l'alcool, le bichromate jaune vire au bleu; lorsque tout l'alcool est oxydé, on note un virage au vert résultant du mélange bleu et jaune. Le moment du virage persistant est assimilé à la fin de la réaction.



### *Solutions titrées et réactifs*

1.  $K_2Cr_2O_7$ . 8,475 g‰<sup>\*</sup>). Le bichromate employé doit être très pur et séché à l'étuve à 100°. A conserver en flacon brun bouché à l'émeri.
2. *Ac. sulfurique* pur, concentré et bouilli.
3. *Ac. picrique* en solution saturée et filtrée, séché à l'étuve à 100°.

### *Matériel*

1. Appareil à distiller comportant un ballon de 250 cm<sup>3</sup>, une colonne de fractionnement, un manchon réfrigérant et une conduite se terminant par un long tube plongeant dans un flacon jaugé à 20 cm<sup>3</sup>.
2. 1 burette pour distribuer H<sub>2</sub>O distillé.
3. Burette de Bang.
4. 1 pipette étalonnée de 10 cm<sup>3</sup> pour H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.
5. 1 pipette de 10 cm<sup>3</sup> pour le prélèvement du milieu à doser.
6. 1 pipette normale de 2 cm<sup>3</sup> pour les dilutions du distillat.
7. 1 pipette effilée à entonnoir de 4 cm<sup>3</sup> pour introduire H<sub>2</sub>O distillé dans les ballons jaugés (20 cm<sup>3</sup>) destinés à recevoir le distillat.
8. Flacons jaugés à 20 cm<sup>3</sup> avec bouchons rodés.
9. Série d'éprouvettes contenant 18 cm<sup>3</sup> d'eau distillée pour les dilutions du distillat.
10. Série d'éprouvettes contenant 2 cm<sup>3</sup> d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré.

### *Mode opératoire*

10 cm<sup>3</sup> de la liqueur de culture sont additionnés de 6,5 fois leur volume de solution picrique saturée. Il est indispensable de verser la liqueur dans la solution picrique et de ne pas inverser l'ordre de cette opération afin d'éviter la formation de mousse pendant la distillation. L'extrémité du réfrigérant plonge dans quelque 3 cm<sup>3</sup> d'eau distillée; on distille à raison de 1 cm<sup>3</sup> environ par minute dans un ballon jaugé de 20 cm<sup>3</sup>. Après distillation on ferme la fiole bouchée à l'émeri et on agite.

Après avoir prélevé 2 cm<sup>3</sup> de distillat, on les porte dans la première éprouvette contenant 18 cm<sup>3</sup> d'eau distillée; on agite, on prélève 2 cm<sup>3</sup> que l'on reporte dans la deuxième éprouvette contenant elle aussi 18 cm<sup>3</sup>, ce qui fait que l'on a dilué 100 fois. On prélève alors 2 cm<sup>3</sup> de cette dilution que l'on reporte dans une troisième éprouvette contenant 2 cm<sup>3</sup> de la solution sulfurique.

### *Titrage*

On emploie à cet effet la burette de Bang qui a été étalonnée de telle façon (mesure de la surface totale de la base du robinet d'écoulement) que le cm<sup>3</sup>

---

<sup>\*</sup>) Cette valeur a été adoptée en fonction de la quantité d'alcool à titrer prévisible 0 à 11,5 gouttes de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>.

compte 20 gouttes et que 1 goutte correspond à 0,125 mg d'alcool oxydimétriquement.

Si le liquide se teinte en bleu en présence d'une goutte, il y a eu formation d'éthanol; on continue jusqu'au virage au vert qui marque la fin de la réaction. Il est recommandé de chauffer de temps en temps et d'attendre au moins une minute pour vérifier la présence stable de la coloration verte.

### *Calcul*

x gouttes correspondent à y mg d'alcool:  $y = x \cdot 0,125$ .

Le titrage a été effectué sur 2 cm<sup>3</sup> de distillat dilués 100 fois.

Soit:  $y \cdot 10\,000 = N$  g<sup>0</sup>/o d'alcool en poids.

### *Source sucrée*

Pour juger du pouvoir alcoologène d'une souche et le comparer à celui d'une autre, il est indispensable d'offrir au germe une quantité considérable de sucre (saccharose); l'optimum consiste à choisir une concentration qui ne limite pas la production d'éthanol et ne nuise pas aux cellules par une pression osmotique exagérée. Nous adoptons la valeur 30,8 g<sup>0</sup>/o de sucre interverti, valeur obtenue en ajoutant 24,38 g de saccharose pour 100 cm<sup>3</sup> de milieu synthétique. Le moût naturel dont nous disposions accusait un titre de 9,8 g<sup>0</sup>/o d'équivalent glucose. Il a donc fallu surcharger ce moût naturel en saccharose afin d'en amener le titre en sucre à 30,8.

En admettant que 7 % de la quantité totale de sucre sont consommés pour la formation de certains produits accessoires de la fermentation alcoolique, 28,75 g de sucre seulement entrent en jeu pour la formation d'alcool éthylique; on obtient théoriquement 14,375 g<sup>0</sup>/o d'alcool en poids, soit 18,2 % en volume. Ce rendement peut être considéré comme élevé pour des levures de vin. Nous l'avons, en conséquence, assimilé à la valeur 100 % de dégradation du sucre offert.

### d) L'acidité actuelle produite (pH)

a) Le moût de raisin pasteurisé que nous utilisons accuse un pH de 3,2 \*).

\*) Toutes les valeurs pH signalées sont obtenues au moyen de l'appareil *Beckmann* et déterminées 24 h. après l'arrêt de la fermentation.

La modification du pH produite au cours de la fermentation du moût est pratiquement insignifiante: le pH de départ étant 3,2, l'amplitude maximum de variation s'inscrit dans des valeurs allant de 2,95 à 3,3.

b) Toutes les levures acidifient le milieu synthétique au cours de la fermentation.

Une seule souche, No 165, *Saccharomyces Chodati*, donne un pH final de 4,02, c'est-à-dire moins acide que le pH final du moût.

Toutes les autres souches communiquent au milieu synthétique un pH final plus acide que le pH final noté sur le moût. L'importance de ce dépassement est variable.

Souches produisant un dépassement de 0,5 unités pH maximum:

Ce groupe comprend tous les *Saccharomyces*, sauf le No 165, et les *Torulopsis*. Il faut y relever la présence de 4 souches *Hansenula* et d'une souche *Pichia*.

121 (T)	137 (S)	143 (S)	154 (S)	160 (S)	169 (S)	177 (S)
126 (T)	138 (S)	147 (S)	155 (S)	161 (S)	170 (H)	178 (P)
127 (S)	139 (S)	148 (T)	156 (S)	162 (S)	171 (H)	179 (S)
130 (S)	140 (T)	149 (S)	157 (S)	163 (S)	172 (H)	181 (S)
134 (S)	141 (S)	151 (H)	158 (S)	164 (S)	175 (S)	197 (S)
135 (S)	142 (S)	152 (S)	159 (S)	168 (S)	176 (S)	208 (S)

Souches produisant un dépassement de plus de 0,5 unités pH avec des pH atteignant 1,4. Ce groupe est constitué par des souches des genres *Hansenula* et *Pichia*.

166 (P)	182 (H)	187 (H)	192 (H)	198 (H)	203 (H)
167 (P)	183 (H)	188 (H)	193 (P)	199 (H)	204 (P)
173 (P)	184 (H)	189 (H)	194 (H)	200 (P)	205 (H)
174 (P)	185 (H)	190 (H)	195 (H)	201 (H)	207 (P)
180 (P)	186 (H)	191 (H)	196 (H)	202 (H)	

#### *Remarque*

Les *Saccharomyces* et les *Torulopsis*, au point de vue pH, ont un comportement subégal sur les deux milieux.

Les *Hansenula* et les *Pichia* acidifient plus fortement le milieu synthétique que le moût.

Le pH du milieu synthétique fermenté, légèrement plus bas que celui du moût fermenté, ne semble pas, en première approximation, constituer un obstacle à son emploi.

#### e) Le pouvoir plasmogène

Nous le définissons présentement par la hauteur de la lie produite.

On procède à cette estimation comme suit: agiter soigneusement le flacon de culture 24 heures après l'arrêt de la fermentation; aspirer aussitôt 2 cm<sup>3</sup> de la suspension de levures au moyen d'une pipette de 2 cm<sup>3</sup>, graduée au centième; fixer verticalement la pipette dont les deux bouts sont hermétiquement fermés par des lames de caoutchouc; lire au bout de 48 heures la hauteur du sédiment formé.

La liste qui suit ne comporte qu'un certain nombre de souches; en effet, la technique que nous décrivons peut déclencher une fermentation secondaire qui contrarie définitivement le mouvement de sédimentation. Les souches productrices de fermentation secondaire ne sont pas justiciables de cette méthode (voir tableau 4).





La teinte brune des lies du moût de raisin tient principalement à l'oxydation des tannins qui sont adsorbés ou ont pénétré dans les levures. L'absence de tannins dans le milieu synthétique est responsable de la blancheur et d'une moindre amertume de la levure (dégustation des lies).

### *III. Fermentation du moût de raisin par des levures produites sur milieu synthétique*

Les mesures qui suivent constituent la partie essentielle de l'étude; elles révèlent la valeur fermentaire et «marchande» des germes élevés dans le milieu synthétique (cf. 1ère partie, page 5).

Des représentants de trois espèces ont été choisis parmi les clones produisant un taux élevé d'alcool.

Le tableau No 5 compare les fermentations produites dans le moût par des levures multipliées sur milieu synthétique et sur moût de raisin. L'égalité des conditions de ces deux fermentations simultanées a été assurée.

Manipulations préliminaires à la fermentation proprement dite: inoculer par la même levure du moût et du milieu synthétique; attendre l'arrêt des deux fermentations; redisperser les lies formées et prélever 1 cm<sup>3</sup> de chacune des suspensions; diluer 5 fois le prélèvement par de l'eau distillée stérile et inoculer le moût par 0,5 cm<sup>3</sup> de la suspension diluée.

*Tableau 5*

Souches	126 (T)		127 (S)		137 (S)		207 (P)	
	s	m	s	m	s	m	s	m
Multiplication sur milieu s ou m	s	m	s	m	s	m	s	m
Temps de latence en heures	12	18	12	18	12	18	12	18
Temps d'ébullition en heures	280	270	280	216	280	270	280	264
Pouvoir alcoologène en ‰	100	100	99	99	91	88	100	100
Pouvoir plasmogène en mm	25	20	20	24	15	60	80	25
Acidité ionique	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3

(T) = *Torulopsis* (S) = *Saccharomyces* (P) = *Pichia*

s = levures produites sur milieu synthétique m = levures produites sur moût de raisin

### *Conclusions*

Les levures développées sur milieu synthétique produisent autant sinon plus d'alcool que celles formées dans le moût. A cet égard, l'emploi du milieu synthétique «levurogène» se justifie.

La fermentation du moût produite par des levures développées sur milieu synthétique, se déclare plus tôt que celle produite par les levures élevées dans le moût. Cette avance appréciable tient probablement à l'entraînement de quelques aliments catalyseurs du milieu synthétique.

Le pouvoir plasmogène est du même ordre de grandeur pour *Torulopsis* 126 et *Saccharomyces* 127, quel que soit le milieu «levurogène». Pour le *Saccharomyces* 137, le sédiment est beaucoup plus important dans la fermentation provoquée par des levures issues du moût. Pour *Pichia* 207, c'est l'inverse.

Ces expériences prouvent que les levures multipliées sur le milieu synthétique ont une puissance fermentaire égale à celle des germes développés sur moût. Aucune particularité organoleptique n'a été constatée dans les liqueurs fermentées par les levures issues du milieu synthétique.

### *Résumé*

L'auteur propose un milieu de culture synthétique destiné à remplacer le moût de raisin pour la production des levures de vin.

Cette solution nutritive, de composition apparentée à celle du moût, dépourvue de toute substance toxique, présente une constance et des qualités physiques (absence de viscosité, de couleur, de sédiment et de mousse) qui manquent au moût. Par ailleurs, elle est disponible en toutes saisons et moins chère que le moût de raisin.

Des expériences faites avec 82 souches de levures de vins montrent que:

1. Le milieu synthétique a une fermentescibilité égale ou supérieure à celle du moût de raisin.
2. Les levures multipliées en milieu synthétique sont en tous points égales ou supérieures à celles produites dans le moût de raisin.



## Zusammenfassung

Eine synthetische Nährlösung zur Kultur der Weinhefen wird vorgeschlagen, die den Traubensaft vorteilhaft ersetzt. Sie besitzt eine dem Traubensaft vergleichbare Zusammensetzung ohne toxische Anteile; sie ist jedoch im Gegensatz zu diesem genau reproduzierbar vollständig klar, leichtflüssig und nicht schäumend. Zudem ist sie zu jeder Jahreszeit herstellbar und billiger.

Die ausgeführten Kulturversuche zeigen, dass:

1. Die Gärungsfähigkeit der synthetischen Nährlösung derjenigen des Traubensaftes eher überlegen ist.
2. Die entwickelten Hefen denen in natürlicher Nährlösung gewachsenen in keiner Weise nachstehen.

## Littérature

- 1) *C. Anthor*. Zeitschr. angew. Chemie. 1890, 3, 27.
- 2) *Bleyer*. Handbuch der Lebensmittel-Chemie. Alkoholische Genussmittel. 1938, 7, 192—202.
- 3) *P. György*. Vitamin Methods. 1950, 399—444.
- 4) *C. v. d. Heide* und *Fr. Schmitthener*. Der Wein, 1922, 70.
- 5) *Martin du Pan*. Helv. Chim. Acta. Vol. XXVI, II, 57.
- 6) Ordonnances réglant le commerce des denrées alimentaires et de divers objets usuels. Publié par la Chancellerie fédérale suisse.
- 7) *J. Rochat*. Helv. Chim. Acta 4, 918—30, 1946.
- 8) «Roche» Département scientifique, Les Vitamines, 1948, 22, 45—69.
- 9) Société des chimistes analystes suisses, Manuel suisse des denrées alimentaires, 1910, 218.
- 10) *M. Welsch*. Le dosage microbiologique des vitamines, 1947, 158—159.
- 11) *Widmark*. Biochem. Z. 131, 1922, 473—484.
- 12) *K. Windish*. Die chemischen Vorgänge beim Werden des Weines, 1906, 108.
- 13) Zeitschrift für Untersuchung der Lebensmittel, 1934, 68, 498.
- 14) *E. Zunz*. Eléments de pharmacodynamie spéciale, 1932, 924—926.

Cette étude a été faite au Laboratoire de Microbiologie et Fermentations de l'Institut de Botanique Générale de l'Université de Genève, sur le conseil et sous la direction de M. le Professeur *F. Chodat*, auquel je tiens à exprimer ma reconnaissance, non seulement pour l'attention avisée qu'il n'a cessé de me prodiguer mais aussi pour sa sollicitude.