Les conditions biologiques de la production de la glycérine par la méthode fermentative

Par

IRÈNE LIPSKA

Le fait que la fermentation alcoolique donne de la glycérine est connu depuis le temps de Pasteur. En consultant la littérature plus récente concernant les vins de raisin et de fruits, nous constatons que les conditions de la production de la glycérine ont été le sujet de plusieurs travaux, dont nous ne citerons que ceux de: H. Müller-Thurgau [19, 21], J. Laborde [13] et R. Reisch [31]. L'emploi de l'acide sulfureux pour empêcher les altérations du vin est connu depuis longtemps dans la pratique de la vinification. C'est H. Kerp [11] et V. Martinand [18] qui ont étudié le côté chimique de ce procédé et ont constaté que l'acide sulfureux disparaît rapidement dans un moût de raisin fermentant, en passant à l'état de combinaison aldéhydique. L'action physiologique de l'acide sulfureux sur les levures, notamment leur tolérance pour cet acide, leur pouvoir de s'y accommoder ont été étudiés par H. Müller-Thurgau [20] et W. Seifert [33]. La fermentation normale s'effectue généralement dans un milieu légèrement acide, à une concentration de ions H^+ déterminée par: H. v. Euler et O. Svanberg [7], H. Lüers [17] et Fr. Boas [2]. Cette acidité reste à peu près stationnaire pendant toute la durée de la fermentation. La possibilité de la fermentation alcoolique en milieu alcalin a été reconnue déjà par Pasteur. C'est C. Neuberg et ses collaborateurs qui ont étudié et élucidé ce processus durant 1918—20 [22, 23, 24, 25, 26, 27]. La transformation du sucre au moyen des levures en glycérine et en aldéhyde acétique fut appliquée à la production technique par W. Connstein et K. Lüdecke [5], qui en ont obtenu une licence en 1915. Pendant la grande guerre on a fabriqué en gros la glycérine par cette méthode biologique pour l'utiliser ensuite comme nitroglycérine.

Vu que dans ce sujet c'est la question biologique qui nous intéresse tout spécialement, nous nous bornerons à donner un bref récit des faits constatés par C. Neuberger et ses collaborateurs. La présence du sulfite de sodium dans un liquide en fermentation détermine une augmentation de glycérine, une accumulation de l'aldéhyde et un rendement plus faible en alcool. Le sucre, d'après ces auteurs, subit la transformation suivante: $C_6H_{12}O_6 = CH_3CHO + C_3H_8O_3 + CO_2$. Une relation équimoléculaire existe entre la production de la glycérine et celle de l'aldéhyde. De fait que le poids moléculaire de la glycérine est à peu près le double de celui de l'aldéhyde, il résulte que la quantité de glycérine est deux fois plus élevée que celle de l'aldéhyde. La marche de la décomposition du sucre est suivante: la glucose se dédouble en aldéhyde glycérique et dioxyacétone; ce dernier composé se transforme en méthylglyoxal; de l'aldéhyde glycérique par réduction se forme la glycérine; le méthylglyoxal par oxydation donne de l'acide pyruvique; par l'action de la carboxylase ou de la zymase cet acide est décomposé en aldéhyde acétique et CO_2 . Comme dans cette fermentation le sulfite de sodium intervient également, on a la réaction finale: $C_6H_{12}O_6 + Na_2SO_3 + H_2O = C_3H_8O_3 + NaHCO_3 + CH_3CH(OH)OSO_2Na$. Le complexe aldéhydique est ensuite dissocié grâce au milieu alcalin et l'aldéhyde se transforme en alcool. On voit de cet exposé que les levures produisent principalement ces composés intermédiaires dont la formation est la plus facile. Le seul moyen utilisé dans ce but est un échange inter et intramoléculaire de H et de OH; grâce à cette simplicité d'action chimique une admirable économie est réalisée dans la fermentation décrite. C. Neuberger avec ses collaborateurs a constaté en outre la même production de l'aldéhyde acétique et sa fixation par les sulfites dans les fermentations déterminées par les bactéries, à savoir: dans la fermentation lactique, acétique et butyrique [23, 28, 29]. De plus on a pu démontrer, grâce à l'affinité des sulfites pour les aldéhydes, que dans la décomposition du sucre par les moisissures il y a de nouveau une formation de l'aldéhyde acétique [4, 30]. Il suit de toutes ces constatations que le principe de la dégradation des sucres est toujours le même, tandis que ses produits peuvent être différents, conformément aux exigences vitales spéciales des microorganismes qui les engendrent.

Il est bien compréhensible que les chimistes ont fixé leur attention sur le côté chimique de ce cas exceptionnel de la fermentation alcoolique et ne se sont pas intéressés à son côté biologique. A présent, quand grâce à leur travail le chimisme de ce processus est

bien connu, ce sont les biologistes qui doivent à leur tour entreprendre leur étude physiologique. En faisant connaissance de ces travaux chimiques, dont les résultats principaux nous avons relatés plus haut, le biologiste est frappé par l'affirmation que le rendement de la glycérine n'est influencé ni par la température, ni par la nature du sucre, ni par la race de levure; seule l'aération le diminue notablement. C'est justement l'incompatibilité de ces constatations avec les observations déjà citées de H. Müller-Thurgau [20] sur la différence des races et sur la possibilité d'accoutumer les levures aux doses croissantes d'acide sulfureux et de sulfites, qui nous a décidé à étudier cette fermentation sulfiteuse. En se proposant de travailler sur ce sujet, il faut en premier lieu avoir à sa disposition une méthode pour déterminer la glycérine; méthode assez exacte, bien rapide et qui ne demande en même temps ni appareils chers, ni composés chimiques difficiles à se procurer. Le choix de la méthode et les déterminations de la glycérine, durant les expériences exposées dans ce travail, ont été faits par M^r R. Kwieciński, chimiste, assistant de la Sous-Section des Fermentations. Nous profitons de cette occasion et nous le remercions pour sa bienveillante collaboration. Passons maintenant à la description sommaire des méthodes employées. La plus connue est la méthode officielle de la détermination de glycérine employée couramment dans l'analyse des vins, voir A. Beythien [1]. Cette méthode est assez longue (elle demande au moins deux jours), elle est assez dispendieuse car l'alcool et l'éther y sont nécessaires; quant à son exactitude elle n'est pas satisfaisante, car les résultats sont toujours trop hauts, vu que la chaux ne précipite complètement ni le sucre, ni d'autres composés organiques. En second lieu, nous avons étudié la méthode de H. v. Törring [34]. Son principe repose sur la distillation du liquide fermenté à une haute température et sous une pression diminuée. Le liquide distillé doit être ensuite oxydé. Nous l'avons chauffé avec le bichromate de potasse et l'acide sulfurique concentré suivant la méthode de O. Hehner [9], perfectionnée par K. Braun [3]. Cette méthode combinée présente l'inconvénient que pendant la distillation une partie de glycérine se décompose en acroléine et que pendant l'oxydation outre la glycérine sont oxydées d'autres substances organiques. Nous n'avons pu étudier la troisième méthode de S. Zeisel et R. Fanto [36], vu l'impossibilité de nous procurer l'appareil spécial, qui y est nécessaire. La dernière méthode dont nous avons fait l'étude est celle de K. Fleischer [8]. Elle repose sur le même principe de la distillation du liquide fermenté que la deuxième, mais

l'auteur y a introduit deux perfectionnements importants : premièrement la distillation s'opère avec la vapeur d'eau surchauffée et secondement il y emploie deux réfrigérants : dans le premier circule l'eau chauffée à 70° C, tandis que dans le second — l'eau froide. Par ces deux importantes modifications de la méthode de H. v. Törring K. Fleischer a réussi d'y éliminer complètement les inconvénients cités plus haut. Nous avons approprié cette méthode à notre but en adoptant les dimensions plus petites des ballons pour opérer avec des portions de liquide de 100 cm³; ce qui nous a permis de réduire la durée d'une détermination de glycérine à deux heures à peu près, ce qui présente un grand avantage dans notre travail où il a fallu en faire par dizaines. Après avoir fait plusieurs déterminations parallèles de la glycérine avec les trois méthodes indiquées, nous nous sommes arrêtés définitivement sur celle de K. Fleischer, car elle correspond parfaitement à nos besoins, en réunissant la précision voulue à la commodité et la rapidité du travail.

Après avoir ainsi résolu le problème du choix de la méthode de la détermination de glycérine nous avons pu nous mettre à notre travail proprement dit, qui est l'étude biologique de la fermentation alcoolique en milieu alcalin. Nous allons d'abord passer en revue les principales questions de la fermentation sulfitique, qui nous ont intéressés plus spécialement. Ce sont d'abord : l'influence de la température, de la race des levures, de l'état physiologique de celles-ci et de la grandeur de leur ensemencement sur le rendement de glycérine. Ce sont ensuite : l'influence de la composition chimique du milieu de fermentation en premier lieu de la dose de sucre employé et de la proportion de sulfite ajoutée sur le rendement de glycérine et enfin la possibilité d'une stimulation des levures par l'addition des sels à l'action spécifique. Ensuite nous avons pensé à aborder l'étude de la fermentation alcoolique où la réaction alcaline du milieu a été obtenue par l'addition d'autres sels que les sulfites, pour finir par l'examen d'une troisième méthode biologique de la production de glycérine, méthode décrite par A. Koch [12]. Malheureusement, nos conditions de travail se sont changées de manière que nous sommes forcés de renoncer à ce sujet, ce qui nous a décidé à publier nos résultats malgré qu'ils soient incomplets.

Nous avons commencé notre étude de la fermentation sulfitique en 1923 par l'examen des levures de notre collection, pour en choisir ensuite les races qui produisent le plus de glycérine. Nous avons employé comme milieu de culture et de fermentation la mélasse des sucreries, car elle présente une source de sucre très bon marché, ce qui est

bien important au point de vue de la production technique de glycérine. Dans cent grammes de notre mélasse il y avait juste 50·2 gr. de sucre. Pour travailler dans les conditions d'une stérilité complète, ce qui est absolument indispensable, nous avons toujours stérilisé séparément la mélasse et le sulfite de soude avec de l'eau distillée. Nous avons fait la dilution de manière à avoir dans 100 cm³ de liquide 10 p. c. de sucre et 2 p. c. de sulfite ($\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Pour l'ensemencement de la fermentation nous avons utilisé un dépôt de levures cultivées 72 heures à 30° C sur 100 cm³ de mélasse diluée et additionnée de 10/0 de peptone. La fermentation avait toujours lieu durant 72 heures à la même température. Une expérience préliminaire faite dans ces conditions avec nos 50 races de levures nous a montré qu'il y en a beaucoup qui se sont refusées à fermenter. Nous avons répété la même expérience en choisissant les vingt levures qui ont présenté un assez vif dégagement de CO₂ et en y déterminant la glycérine produite avec la méthode de K. Fleischer. Les résultats sont réunis dans la table I, qui se trouve à la fin du travail. Les premiers dix numéros de cette table se rapportent aux levures de brasserie, les huit suivants à celles de distillerie, les deux derniers — à celles de vinification; en somme on y voit vingt races de levures dont le rendement de glycérine et la proportion d'alcool présentent des variations assez considérables. Les meilleures levures sont P6 et G1 avec lesquelles nous avons travaillé dans les deux séries qui suivent. Il importe beaucoup de ne pas perdre de vue que ce résultat est intimement lié aux conditions de la température et de la composition chimique du milieu. Comme l'activité des levures dépend surtout de ces deux principales conditions, il est bien probable, qu'en opérant à une température plus basse nous ayons trouvé plus de races de levures capables de produire une fermentation sulfique. Il se peut aussi, que la race de Champagne (W11) qui produit le plus de glycérine (0,87/0) dans les vins (voir notre travail [16]) et qui n'a pas fermenté dans la mélasse sulfitée, puisse être acclimatée à ce nouveau milieu en procédant à un large ensemencement à sa température optimum.

La deuxième série d'expériences faite en été de 1924 présente un perfectionnement important par rapport à la technique employée auparavant. Nous avons préparé d'avance des filtres avec les entonnaires bien enveloppés par une feuille de papier-parchemin et stérilisés ensemble. Le dépôt des levures servant à l'ensemencement recueilli sur le filtre a été ensuite mis dans la mélasse sulfitée avec le filtre. De cette manière nous avons évité l'introduction d'une

quantité variable de mélasse déjà fermentée dans un liquide mis à l'expérience. L'addition des levures sans liquide influe moins sur le volume de mélasse sulfitée, ce qui assure des résultats plus comparables et précis. Nous nous sommes proposés dans cette série d'expériences d'élucider plusieurs questions concernant la production des levures d'ensemencement et de celles de fermentation. Nous avons employé cette fois-ci comme agent de la fermentation la race P 6, une de nos meilleures levures. Les expériences ont été faites ici toujours par deux, pour qu'elles ne diffèrent entre elles que par un seul facteur, voir la table II. L'examen de cette table nous montre que les premières quatre paires se rapportent aux levures d'ensemencement et les onze suivantes — aux levures de fermentation. Les deux premières épreuves devaient nous renseigner s'il est plus avantageux d'employer pour l'ensemencement des levures cultivées durant 48 ou 72 heures à 33° C. Le résultat est en faveur d'une culture plus jeune où il y a un surplus de 0,6 p. c. de glycérine; dans ce cas il faut encore prendre en considération une économie de temps et de chauffage. Cette constatation nous a fait fixer dorénavant l'âge de nos cultures d'ensemencement à 48 h. Les deux expériences suivantes avaient pour but de nous informer quelle température est plus favorable à la culture des levures, celle de 23° ou — de 33° C. Naturellement il faut ne pas oublier que ces levures seront ensuite forcées à fermenter à 33° C. Les quantités de glycérine obtenue se prononcent cette fois-ci très clairement en faveur de la culture faite à la même température que celle de la fermentation, l'avantage est de 2,5 p. c. Ce résultat est bien naturel pour un biologiste, vu la grande sensibilité de tous les êtres vivants à un changement brusque de la température; dans notre cas il est de dix degrés, ce qui est énorme. Ensuite nous avons voulu étudier l'influence de la grandeur d'ensemencement des levures. La troisième expérience double montre qu'il y a un rapport direct entre ces deux valeurs, quoique le gain de glycérine ne soit pas considérable (1, 67 p. c.). La dernière question touchant les levures d'ensemencement a été résolue par la quatrième épreuve. Conformément aux résultats déjà obtenus nous avons cultivé nos levures à 33° C pendant 48 heures: une portion sur la mélasse et une seconde — sur le moût de malt, tous les deux contenant 10 p. c. de sucre. Cette fois-ci nous avons obtenu une parfaite concordance des rendements de la glycérine, ce qui semble prouver que les deux milieux ont satisfait complètement les fonctions vitales des levures. Avant de passer aux questions de la fermentation nous pouvons, en nous basant sur les données obtenues, constater

que les levures P 6, cultivées sur la mélasse (10 p. c. de sucre) 48 heures à 33° C et fermentant ensuite la même mélasse additionnée de sulfite (66 p. c. de sucre), peuvent produire la glycérine en quantité de 10—13 p. c. de sucre. Ceci dit, nous pouvons relater les résultats de la cinquième expérience où une portion avait fermenté 48 heures sur la mélasse bouillie après l'addition de sulfite stérilisé, tandis que la seconde avait fermenté pendant le même temps sur la mélasse sulfitée non bouillie. Nous avons obtenu dans ces conditions un meilleur rendement de la glycérine dans la portion bouillie, où il s'est produit un dépôt abondant, blanc et lourd; vu au microscope ce dépôt présente des concrétions sphériques. La sixième expérience montre une comparaison de deux portions, dont l'une a fermenté à la température de 23° C et l'autre à 33° C. On voit que la différence des résultats n'est pas très prononcée, quoique la quantité de glycérine produite à 33° C soit de 0·7 p. c. plus haute. L'expérience suivante a été faite aussi avec les deux températures, mais la quantité de sulfite y est trois fois plus petite et de plus nous y avons ajouté à la mélasse 2 p. c. de CaCO_3 . On ne doit pas s'étonner que le rendement de glycérine est bas, vu le petit pourcentage de sulfite. On peut dire que ce résultat est peu engageant pour l'emploi de la craie. Nous passons maintenant à la relation d'effet d'une dose plus forte de sulfite. Dans la huitième expérience nous avons ajouté 10 gr. de sulfite en ensemençant une portion de la mélasse d'un double dépôt des levures. La quantité de glycérine produite a augmenté cette fois-ci considérablement; d'ailleurs, l'effet de l'ensemencement plus fort ne se fait pas sentir. La neuvième expérience devait servir d'une répétition de la précédente, nous n'y avons ajouté que 2 p. c. de CaCO_3 ; malheureusement le rendement y est au-dessous même de la norme obtenue pour 6·6 p. c. de sulfite. On peut reconnaître, que la fermentation y avait marché autrement, par le fait que le pourcentage d'alcool y est plus haut que celui de la huitième expérience. L'influence de la plus grande quantité de sucre dans la mélasse a été étudiée dans notre dixième expérience où nous avons ajouté à chacune de deux portions (sulfitées de nouveau avec 6·6 p. c. de sel) 5 p. c. de saccharose après 24 heures de la fermentation. Les portions n'ont pas différé entre elles que par un double ensemencement de la deuxième. L'addition du sucre dans ces conditions ne se fait sentir que par une plus forte production d'alcool, ce qui n'est pas désirable. Pour mieux résoudre cette question nous avons répété dans la suivante expérience l'addition de la même quantité de sucre, mais en employant en même

temps 10 p. c. de sulfite. Encore cette fois-ci le résultat obtenu nous montre que cette addition de sucre n'est pas avantageuse; de fait on obtient moins de glycérine que de 10 p. c. de sucre, voir la huitième expérience. Il est intéressant de déterminer, quel est le maximum de sulfite supporté par nos levures P6; c'est pour pouvoir le préciser que nous avons fait deux expériences suivantes: dans la douzième les levures devaient fermenter en présence de 15 p. c. de sulfite, tandis que dans l'épreuve treizième le pourcentage de sel a été élève jusqu'à 17 p. c. (170 p. c. de sucre). Les résultats de ces deux cas nous montrent clairement, que le sulfite est bien supporté par la race étudiée des levures, mais que le rendement de glycérine baisse à cette concentration du sel au lieu d'augmenter. Cette constatation nous a fait renoncer à l'élévation de la dose de sulfite. Il nous reste encore à relater les deux dernières expériences de cette série: dans la quatorzième nous avons voulu voir l'effet d'une aération continue faite durant toute la fermentation. Une pompe à eau a été réunie avec deux portions communiquant entre elles pour remuer continuellement la mélasse. Malgré que l'air inspiré par la pompe a passé par un tube de verre rempli de coton stérilisé la mélasse a été contaminée par les microbes. Vu que cette infection bactérienne a pu fausser les résultats nous n'avons pas cette fois déterminé la quantité d'alcool. La quinzième expérience devait nous montrer si une addition de l'urée est suivie d'une augmentation de rendement de glycérine. La consultation de la table II. nous fait voir que dans les conditions de notre expérience ce n'est que la teneur en alcool de mélasse qui augmente un peu.

En faisant une récapitulation des données obtenues, nous constatons que la fermentation sulfitique est un processus excessivement délicat où on est maintes fois témoin des perturbations graves dans sa marche régulière sans qu'on puisse préciser leurs causes, voir les expériences: III, V, IX et XII. Ce n'est que l'étude approfondie de cette fermentation qui nous peut en faire le maître et nous préserver à l'avenir de tout hasard. C'est dans cet ordre d'idées que nous avons entrepris la troisième et la dernière série d'expériences. Cette série présente en partie une répétition des questions étudiées dans les séries précédentes, mais nous nous sommes servis cette fois de la race G1 comme d'agent de la fermentation pour voir si les faits observés chez la race P6 ont un caractère plus général. D'autre part nous avons employé pour la fermentation aussi un milieu artificiel avec 1 p. c. de peptone, 0,5 p. c. de K_2HPO_4 et 10 p. c. de saccharose pour assurer à notre travail plus de précision. En somme nous avons fait

vingt trois expériences nouvelles, dont les résultats sont réunis sur les six tables servant chacune à éclairer une certaine question spéciale. Les conditions du milieu, de la température et de la durée de ces expériences étaient les mêmes que celles qui ont été fixées par la deuxième série, c'est-à-dire : nous avons employé une mélasse diluée à 10 p. c. de sucre, ensemencée avec un dépôt filtré des levures pures et qui a fermenté 48 heures à l'étuve à 33° C. La table III nous présente les données de dix essais qui démontrent une fois de plus la spécificité des levures au point de vue de leur résistance à la dose croissante de bisulfite de soude. Il est intéressant de comparer entre elles les races G 1 et P 6 qui ont fermenté deux fois dans la mélasse de 10 et 15 p. c. de sucre additionnée de la même quantité de sulfite. Dans les deux cas c'est la race G 1 qui a produit plus de glycérine, en donnant la même quantité d'alcool, ce qui semble prouver que sa manière de travailler soit plus économique que celle de la race P 6. Ensuite nous pouvons comparer entre elles les races G 1 et G 3 dans deux cas : le premier où elles ont fermenté la mélasse de 10 p. c. de sucre en présence de 6'6 p. c. de sulfite et le second — où la mélasse contenait 15 p. c. de sucre et 10 p. c. de sel. Cette fois-ci le résultat nous apprend que la race G 3 qui a remporté un certain avantage dans le premier cas où les conditions de la fermentation ont été moins difficiles, s'était montrée moins résistante et productive au moment où la concentration de sucre et de sulfite a augmenté. Ajoutons que les trois races réagissent de la même manière à une concentration plus forte de sucre — elles diminuent alors la formation de la glycérine, en augmentant en même temps la production d'alcool. La plus sensible à l'addition de sulfite parmi les cinq races étudiées est la race P 12, laquelle donne la plus faible quantité de glycérine et produit en même temps très peu d'alcool. Nous avons mis à l'expérience encore cette fois les races W 8 et W 11 (de la première série), mais de nouveau elles ont refusé à fermenter.

L'influence de la quantité de bisulfite de soude ajouté au milieu de la fermentation a été étudiée en neuf expériences dont les résultats sont réunis à la table IV. Cette table nous montre que la race G 1 réagit sur les deux milieux : un naturel à 10 et 15 p. c. de sucre et l'autre artificiel à 10 p. c. de la même manière à la proportion croissante de sulfite. On observe dans tous les cas une augmentation du rendement de la glycérine et une diminution correspondant du rendement alcoolique. Dans la deuxième série nous avons déjà observé que l'augmentation de la dose de sulfite n'est pas suivie d'une

augmentation proportionnelle de glycérine; la quantité de cette dernière ne croît que relativement peu. La richesse en sucre fait ressortir cette disproportion encore plus; ainsi à un dédoublement de sulfite (8,3 p. c.) correspond une augmentation de glycérine de 4,5 p. c., voir les expériences N 2 et 16. L'influence défavorable de l'addition de sucre ressort nettement de nos expériences, nous y reviendrons à la suite pendant la discussion de la table VI.

L'influence de la composition chimique du milieu de la fermentation sur la production de la glycérine est fort prononcée. C'est dans la table V que nous avons réuni les résultats des onze expériences qui concernent l'étude de cette question. L'examen de cette table prouve que le milieu artificiel satisfait mieux les exigences vitales de la race G1 que la mélasse. La cause de cette préférence accordée par nos levures au milieu artificiel s'explique peut être par le fait qu'il ne contient que les composés nécessaires à l'activité des levures et en juste proportion, tandis que la mélasse qui est un produit final des maintes opérations chimiques contient un grand surplus de sels, en premier lieu celui de potassium [32, 35]. Cette richesse des sels devient surtout gênante en cas d'une addition à la mélasse encore d'une forte dose de sulfite. Dans ce cas on obtient avec le milieu artificiel un surcroît de glycérine encore plus prononcé (4,2 p. c.). L'action favorable du milieu artificiel devient moins efficace au moment où la concentration de sucre augmente; le rendement n'y est supérieur que de 1 p. c. de glycérine. Si nous comparons l'effet de la mélasse et du moût de malt comme milieu de fermentation, nous constatons que la première donne un meilleur résultat, la quantité de glycérine y est de 3,3 p. c. plus grande que sur le moût.

Passons maintenant à la table VI où sont réunies les données concernant l'influence de la dose du sucre. Ces résultats nous montrent que l'action d'une plus forte concentration de sucre est défavorable; la quantité de glycérine diminue, tandis que celle d'alcool augmente. Cet effet modérant la production de la glycérine se fait sentir surtout sur le milieu artificiel, où nous avons constaté une baisse de 52 p. c. de glycérine, tandis que sur la mélasse cette diminution n'est que de 2,3 p. c. dans les mêmes conditions. Quant à l'augmentation du rendement d'alcool elle est égale à 1,7 p. c. sur la mélasse et à 2,0 p. c. sur le milieu artificiel. Ces expériences nous font constater que la race G 1 travaille plus économiquement et donne un meilleur rendement de glycérine avec 10 p. c. de sucre dans le milieu de fermentation; le sucre ajouté au-dessus de ce pourcentage est presque entièrement transformé en alcool.

Il est connu que plusieurs sels peuvent être considérés comme des excitants, qui stimulent le pouvoir fermentatif des levures à doses modérées et qui sont pour elles toxiques à doses un peu élevées, voir: E. Kayser [10] et F. Lafar [14]. Dans cet ordre d'idées nous avons fait trois expériences avec l'addition de $\frac{1}{10'000}$ Mol. de CuSO_4 , ZnSO_4 et MnSO_4 au milieu artificiel, qui nous a donné les meilleurs résultats. C'est dans la table VII que nous avons réuni ces données, qui ne sont pas d'ailleurs bien encourageantes. Nous voyons que dans tous les cas la quantité de glycérine a plus ou moins diminué. Relativement le meilleur résultat est obtenu avec le sulfate de Zn, parce que le rendement n'y a diminué que de 1'1 p. c., tandis que les essais faits avec les sulfates de Mn et de Cu donnent une baisse respectivement de 2'1 p. c. et de 3'2 p. c. Il est bien possible que le mauvais résultat ait été causé par la dose trop grande des sels et que sa diminution eût pu occasionner un effet excitant le pouvoir fermentatif des levures. Malheureusement nous n'avons pu répéter ces expériences en les changeant dans le sens indiqué. Il ne nous reste que de donner une relation de la troisième série d'expériences composée de trois essais présentés dans la table III. Nous y sommes revenus à la question de l'influence de l'état physiologique des levures d'ensemencement, question qui a déjà été traitée dans la deuxième série. Cette fois-ci dans nos trois expériences nous avons voulu par la différence du milieu de culture provoquer un changement de l'activité vitale des levures et de cette manière intervenir dans la production ultérieure de glycérine. Certes les levures le mieux nourries seront plus fortes, ce qui influencera à son tour leur pouvoir fermentatif et le rendement de la glycérine deviendra plus considérable. Les résultats obtenus parlent en faveur du moût de malt comme un excellent milieu de culture, tandis que comparativement la mélasse a donné le plus faible rendement de glycérine; la différence y est énorme, elle est égale à 6'6 p. c. de glycérine. L'expérience N 6 où un ensemencement a été fait avec un dépôt des levures de mélasse et un second — des levures de moût de malt par son résultat prend la place entre les deux précédents, ce qui est bien expressif et en donne plus de valeur. Il est intéressant de souligner que l'influence bienfaisante du milieu de culture ne se fait sentir que par la richesse croissante de glycérine. De fait, nous voyons que la quantité d'alcool produite dans les trois essais reste sensiblement la même. Cette constatation est bien compréhensible, vu la grande complication de la fermentation en présence du bisulfite, ce qui nécessite une spécificité fermentative poussée bien loin. Rappelons,

que dans le deuxième série (expérience IV) nous avons obtenu le même rendement de la glycérine avec la mélasse et le moût de malt, mais là c'est la race P 6 qui a fermenté et les conditions d'expérience y ont été plus favorables avec 6.6 p. c. de sulfite et 10 p. c. de sucre. La pleine vigueur vitale des levures ne se fait sentir qu'au moment où les conditions de la fermentation deviennent plus difficiles comme c'était le cas dans les expériences citées de la troisième série.

Il nous reste encore à dire un mot de quelques expériences où suivant les données de W. Connstein [5], C. Neuberg [22.24], J. Eoff [6] et A. Ling [15] nous avons obtenu l'alcalinité du milieu au moyen de l'addition de Na_2CO_3 et Na_2HPO_4 . Le maximum du rendement obtenu dans ces conditions a été de 8 p. c. de glycérine, tandis qu'avec l'addition du bisulfite c'était le minimum produit par les mêmes levures de la même quantité de sucre (10 p. c.). Probablement la fermentation alcoolique s'opère alors suivant son troisième mode établi par C. Neuberg [25], on a là une formation d'alcool, de glycérine et d'acide acétique. Pour finir avec nos propres expériences relatons encore un essai fait suivant l'intéressant principe exposé par A. Koch [12]. Nous avons employé pour cette fermentation le même milieu artificiel qui nous a déjà donné de bons résultats dans la troisième série, mais cette fois-ci il était additionné de 40 p. c. de sucre. Une installation appropriée nous a permis d'opérer durant la fermentation (72 heures) une distillation de l'alcool formé à la pression diminuée. Par cet artifice ingénieux on évite son accumulation et la fermentation peut être poussée bien loin en donnant lieu à un enrichissement progressif de glycérine. Notre race G 1 a bien travaillé dans ces conditions, elle a produit beaucoup d'alcool et une quantité assez considérable de glycérine. Nous mentionnons cet essai pour réunir dans notre travail les essais concernant les trois modes de la fermentation alcoolique. Tous, ils peuvent donner lieu à une production assez abondante de la glycérine. Le procédé de A. Koch présente plusieurs avantages pour la technique, à savoir: il est simple, il épargne les frais d'addition des sels et de production de grandes quantités de levures pour l'ensemencement; de plus, comme la fermentation s'y opère dans un milieu légèrement acide, on peut travailler avec les milieux simplement pasteurisés, ce qui présente une considérable économie des frais du chauffage.

Passons maintenant à la discussion de nos résultats, en les comparant en même temps aux données des autres auteurs. Comme le but de notre étude ne fut qu'étudier les conditions biologiques

de la production de la glycérine par la méthode fermentative, nous avons fixé notre attention à la précision des expériences, en laissant de côté les soins pour obtenir le rendement maxima de glycérine. Dans cet ordre d'idées nous avons toujours travaillé avec des cultures pures de levures et la fermentation se passait en pleine stérilité contrôlée au microscope. C'est justement l'observation de ces conditions qui nous a obligé de renoncer à un ensemencement de 10 p. c. de volume du liquide employé par les autres. Pour la même raison nous avons raccourci la durée de la fermentation à 48 heures, car c'est le temps pendant lequel se forme le gros de glycérine. C'est ce qui explique sans doute le fait constaté par nous que le rendement de la glycérine dans nos expériences était plus faible que celui noté par les autres auteurs. D'ailleurs la spécificité des levures démontrée par nos expériences laisse espérer qu'en poursuivant les recherches on parviendra à trouver une race de levures qui sera plus tolérante au sulfite et qui donnera un rendement supérieur de glycérine. Nous avons constaté d'accord avec W. Connstein et C. Neuberger que l'influence du bisulfite de soude sur le rendement de glycérine est en raison directe de la quantité ajoutée. De même il y a une coïncidence de nos résultats avec ceux des auteurs cités, notamment en ce qui concerne l'influence défavorable de la teneur trop grande de sucre, la dose de 10 pour cent étant optimale. Par contre, nous n'avons pu confirmer les données de W. Connstein que les levures puissent opérer huit fermentations de suite avec un bon rendement; car dans nos expériences les levures même quelque peu âgées ont déjà travaillé moins bien.

Comme on voit d'après nos expériences le rendement de la glycérine varie non seulement avec l'espèce des levures, mais dépend aussi de la composition du milieu de culture, de l'âge des levures, de la concentration du sucre et du bisulfite dans le milieu de la fermentation et d'autres conditions. Ceci posé, on voit que le sujet est bien vaste et que nos expériences n'ont qu'effleuré la question. Ajoutons que justement cette complication des conditions réglant la marche régulière de cette fermentation en milieu alcalin permet de prévoir qu'elle peut être poussée plus loin par l'accoutumance des levures au bisulfite de soude ou activée par l'addition des anti-septiques.

Conclusions.

1^o Le rendement de glycérine varie avec l'espèce et même avec la race de levures.

2° Un bon état physiologique des levures est indispensable pour l'obtention d'un bon rendement de glycérine.

3° L'âge des levures influe sur la production de glycérine, il faut opérer de préférence avec des cultures jeunes.

4° La quantité de glycérine produite est en relation avec la composition du milieu de fermentation.

5° La température de 32° C convient bien à la fermentation sulfifique.

6° La teneur élevée en sucre du milieu de fermentation n'est pas favorable, le 10 p. c. donne les meilleurs résultats.

7° L'addition d'une dose croissante de bisulfite de soude jusqu'à 10 p. c. est suivie d'une augmentation du rendement de glycérine.

8° La circulation d'air gêne la fermentation et diminue la quantité produite de glycérine.

9° L'addition de 10 p. c. de bisulfite de soude au milieu de fermentation ne donne pas des garanties contre une contamination bactérienne.

Bibliographie

1. Beythien, A. Handbuch der Nahrungsmitteluntersuchung. Vol. I (1914) p. 680.
2. Boas, Fr., Langkammerer, H. et Leberle, H. IV Mit. Biochem. Zeitschr. Vol. 105 (1920) p. 199.
3. Braun, K. Chem.-Zeitung. Vol. 29 (1905) p. 763.
4. Cohen, Cl. Biochem. Zeitschr. Vol. 112 (1920) p. 139.
5. Connstein, W. et Lüdecke, K. Naturwissenschaften Vol. 6 (1919) p. 403.
6. Eoff, J. R., Linder, W. V. et Beyer, G. F. Journ. Ind. and Engin. Chem. Vol. 11 (1919) p. 842 référé Zeitschr. f. techn. Biol. Vol. 9 (1921) p. 162.
7. Euler, v. H. et Svanberg, O. Arkiv for Kemi. Vol. 7. (1918) référé Zeitschr. f. techn. Biol. Vol. 8 (1920) p. 111.
8. Fleischer, K. Zeitschr. f. anal. Chemie. Vol. 60 (1921) p. 330.
9. Hehner, O. Journal of the Society of Chem. Industry. Vol. 8 No 1.
10. Kayser, E. Microbiologie appliquée à la transformation des produits agricoles. Paris 1921.
11. Kerp, H. Chem.-Zeitung. Vol. 31 (1907) p. 1059.
12. Koch, Al. Verfahren zur Gewinnung von Glyzerin. D. R. P. référé Zeitschr. f. techn. Biol. Vol. 10 (1920) p. 240.
13. Laborde, J. Revue de Viticulture. Vol. 28 (1907) p. 301.
14. Lafar, F. Handbuch der Technischen Mykologie. Vol 4 et 5 (1905—1914).
15. Ling, Art. R. Journ. Soc. Chem. Ind. Vol. 38 p. 175. référé Zeitschr. f. techn. Biol. Vol. 10. (1920) p. 240.
16. Lipska, J. Acta Soc. Botan. Pol. Vol. 2 (1924) p. 161.
17. Lüers, H. Zeitschr. f. techn. Biol. Vol. 7 (1919) p. 186.
18. Martinand, V. Comptes rend. de l'Ac. Paris. Vol. 149 (1909) p. 465.

19. Müller-Thurgau, H. Landw. Jahrbücher. Vol. 17 (1888) p. 83.
 20. Müller-Thurgau, H. Jahresber. d. Versuchsanstalt f. Obst-, Wein- u. Gartenbau in Wädenswil. 1901 p. 73.
 21. Müller-Thurgau, H. Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Vol. 17 (1907) p. 11.
 22. Neuberg, C. et Rheifurth, E. Bioch. Zeitschr. Vol. 89 (1918) p. 365.
Neuberg, C. et Reinfurth, E. idem. Vol. 92 (1918) p. 234.
 23. Neuberg, C. et Nord, F. idem. Vol. 96 (1919) p. 133 et p. 158.
 24. Neuberg, C. et Hirsch, J. idem. Vol. 96 (1919) p. 175.
Neuberg, C. et Hirsch, J. idem. Vol. 98 (1919) p. 141.
 25. Neuberg, C. et Hirsch, J. Biochem. Zeitschr. Vol. 100 (1919) p. 304.
 26. Neuberg, C., Hirsch, J. et Reinfurth, E. idem. Vol. 105 (1920) p. 307.
 27. Neuberg, C. et Reinfurth E. idem. Vol. 106 (1920) p. 281.
 28. Neuberg, C., Nord, F. et Wolff, E. idem. Vol. 112 (1920) p. 144.
 29. Neuberg, C. et Arinstein, B. idem. Vol. 117 (1921) p. 269.
 30. Neuberg, C. et Cohen, Cl. idem. Vol. 122 (1921) p. 204.
 31. Reisch, R. Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Vol. 18 (1907) p. 396.
 32. Schweizer, K. Helv. chim. Acta. Vol. 2. p. 167. référé Zeitschr. f. techn. Biol. Vol. 8 (1920) p. 81.
 33. Seifert, W. Zeitschr. f. d. landwirtsch. Versuchswesen in Oesterreich. Vol. 9 (1906) p. 1019.
 34. Törring, v. H. Landw. Versuchsstat. Vol. 36 p. 29.
 35. Verband landwirtsch. Versuchstat. im Deutschen Reiche. Die Futtermittel des Handels. Berlin 1906.
 36. Zeisel, S. et Fanto, R. Zeitschr. f. anal. Chem. Vol. 42 (1903) p. 549.
-

Table I.

No	Races	Durée	Tempé- rature	Milieu de ferment.	Alcool ‰ vol.	Glycérine ‰ de sucre	No	Races	Alcool ‰ vol.	Glycérine ‰ de sucre
1	P 1	72 h.	30° C	Mélasse	6.16	4.8	11	G 1	6.09	8.7
2	P 2	"	"	10 % de	4.07	7.7	12	G 2	5.93	7.0
3	P 3	"	"	sucre +	5.44	7.0	13	G 3	7.18	3.7
4	P 4	"	"	2 % de	5.30	7.5	14	G 4	6.80	3.0
5	P 5	"	"	Na ₂ SO ₃	4.27	7.6	15	G 5	6.00	5.8
6	P 6	"	"	"	4.65	8.8	16	G 6	6.10	6.3
7	P 7	"	"	"	3.64	6.5	17	G 7	6.16	3.9
8	P 8	"	"	"	4.88	6.4	18	G 8	6.63	4.6
9	P 9	"	"	"	3.90	7.8	19	W 1	5.05	8.0
10	P 10	"	"	"	4.14	8.1	20	W 2	5.48	6.6

Table III.

No	Races	Saccharose	Na ₂ SO ₃	Glycérine ‰ de sucre	Alcool ‰ vol.
1	P 6	10 ⁰ / ₀	6.6 ⁰ / ₀	10.65	3.07
2	G 1	"	"	12.12	3.00
12	P 12	"	8.0 ⁰ / ₀	9.61	1.75
14	G 1	"	"	13.03	2.86
5	W 6	"	"	13.42	2.44
11	G 3	"	"	13.90	2.69
3	P 6	15 ⁰ / ₀	"	9.27	3.85
4	G 1	"	"	12.05	3.87
22	G 3	"	10 ⁰ / ₀	11.72	4.12
6	G 1	"	"	12.35	3.95

Table II

No	Durée		Température		Milieu		Alcool % vol.	Glycérine % de sucre	No	Durée de cult. et ferm.	Température de cult. et ferm.	Milieu de culture et ferment	Alcool % vol.	Glycérine % de sucre
	de culture	de ferment	de culture	de ferment.	de culture	de ferment.								
1	48 h.	72 h.	33° C	33° C	Moût de malt 10% de s.	Mélasse 10% de sucre +	3·35	13·1	9	48 h	33° C	1 portion	10% sulf.	6·38
	72 h.	"	"	"	"	"	3·64	12·5	"	"	"	2 portions	+ 2% CaCO ₃	5·74
2	48 h.	72 h.	33° C	33° C	"	6,6% de Na ₂ SO ₃	3·71	12·90	10	"	"	1 portion	6,6% sulf.	6·87
	"	"	23° C	"	"	"	3·28	10·39	"	"	"	2 portions	+ 5% sucre	7·20
3	48 h.	72 h.	33° C	33° C	1 portion	"	4·51	5·31	11	"	"	1 portion	10% sulf.	4·52
	"	"	"	"	2 portions	"	4·76	6·98	"	"	"	2 portions	+ 5% sucre	4·88
4	48 h.	48 h.	33° C	33° C	Mélasse	"	3·85	11·02	12	"	"	1 portion	15% sulf.	7·40
	"	"	"	"	Moût	"	3·64	11·00	"	"	"	"	"	7·30
5	48 h.	48 h.	33° C	33° C	Moût	Mélasse bouillie Mél. non b.	3·49	11·50	13	"	"	"	17% ₀	1·80
	"	"	"	"	"	"	5·33	7·42	"	"	"	"	"	1·41
6	"	"	33° C	23° C	Moût	Mélasse	4·36	8·00	14	"	"	1 portion	10% ₀	8·65
	"	"	"	33° C	"	"	4·14	8·74	"	"	"	2 portions	"	9·05
7	"	"	"	23° C	"	Mélasse + 2,2% ₀ sulf + 2,0% ₀ CaCO ₃	5·06	4·5 /	15	"	"	1 portion	6,6% sulf.	4·36
	"	"	"	33° C	"	"	4·58	5·00	"	"	"	"	+ 0·5% urée	4·80
8	"	"	"	33° C	1 portion	Mélasse	2·16	16·50	"	"	"	"	"	7·50
	"	"	"	"	2 portions	+ 10% ₀ sulf.	2·24	16·45	"	"	"	"	"	"

Table IV.

No	Milieu	Saccharose	Na ₂ SO ₃	Glycérine ‰ de sucre	Alcool ‰ vol.
2	Mélasse	10 ⁰ / ₀	6·6 ⁰ / ₀	12·12	3·00
14	"	"	8·0	13·03	2·86
13	"	"	10·0	14·63	2·23
16	"	"	15·0	16·61	1·88
10	Artificiel	"	6·6 ⁰ / ₀	14·94	2·86
15	"	"	10·0	18·50	2·58
20	"	"	15·0	20·40	1·75
4	Mélasse	15 ⁰ / ₀	8·0	12·05	3·87
6	"	"	10·0	12·35	3·95

Table V.

No	Milieu	Saccharose	Na ₂ SO ₃	Glycérine ‰ de sucre	Alcool ‰ vol.
2	Mélasse	10 ⁰ / ₀	6·6 ⁰ / ₀	12·12	3·00
10	Artificiel	"	"	14·94	2·86
13	Mélasse	"	10	14·63	2·23
15	Artificiel	"	"	18·50	2·58
16	Mélasse	"	15	16·61	1·88
20	Artificiel	"	"	20·40	1·75
23	" + 0,5 ⁰ / ₀ pept.	"	"	17·90	2·10
6	Melasse	15 ⁰ / ₀	10 ⁰ / ₀	12·35	3·95
21	Artificiel	"	"	13·33	4·51
4	Mélasse	"	8	12·05	3·87
9	Moût demalt.	"	"	8·77	4·88

Table VII.

No	Milieu	Saccharose	Na ₂ SO ₃	Glycérine ‰ de sucre	Alcool ‰ vol.
10	Artificiel	10 ⁰ / ₀	6·6 ⁰ / ₀	14·94	2·86
17	" + $\frac{1}{10.000}$ Mol. CuS O ₄	"	"	11·72	3·00
18	" + $\frac{1}{10.000}$ Mol. Zn SO ₄	"	"	13·84	3·00
19	" + $\frac{1}{10.000}$ Mol. Mn SO ₄	"	"	12·86	3·07

Table VI.

No	Milieu	Saccharose	Na ₂ SO ₃	Glycérine 0/0 de sucre	Alcool 0/0 vol.
14	Mélasse	10 ⁰ / ₀	8 ⁰ / ₀	13·03	2·86
4	"	15	"	12·05	3·87
13	"	10 ⁰ / ₀	10	14·63	2·23
6	"	15	"	12·35	3·95
15	Artificiel	10	10	18·50	2·58
21	"	15	"	13·33	4·51

Table VIII.

No	Milieu de culture	Saccharose	Na ₂ SO ₃	Glycérine 0/0 de sucre	Alcool 0/0 vol.
7	2 Moût de malt.	15 ⁰ / ₀	10 ⁰ / ₀	14·81	4·14
6	1 Mél. + 1 Moût			12·35	3·95
8	2 Mélasses			8·25	3·97

Institut National Scientifique d'Agriculture Bydgoszcz.

(Wpłynęło do redakcji 20 marca 1925 r.).