

Georgia Institute of Technology ILL

ILLiad TN: 397807



**Borrower:** BRL

**Lending String:** \*GAT,EEM,LHL

**Patron:**

**Journal Title:** Industries alimentaires et agricoles.

**Volume:** 105 **Issue:**  
**Month/Year:** 1988**Pages:** 675-688

**Article Author:** Miniac M.

**Article Title:** Conduite des ateliers de  
fermentation alcoolique de produits sucriers  
melasses et egouts

**Imprint:** Paris, Association des anciens élèves de  
l'École nationale supérieure des industries  
agricoles et alimentaires, Association des  
chimistes, ingénieurs et cadres des industries  
agricoles et alimentaires, Commission  
internationale des industries agricoles.

**ILL Number:** 183885193



**Call #:** 50671006453093 ,  
50671006453101

**Location:** LSC

**ODYSSEY ENABLED**

**Charge**  
**Maxcost:** 16.00IFM

**Shipping Address:**  
INTERLIBRARY LOAN  
BOSTON PUBLIC LIBRARY  
700 BOYLSTON ST.  
BOSTON, Massachusetts 02116  
United States

**Fax:**  
**Ariel:**  
**Email:**

# CONDUITE DES ATELIERS DE FERMENTATION ALCOOLIQUE DE PRODUITS SUCRIERS (MELASSES ET EGOUTS)

par Michel de MINIAC\*

## I - DESCRIPTION DES CIRCUITS ET PERFORMANCES TECHNOLOGIQUES CONSTATEES

- 1) Procédé par cuve-mère ..... **Figure 1**
- 2) Procédé par reprise de levure ..... **Figure 2**
- 3) Continu et discontinu ..... **Figures 3 et 4**

## II - OPTIMISATION DES PRINCIPAUX PARAMETRES

### 1) Constitution des moûts

- a) Nature du produit utilisé,
- b) Origine de l'eau utilisée,
- c) Adjonction d'acide,
- d) Sels nutritifs,
- e) Antiseptiques,
- f) Antimousses,
- g) Mise en œuvre industrielle.

### 2) L'acidité du moût

- a) Action de l'acidité ..... **Figure 5**
- b) Recherche d'une valeur optimale de l'acidité ..... **Figure 6**
- c) Choix de l'acidité, de préférence au pH, pour la conduite d'une fermentation.

### 3) Le taux de non-sucre

- a) Pureté du produit utilisé,
- b) Recyclage du non-sucre par les vinasses.

### 4) Conditions de coulage et degré alcoolique souhaité ..... **Figure 7**

### 5) Aération

- a) Action de l'air sur la levure,

- b) Mise en œuvre de l'aération.

## 6) Reprise des levures = lavage et traitement acide

- a) Description du procédé ..... **Figure 8**
- b) Conditions d'un bon fonctionnement ..... **Figure 9**

## III - ORIGINE ET PREVENTION DES ACCIDENTS DE FERMENTATION

### 1) Contamination bactérienne

- a) Origines de la contamination,
- b) Lutte contre l'infection bactérienne ..... **Figure 10, 11 et 12**

### 2) Contamination levurienne

- a) Rappel du métabolisme des levures : Brettanomyces,
- b) Comment empêcher le développement des Brettanomyces.

### 3) Toxicités chimiques diverses

- a) Le sulfite,
- b) Les nitrites,
- c) Les acides organiques,
- d) Additifs divers en sucrerie.

## IV - CONCLUSION GENERALE ET PROSPECTIVE DE RECHERCHE

### 1) Conception des installations

### 2) Optimisation de certains paramètres

- a) L'acidité du moût,
- b) Utilisation d'un antiseptique,
- c) L'aération,
- d) Utilisation d'antimousses,
- e) Conditions de coulage.

Depuis 1984, quatre publications ont été faites dans cette revue, parfois en collaboration avec des industriels ou des Instituts de Recherche, afin de déterminer, dans quelles conditions, il est possible d'améliorer le fonctionnement de l'atelier de fermentation alcoolique des mélasses. Ces travaux sont référencés à la fin de cet exposé.

Nous avons pensé, cependant, être utile à la profession, en faisant ici une synthèse, soit des observations et mesures effectuées sur les sites, soit des essais de laboratoire auxquels elles ont donné lieu, afin de conseiller utilement l'industrie sucrière qui souhaite dans un proche avenir développer la production d'éthanol.

Dans un premier temps, seront décrites succinctement les grandes lignes des circuits fermentaires observés actuellement en France, et l'on pourra comparer leurs performances, leurs avantages et inconvénients.

Dans un deuxième temps, seront passés en revue les paramètres-clés mis en œuvre, quel que soit le procédé utilisé, afin de souligner leur action, leur importance et les valeurs optimales nécessaires au bon fonctionnement de la fermentation.

Nous verrons enfin, les principales causes d'accidents de fermentation en essayant de donner des consignes précises pour les prévenir, tant au niveau de la conception des circuits que de leur conduite.

\* Chargé de recherche à l'Union Nationale des Groupements de Distillateurs d'Alcool.

## I. DESCRIPTION DES CIRCUITS ET PERFORMANCES TECHNOLOGIQUES CONSTATEES

L'ensemble des cuveries de fermentation de mélasse observées en France peut se classer en deux groupes, selon la nature du procédé utilisé : cuve-mère ou reprise de levure.

Dans le **premier cas**, la levure est générée en permanence à partir d'un fermenteur alimenté en moût et **aéré**. Après fermentation, la biomasse de levure est détruite en distillation et se retrouve dans les vinasses.

Dans le **second cas**, la levure est concentrée sous forme d'une crème, avant distillation, et constitue la source de biomasse, qui est remise en fermentation après lavage et traitement acide.

Ces deux procédés seront décrits **en discontinu** puis **en continu multi-étagé**. Un tableau comparatif des performances, avantages et inconvénients pourra alors être dressé.

### 1) Procédé par cuve-mère. (Figure n° 1)

Il consiste à développer en permanence, à partir d'un moût peu chargé en sucre, la biomasse de levure qui sera ensuite utilisée pour la fermentation proprement dite et **non réutilisée ensuite**. Le moût est de deux sortes, selon qu'il alimente la cuve-mère (moût faible) ou la cuve de fermentation (moût fort).

— **La cuve-mère** : souvent constituée de plusieurs cuves, qui sont en mesure de produire, en 10 heures de temps de séjour, 30 à 50 % du volume des cuves de fermentation.

Dans les cuves-mères il y a **simultanément, production de biomasse de levure à partir d'un moût**, et fermentation de ce moût avec un bilan fermentaire aussi correct qu'en fermentation proprement dite. Le moût faible qui alimente ces cuves est peu chargé en sucre (70 g/l), de sorte qu'il ne peut donner un vin supérieur à 4° GL. Les **cuves-mères sont toujours aérées**. Le milieu fermenté qu'elles produisent, constituera la biomasse de levure qui sera envoyée en cuve de fermentation sous la dénomination de « pied de cuve ».

Comme il a été dit plus haut, il devra occuper 30 à 50 % du volume de la cuve de fermentation.

Cette charge en biomasse initiale est de l'ordre 60.10<sup>6</sup> germes/ml ou de 3 à 4 g/l de levure exprimée en matière sèche.

L'ensemble de la fermentation se déroule à 33°C.

— **La cuve de fermentation** : de volume généralement plus grand que les cuves-mères, les cuves de fermentation **ne sont jamais aérées**. Nous verrons plus loin, qu'il est cependant souhaita-

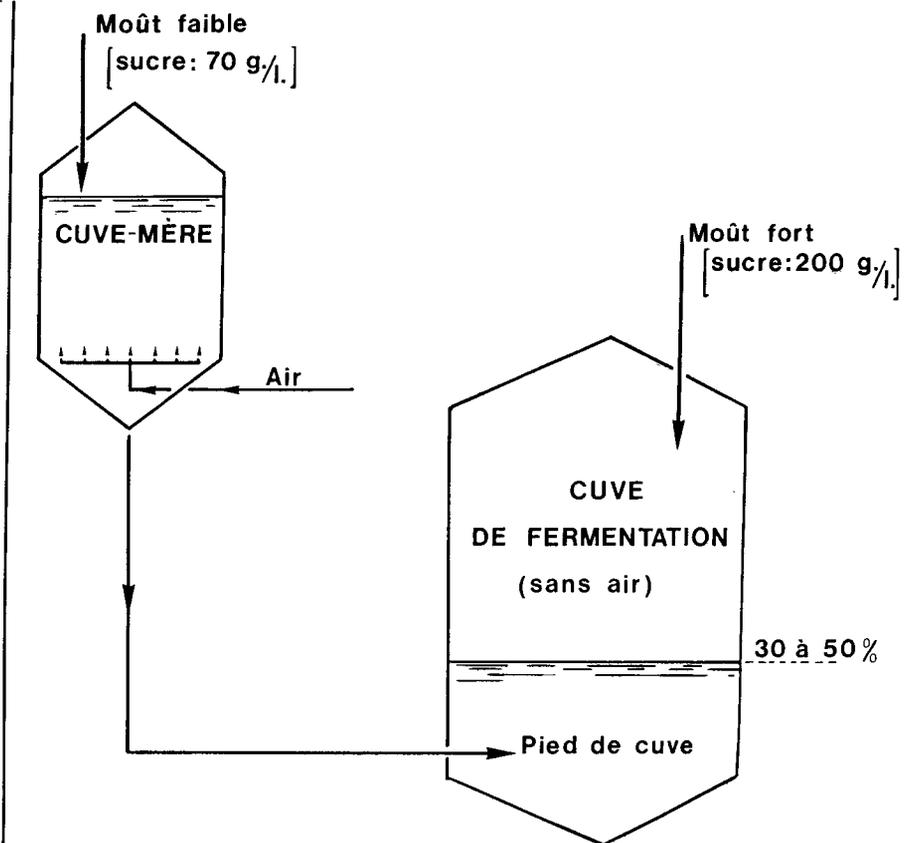


Figure 1 : Procédé de fermentation par cuve-mère (discontinu).

ble de le faire, sans risque pour le bilan fermentaire comme le craignent certains. Ces cuves reçoivent donc, à intervalles réguliers, un « pied de cuve » issu des cuves-mères. Les 50 à 70 % du volume non occupé sont donc lentement remplis par du moût plus riche en sucre ( $\approx 200$  g/l) appelé « moût fort ». Ce remplissage progressif est appelé « coulage ». Il se fait en général avec un moût plus froid ( $\approx 15^\circ\text{C}$ ) de manière à absorber les calories issues de la fermentation qui maintiendront le mélange aux environs de  $33^\circ\text{C}$  durant toute la fermentation. Un dispositif de refroidissement (échangeurs ou écoulement d'eau sur les parois) est néanmoins mis en place.

Ce coulage du moût qui remplira la cuve se fait en 10 à 15 heures. Lorsque la cuve sera pleine, la fermentation sera achevée aux 3/4 (6 à 7° GL). Les derniers degrés se feront lentement durant une dizaine d'heures, période habituellement appelée « chute » car elle est suivie par des mesures de densités qui baissent du fait de la transformation du sucre en alcool. Le temps total de fermentation à partir du « pied de cuve » se situe donc aux environs de 25 heures, pour un vin à 8,3° GL issu d'un moût total de 14 % de sucre. Pour compenser la faible charge du moût faible, le moût, dit « fort », coulé en cuve de fermentation devra donc titrer aux environs de 200 g/l de sucre, selon le volume occupé par le « pied de cuve ».

Durant le coulage, pour des raisons que

nous verrons plus loin, la biomasse varie peu, surtout en absence d'aération.

Bien qu'ayant une faible productivité, ce procédé est encore utilisé souvent en continu. Il a l'**avantage d'être relativement régulier** dans la mesure où la production de levure par les cuves-mères reste stable. Celles-ci constituent ainsi le **cœur** du procédé et **doivent être surveillées avec la plus grande attention** (coulage correct, absence de contamination bactérienne).

### 2) Procédé par reprise de levure. (Figure n° 2)

Le « pied de cuve » est ici constitué uniquement par la crème de levure obtenue par centrifugation du vin **avant** distillation. Pour des raisons que nous verrons plus loin, la levure est lavée, traitée à l'acide puis régénérée dans une petite cuve en présence de moût et d'air. Cette cuve de régénération produit, après 3 heures de temps de séjour, un « pied de cuve » d'un volume moindre que dans le procédé par cuve-mère, mais beaucoup plus riche en biomasse de levure : de l'ordre de 3 fois plus. Malheureusement, la productivité n'est pas augmentée dans les mêmes proportions puisque pour 8,3° GL le temps de fermentation descend aux environs de 15 heures (au lieu de 25). Là aussi, il n'y a pas d'air en cuve de fermentation et les conditions de coulage et de température sont identiques.

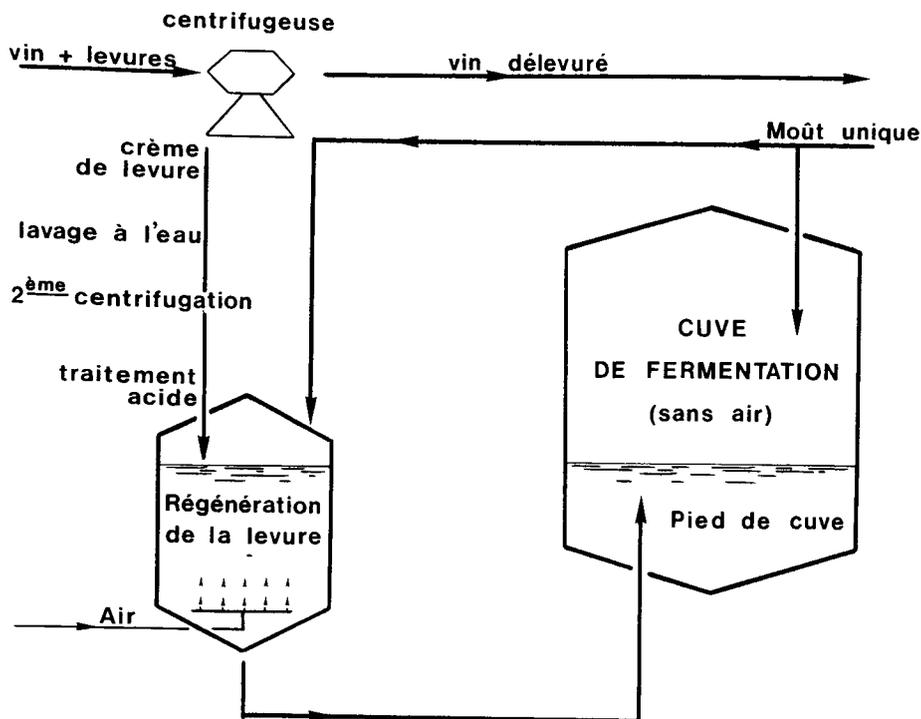


Figure 2 : Procédé de fermentation par reprise de levure (discontinu).

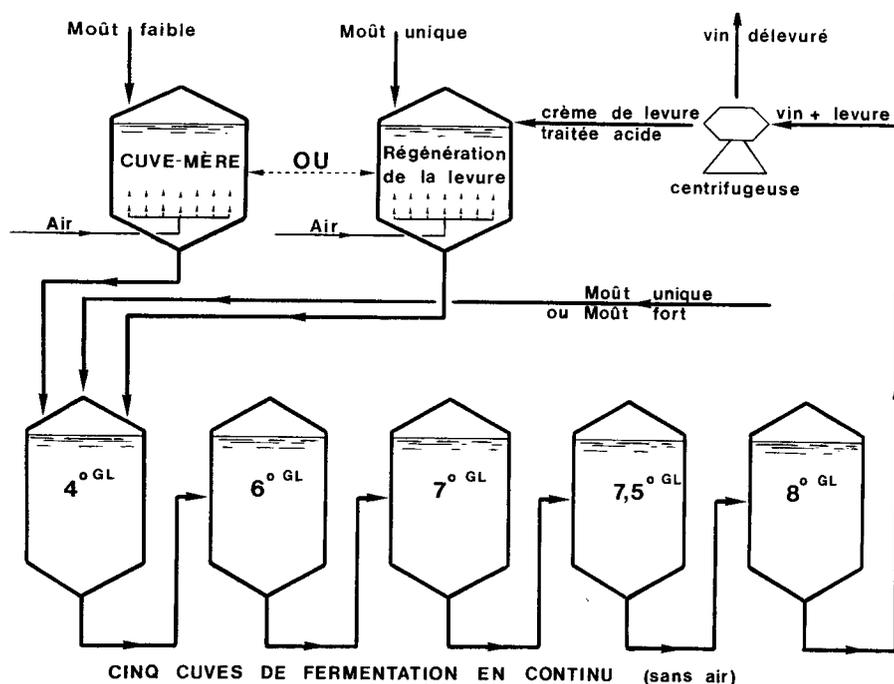


Figure 3 : Fermentation continue multi-étagée (cuve-mère ou reprise de levure).

Ce procédé a l'avantage de multiplier par 1,7 à 2 la productivité de la cuverie, mais le procédé de lavage et de traitement des levures est souvent une source d'ennuis s'il n'est pas très bien conduit. Nous verrons dans un prochain paragraphe comment en optimiser les paramètres.

### 3) Continu et discontinu

Pour plus de clarté, nous venons d'ex-

poser deux procédés de fermentation mis en œuvre en discontinu. Il va de soi que la fermentation continue peut être appliquée dans les deux cas. La Figure n° 3 donne un aperçu d'une fermentation continue multi-étagée. Cinq cuves de fermentation (parfois plus), sont mises en série. La première cuve est alimentée par la biomasse de levure et le moût. La levure peut alors provenir soit d'une ou plusieurs cuves-mères,

soit d'une cuve de régénération de crème de levure dans le cas de reprise de levure. Pour des cuves de dimensions identiques le degré alcoolique s'échelonne donc entre 4° et 8° GL, de la première à la dernière cuve. Les temps de fermentation sont à peu près identiques à ceux observés en discontinu.

Les deux avantages de la fermentation continue sont :

- La facilité de conduite, puisque toutes les manœuvres de remplissage et de vidange des cuves sont éliminées. Ceci implique bien sûr une plus grande facilité d'automatisation éventuelle.

- Une meilleure et complète utilisation des volumes puisque toutes les cuves sont pleines et non en remplissage comme c'est le cas en discontinu (volumes vides estimés à 20 %).

L'inconvénient majeur, et souvent redouté, de la fermentation continue, reste le risque d'infection bactérienne et de dépôts dans des cuves qui ne sont jamais vidées et nettoyées.

Il existe un cas particulier de fermentation continue avec reprise de levure. Il s'agit du procédé BIOSTIL commercialisé par la Société ALFA-LAVAL.

Il n'y a pas ici multi-étage, mais un seul fermenteur, et de plus, la levure est recyclée sans traitement ni lavage. Pour des raisons de croissance de la levure, le degré alcoolique ne peut, dans ces conditions dépasser 5 à 6° GL. Le procédé est, par contre orienté sur une augmentation de la matière sèche non-sucre en fermentation par un recyclage intensif des vinasses (12 %). Le temps de fermentation est très court : 6 heures, ce qui donne une productivité élevée.

Pour conclure ce chapitre, voici, en Figure n° 4 un tableau comparatif qui récapitule l'ensemble des procédés décrits ainsi que les avantages et inconvénients de chacun d'eux.

## II. OPTIMISATION DES PRINCIPAUX PARAMETRES

La réalisation d'une fermentation alcoolique nécessite d'abord une bonne croissance de la levure, puis le maintien en activité de cette biomasse jusqu'à la fin de la fermentation et même au-delà si l'on envisage de recycler cette levure pour des fermentations ultérieures.

La croissance de la levure dépend d'abord de la constitution du moût puis de sa mise en œuvre, c'est-à-dire du coulage ; la concentration en sucre et en non-sucre agiront également fortement sur le comportement de la levure. Il devra être acidifié, afin de protéger la fermentation contre la contamination bactérienne. Enfin, le procédé de reprise de levure avec lavage et traitement acide qui doit être conduit dans

Procédés	Productivité d'Ethanol g/l/h	Avantages	Inconvénients
Cuve-mère	2,6	- Régularité - Moins sensible à l'infection bactérienne	Faible productivité
Reprise de levure	4,4	- Forte productivité	Risque de contamination bactérienne. Parfois irrégulier.
Continu		- Utilisation des volumes à 100 % - Conduite facile - Automatisation facile - Possibilité d'un <b>bon gradient de sucre</b> en multi-étage : favorable à la croissance des levures.	Risque de contamination bactérienne. Risque de dépôts. Cuves jamais nettoyées
Discontinu		- Nettoyage des cuves - Lutte contre contamination bactérienne	Conduite demande plus de main-d'œuvres 20 % du volume de cuverie en remplissage (non utilisé)
Biostil (Alfa-Laval)	7,2	- Forte productivité - Non-sucre élevé en fermentation	Degré GL faible.

Figure 4 : Tableau comparatif des procédés de fermentation.

des conditions bien définies, conditionne également le bon déroulement de la fermentation. Nous allons passer en revue tous ces paramètres en essayant d'expliquer leur rôle, de préciser leurs valeurs optimales et les conditions de leur mise en œuvre.

### 1) Constitution des moûts

Le terme de moût est utilisé pour toute solution sucrée prête à être fermentée par la levure, et qui donnera un vin après fermentation. Sa constitution dépend essentiellement de la **nature des produits utilisés** (ici : mélasses et égoûts de sucrerie) et des différents additifs, souvent de nature nutritive qui

sont ajoutés au produit de base. Nous verrons dans un premier temps les divers constituants utilisés et ensuite, par quels circuits il est souhaitable d'effectuer industriellement ce mélange.

#### a) Nature du produit utilisé

Concernant l'industrie sucrière, tous les produits issus de la cristallisation sont actuellement utilisés en fermentation alcoolique. Selon le niveau de prélèvement, leur pureté ————— % matière-sèche varie de 92 % à 60 %. Le taux de substances non-sucre dans le moût variera donc en sens inverse de cette pureté

Produit sucrier	Pureté	Non-sucre (%) dans un moût à 14 % de sucre
Sirop (jus épuré, concentré)	92 %	0,08 %
Egoût pauvre de 1 <sup>er</sup> jet (EP <sub>I</sub> )	87 %	2,09 %
Egoût pauvre de 2 <sup>e</sup> jet (EP <sub>II</sub> )	76 %	4,42 %
Mélasse	60 %	9,33 %

comme le montre le tableau suivant, pour les différents produits de la cristallisation.

Ces « non-sucre » ont une action déterminante sur la croissance de la levure, mais leur qualité nutritive est cependant restreinte car l'épuration calco-carbonique qui précède leur production, a considérablement éliminé de facteurs de croissance de la levure, (acide aminés, protéines et macro-molécules diverses).

Nous avons montré (4) qu'un minimum de 2 % de non-sucre était nécessaire dans le milieu pour assurer une biomasse suffisante de levure. Ceci montre qu'un EP<sub>I</sub> est tout juste valable mais qu'au niveau du sirop, il y a **carence nutritionnelle**. Celle-ci est cependant comblée par un recyclage de vinasse. Nous reviendrons en détail sur ces problèmes de non-sucre dans un autre chapitre.

#### b) Origine de l'eau utilisée

Le produit sucrier est donc dilué dans l'eau pour produire une solution de 14 à 16 % de sucre, selon le degré alcoolique souhaité en fermentation. L'eau est rarement une eau urbaine, mais plutôt **d'origine naturelle** (forage, eaux de surface) ce qui a pour inconvénient **d'apporter des germes bactériens** ou parfois quelques toxines chimiques. Une bonne filtration est recommandée, à défaut d'une pasteurisation trop coûteuse en énergie.

• **Des eaux condensées** sont souvent utilisées : Condensats d'évaporation divers : vinasse, évaporation de jus, distillation, etc.

Par leur traitement thermique, elles contiennent **peu de bactéries**, ce qui est une bonne chose, mais par contre, elles sont **dépourvues d'éléments minéraux** (obligo ou macro-éléments) qui sont parfois indispensables ou métabolisme de la levure (Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup>, Co<sup>++</sup>, B<sup>++</sup>, Mo<sup>++</sup>) et que l'on trouve dans les eaux de rivière.

#### c) Adjonction d'acide

La solution ainsi obtenue a un pH le plus souvent supérieur à 7, voire 8 ou 9. Il y a donc lieu d'ajouter un acide fort pour amener le moût à des pH variant entre 3 et 5 selon le produit utilisé. Les acides sulfurique ou chlorhydrique sont le plus souvent utilisés. Le premier est parfois préféré au second pour des raisons de résistance des matériaux. Sur le plan biologique, les deux acides sont tolérés par la levure à des choses de 2 à 3<sup>g/l</sup> de moût (exprimé en <sup>g/l</sup> d'acide sulfurique). Nous reviendrons en détail sur **le rôle de cette acidification** qui est essentiellement une protection contre la contamination bactérienne, ainsi que sur l'optimisation et la régulation de ce paramètre qui doit se faire **non par le pH mais par une mesure de l'acidité**, exprimée en g/l d'acide sulfurique.

#### d) Sels nutritifs

Le sel nutritif le plus souvent ajouté est le **phosphate di-ammonique**. Des essais de laboratoire ont montré que son action sur la levure était visible jusqu'à la dose de 0,4 g/l de moût. Il est donc inutile d'en mettre des doses supérieures. Nous avons montré que, dans ce cas, c'est l'ion phosphate qui est actif et non l'ammonium. On peut penser que le produit est largement fourni en substances azotées, mais manque de phosphate pour assurer les réactions bio-énergétiques de la levure.

L'**ion sulfate** est également nécessaire pour la synthèse des acides aminés soufrés, mais à moindre dose. L'expérience a montré qu'un optimum de croissance des levures était atteint bien avant la dose de 0,1 g/l d'acide sulfurique.

Un sulfate peut donc être ajouté à cette concentration si l'acide sulfurique n'est pas lui-même utilisé pour l'acidification du moût.

**D'autres cations** sont également nécessaires au métabolisme de la levure, mais sont souvent apportés par l'eau, comme nous l'avons dit plus haut (ex :  $Ca^{++}$  et oblige-éléments divers).

Le **Magnésium** peut être ajouté avec profit sous forme de chlorure de magnésium que l'on utilise en sucrerie pour régénérer les résines du procédé Quentin. Une dose de 5 à 20 millimoles de  $Mg^{++}$  est suffisante, ce qui correspond à 0,5 g/l de chlorure de magnésium. Il va de soi que l'on doit s'abstenir d'ajouter du magnésium dans une fermentation de mélasse Quentin qui en contient déjà beaucoup.

#### e) Antiseptiques

Nous reviendrons en détail sur ce sujet dans le cadre de l'utilisation de l'acide et de la lutte contre la contamination bactérienne. Notons brièvement que les deux produits utilisés en fermentation de mélasse sont : le fluorure de sodium (ou d'ammonium, plus soluble) et la pénicilline.

Le **fluorure** est souvent utilisé d'une manière continue à la dose de 10 à 20 g/hl de moût si le pH est voisin de 4,5 à 5. Son action est efficace et maintient la flore bactérienne à un niveau bas. **Il ne peut être utilisé dans le cas de la reprise de levure** car le traitement acide à pH : 2 le rend très nocif pour les levures. Il ne semble pas indispensable d'utiliser des levures « acclimatées » au fluorure, car cette acclimatation peut se faire sur le site en quelques jours.

La **pénicilline** a été proposée il y a quelques années à notre initiative. **Instable à pH < 4**, il est préférable de ne l'utiliser qu'à des pH voisins de 5, pour avoir une efficacité maximale.

Il est **vivement déconseillé de l'utiliser en permanence** pour ne pas induire la production de germes pénicillo-résistants. Son action, en cas de contamination grave, est efficace en

2 jours à la dose de 0,3 mg/l de moût.

#### f) Antimousse

Les dégagements gazeux dans ces milieux très riches en matières organiques donnent lieu à la formation de mousses parfois très importantes qui réduisent considérablement le volume utilisable de la cuverie. Des antimousses sont donc ajoutés, le plus souvent directement dans les cuves en fermentation, et non dans la constitution du moût. Ce sont le plus souvent des huiles d'origine végétale ou animale (huile de poissons) qu'il est bon de tester au préalable pour voir s'ils ne contiennent pas d'inhibiteurs de croissance des levures. Nous verrons plus loin que leur action peut être dans certains cas stimulante pour la levure en participant à la biosynthèse des membres des cellules.

#### g) Mise en œuvre industrielle

L'ensemble de ces composés constituant le moût doit être mélangé **le plus rapidement possible** pour limiter au maximum la contamination bactérienne. Le produit sucrier de base (mélasse ou égoût) est pratiquement stérile (quelques germes par gramme) compte tenu des traitements thermiques subis en cristallisation et de la concentration en matière sèche obtenue (voisin de 80 %). Par contre, sa dilution au niveau du moût avec tous les additifs de nutrition que y sont ajoutés, **permet souvent une multiplication très rapide de la flore bactérienne**.

Il y a donc lieu d'éviter ce qui est encore pratiqué dans les anciennes installations, à savoir des **bacs à moût** qui sont alternativement remplis et vidés. Il

n'est pas rare d'obtenir, par ce procédé, des mouës contenant  **$10^6$  germes bactériens par millilitre**.

Nous préconisons la **dilution en ligne dans un mélangeur à chicanes** (type : Sultzer) de tous ces produits qui seront ainsi mélangés **en un temps très court** et immédiatement envoyés en cuverie. Pour l'avenir, dans le cas de fermenteurs correctement homogénéisés, nous proposerions le coulage du produit **sans dilution**, directement dans les cuves. Il y aura lieu de pouvoir amener le mélange eau, acide, sels par une autre voie et de manière très précise, selon un débit rigoureusement asservi à celui du produit. Ce mélange ayant un pH proche de 1, il serait protégé de la contamination bactérienne.

#### 2) L'acidité du moût

C'est un paramètre essentiel, peut-être le plus important, dans la conduite d'un atelier de fermentation alcoolique. Alors que, dans la plupart des fermentations, le pH est habituellement retenu comme paramètre de régulation, c'est ici l'acidité qui est mesurée. Nous verrons successivement **son action** sur les levures et les bactéries, **quelle valeur optimale lui donner et pourquoi elle a été choisie de préférence au pH**.

##### a) Action de l'acidité

Elle se mesure en **grammes par litre de moût, exprimés en acide sulfurique**, ce qui est également inhabituel puisqu'on a souvent l'habitude d'utiliser les milli-équivalents. Son action se situe tout d'abord **au niveau de la levure dont elle freine la croissance**. La figure n° 5 montre l'évolution du taux de

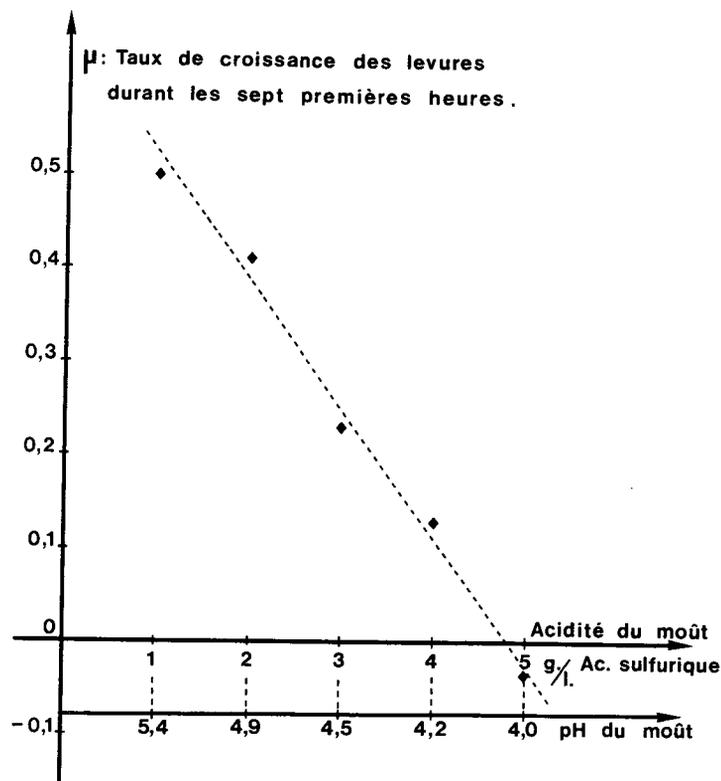


Figure 5 : Action de l'acidité du moût sur le taux de croissance des levures.

croissance ( $\mu$ ) de la levure dans un moût de mélasse dont l'acidité varie de 1 à 5 g/l. La décroissance de  $\mu$  est pratiquement linéaire en fonction de l'acidité du moût. Le pH correspondant varie de 5,4 à 4. Cette chute du taux de croissance de la levure a pour conséquence industrielle une augmentation du temps de fermentation et donc une baisse de la productivité de la cuverie. Il n'est donc pas possible de conduire une fermentation de mélasse à une acidité égale ou supérieure à 5 g/l, bien que le pH de 4 ne soit pas, à priori, incompatible avec le développement de la levure. Nous verrons plus loin les raisons du choix entre pH et acidité. **L'acidité a également une action bactériostatique** ce qui est très important dans un milieu non stérile dont nous verrons que la contamination bactérienne reste le danger permanent. Des courbes plus précises de cette action seront vues dans un paragraphe ultérieur. Disons pour le moment que le choix d'une valeur optimale de l'acidité reste un compromis entre deux chiffres : l'un trop bas, favorisant le développement des levures mais aussi des bactéries, l'autre, plus élevé qui doit être bactériostatique sans trop gêner la production de biomasse de levure.

### b) Recherche d'une valeur optimale de l'acidité

Sur milieu mélassé, le métabolisme des levures durant la fermentation donne naissance à quelques acides organiques (dont l'acide succinique ou acétique) qui sont responsables d'une légère augmentation de l'acidité du vin par rapport au moût initial. L'écart observé se situe entre 0,5 et 0,8 g/l d'acide sulfurique. Appelons «  $\Delta$ . Acide » cette différence entre l'acidité du vin et celle du moût. Dans le cas d'une contamination bactérienne excessive ( $> 10^6$  germes/ml) le «  $\Delta$ .Acide » devient alors supérieur à celui provenant uniquement des levures. Si l'acidité du moût a une action bactériostatique efficace, le «  $\Delta$ .Acide » devra rester aux environs de 0,8 g/l mais non supérieur.

La figure n° 6 montre les relevés de l'acidité du moût et du «  $\Delta$ .Acide » dans une usine durant un mois de fabrication. Nous constatons que le «  $\Delta$ .Acide » (courbe pointillée) revient au niveau de 0,5 à 0,8 g/l lorsque les acidités du moût se situent entre 2 et 2,5 g/l. Si l'acidité du moût (courbe en trait plein) descend au-dessous de 2 g/l son action bactériostatique devient trop faible et le «  $\Delta$ .Acide » prend des valeurs entre 1 et 1,5 g/l ce qui signifie le développement d'une contamination bactérienne. Nous verrons dans un prochain chapitre l'évolution d'une contamination bactérienne en relation avec ce «  $\Delta$ .Acide » et l'action d'éventuels antiseptiques. La valeur optimale de l'acidité du moût est donc située entre 2 et 2,5 g/l. Nous voyons d'après la figure n° 5 qu'elle n'est pas

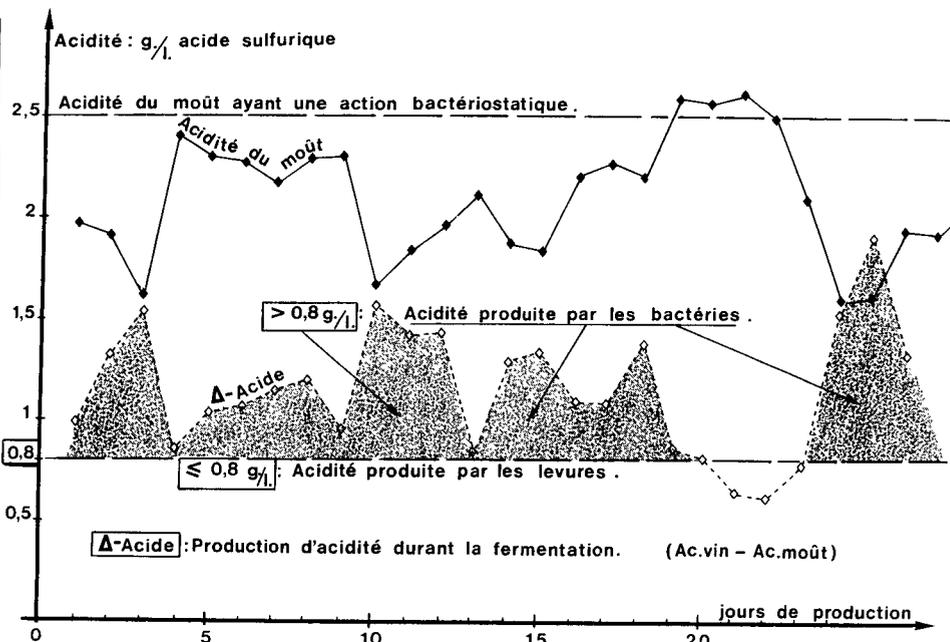


Figure 6 : Action de l'acidité du moût sur la production d'acidité organique ( $\Delta$ .Acide) en fermentation.

optimale pour la levure, mais elle permet un compromis entre une croissance moyenne des levures et une action bactériostatique limitant la flore bactérienne à un niveau non producteur d'acides organiques gênants pour la levure.

### c) Choix de l'acidité, de préférence au pH, pour la conduite d'une fermentation

Certains s'étonnent de l'utilisation de l'acidité comme paramètre de régula-

tion, alors qu'une mesure de pH, plus couramment répandue, est également plus facile à mesurer, réguler, voire automatiser.

Disons tout d'abord que le pH ne constitue pas ici une consigne assez sûre, car il change beaucoup en fonction du produit utilisé, donc du taux de non-sucre variable dans un moût à 14 % de sucre. Le tableau suivant reproduit les pH de moûts à 2,5 g/l d'acidité en fonction du produit sucré utilisé.

Produit	Non-sucre %	pH du moût
Sirop	< 1 %	2 à 2,5
EP <sub>I</sub>	2 %	3,3 à 3,5
EP <sub>II</sub>	4 %	4,3 à 4,5
Mélasse	9 %	4,8 à 5

Ayant constaté au paragraphe précédent, qu'un moût de mélasse à pH : 4 ne pouvait développer de levure car son acidité de 5 g/l s'y opposait, nous observons par ailleurs qu'un tel pH : 4 convient parfaitement pour la fermentation d'égoûts EP<sub>I</sub> ou EP<sub>II</sub> à acidité voisine de 2 g/l.

L'effet tampon imposé par le taux de non-sucre fait donc varier le pH entre 2 et 5 pour une même acidité. Or, le non-sucre est variable, d'abord en fonction des produits utilisés, et ensuite, comme nous le verrons plus tard, selon le taux de non-sucre recyclé par la vinasse. Il est donc tout-à-fait préférable d'utiliser l'acidité comme facteur de régulation. De plus, il est plus précis à de fortes teneurs en non-sucre (10 à 15 %) car le pH évolue alors très peu en fonction de l'acidité, du fait de l'effet tampon élevé.

Autre intérêt des mesures d'acidité : elles permettent d'effectuer en permanence un bilan de la production d'acide et de déterminer ce «  $\Delta$ .Acide » qui reste un excellent indicateur de l'action bactériostatique du milieu et de la progression éventuelle de la contamination bactérienne.

### 3) Le taux de non-sucre

Le non-sucre est essentiel pour la croissance des levures. Il constitue par ses éléments minéraux et organiques un excellent milieu nutritif pour la levure. Nous avons récemment publié (4) un travail très complet sur l'action du non-sucre sur le métabolisme de la levure, en relation avec la sélection de souches de levures résistantes à un excès de non-sucre qui développe dans le milieu une pression osmotique trop élevée. Il

existe deux causes principales de cette variation du non-sucre :

- la pureté du produit utilisé,
- le taux de recyclage du non-sucre par les vinasses.

Nous les examinerons l'une après l'autre :

#### a) Pureté du produit utilisé

Le non-sucre du moût varie de 1 à 10 % selon le produit utilisé. Les circuits habituellement utilisés pour la fermentation de la mélasse nous montrent que **la levure tolère parfaitement 9 à 10 % de non-sucre** apporté par ce produit et les performances technologiques que nous avons citées plus haut proviennent d'une telle fermentation.

L'utilisation de produits plus purs tels que les égoûts donne des moûts moins riches en non-sucre. On observe alors, une augmentation de la croissance des levures et de la fermentation, ce qui montre que l'on se rapproche, avec ces produits **d'une dose optimale de non-sucre située aux environs de 2 à 4 %**.

Avec les sirops, nous nous trouvons à un niveau proche de 1 % de non-sucre, ce qui est tout-à-fait insuffisant à la croissance des levures.

Pour résumer :

Le non-sucre est **en excès** dans le moût de mélasse, à une **dose optimale** avec les égoûts et, il y a **carence nutritionnelle** dans le moût de sirop.

#### b) Recyclage du non-sucre par les vinasses.

Il est rendu nécessaire, voire indispensable pour plusieurs raisons. D'abord, dans le cas des sirops, il constitue un complément nutritif indispensable pour la levure. Ensuite, afin de concentrer les effluents et économiser l'énergie sur l'atelier de concentration des vinasses, il a paru souhaitable d'augmenter le taux de non-sucre en fermentation jusqu'à la dose habituellement tolérée par la levure à savoir les 9 à 10 % du moût de mélasse.

Dans l'un de nos premiers travaux (1) nous avons montré, qu'à concentration égale, le non-sucre de vinasse est plus actif sur la levure que celui provenant de la mélasse. Ceci provient du fait que

la vinasse **contient des protéines d'autolysat de levure** qui sont des facteurs de croissance beaucoup plus actifs sur la levure que les protéines de betterave contenues dans la mélasse. En absence de contamination bactérienne, le non-sucre de vinasse **ne contient, en outre, aucun inhibiteur de fermentation**.

Si l'on recycle la vinasse dans un moût d'égoût Ep<sub>11</sub> pour abaisser sa pureté (76 %) jusqu'à celle d'une mélasse (60 %), on observe un ralentissement de fermentation. Mais ce mélange reste **d'une meilleure qualité fermentaire** que la mélasse de même pureté. Ceci a été démontré sur des essais de laboratoire (1) et vérifié dans une distillerie (2).

A même pureté qu'une mélasse, le non-sucre de vinasse produit **une augmentation de la biomasse de levure, de la productivité d'éthanol et du bilan fermentaire**.

On a souhaité, pour des raisons d'économie d'énergie **un enrichissement maximum du milieu fermentaire en non-sucre**, à un niveau bien supérieur aux 10 % du moût de mélasse. Ceci est possible avec des souches de levure sélectionnées à cet effet. C'est ce qui a été fait, depuis quelques années, dans le cadre de notre action à l'**UNION NATIONALE DES GROUPEMENTS DE DISTILLATEURS D'ALCOOL**. Nous reprendrons les principaux résultats déjà publiés (4). Nous disposons actuellement de quelques souches de levure capables de produire en 24 heures de fermentation, un vin de mélasse de 8°GL contenant jusqu'à 20 % de non-sucre. Dans ces conditions, la pression osmotique du milieu devient considérable et perturbe fortement le métabolisme de la levure sur plusieurs points :

- Baisse du **taux de croissance**, donc de la biomasse maintenue en fermentation.

- Forte **biosynthèse de glycérol** (osmorégulateur de la cellule) qui a pour conséquence une **baisse proportionnelle du bilan fermentaire**. Il passe de 61 à 55 litres d'alcool pour 100 kg de saccharose consommé quand le non-sucre augmente de 10 à 20 % dans le milieu fermentaire.

- Les productions d'alcools supérieurs et d'acidité organique sont également influencées selon les souches.

Pour un vin à 8° GL, le taux de **non-sucre en fermentation doit donc rester entre 10 et 15 %**. Au-delà de ces chiffres, les contraintes biologiques deviennent telles que l'économie d'énergie

recherchée au niveau de l'évaporation de vinasse est en grande partie absorbée par la baisse du rendement fermentaire. Il va de soi, que si l'on accepte un degré alcoolique inférieur à 8° GL, le non-sucre n'aura plus cette action néfaste sur le bilan fermentaire et, il sera à nouveau possible d'augmenter le non-sucre en fermentation. C'est le choix qui a été fait dans le procédé BIOSTIL (ALFA-LAVAL) qui donne la prédominance du non-sucre par rapport au degré alcoolique.

Le recyclage de vinasse ne pose donc pas de problème majeur sur le plan industriel. L'application qui en a été faite dans une distillerie (2) le montre bien. L'infection bactérienne devient cependant plus nocive puisqu'une partie des acides organiques, produits par les bactéries, sont recyclés en fermentation par les vinasses. Il y a donc lieu d'être particulièrement vigilant sur le plan bactériologique. Par ailleurs une grande part de l'acidité minérale du moût est ainsi recyclée par la vinasse. Il n'est pas nocif, mais il y a lieu d'en tenir compte dans le calcul de l'acidité du moût. Voilà une raison supplémentaire de préférer l'acidité au pH dans la régulation des fermentations alcooliques.

#### 4) Conditions de coulage et degré alcoolique souhaité

La baisse du taux de croissance des levures sous l'action d'un excès de non-sucre provient pour une grande part **d'une rétention excessive d'éthanol dans la cellule** sous l'action d'une forte pression osmotique externe. L'éthanol est bien, directement ou indirectement, le principal inhibiteur de croissance de la levure. Nous reproduisons en **figure n° 7** un graphique déjà publié (4), qui

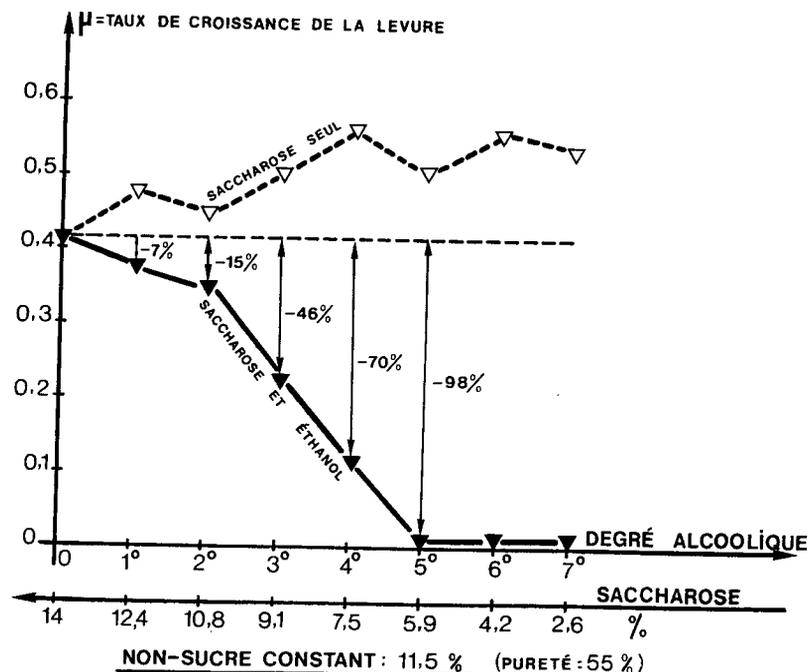


Figure 7 : Action du degré alcoolique sur le taux de croissance des levures.

montre l'évolution du taux de croissance des levures sur milieu mélassé quand son degré alcoolique varie entre 0 et 8° GL, durant la fermentation. Si la croissance est peu affectée par l'alcool jusqu'à 2° GL, elle chute considérablement jusqu'à 5° GL où elle devient presque nulle. C'est la raison pour laquelle le procédé BIOSTIL ne peut dépasser 5 à 6° GL à 12 % de non-sucre.

En effet, dans la fermentation continue à un seul fermenteur, la levure est maintenue en permanence dans un milieu alcoolisé maximum. Si le degré se rapproche de 8° GL, le taux de croissance devient trop faible pour régénérer la biomasse de levure même en reprise de levure.

Nous préconisons donc des consignes de coulage qui permettent de maintenir la levure le plus longtemps possible dans un milieu faiblement alcoolisé (< 5° GL), **le sucre en excès n'étant pas du tout gênant** pour la croissance de la levure. Nous avons développé ce thème dans un travail (3) qui mettait en évidence à quel point la reprise de la biomasse de levure en milieu sucré (et non alcoolisé) permettait d'augmenter au maximum la productivité d'éthanol : 8° GL en 5 heures de fermentation.

En application industrielle deux cas sont envisagés :

#### — En discontinu :

Après le coulage du pied de cuve (provenant d'une cuve-mère ou d'une reprise de levure) le moût doit être coulé le plus rapidement possible **de manière à diluer au maximum l'alcool produit** par la levure dans un grand volume de moût sucré. Si la cuve, une fois pleine, a un titre inférieur à 5° GL, nous aurons maintenu de meilleures conditions à sa croissance que si, dès le début d'un coulage trop long, nous lui permettons d'atteindre 6 à 7° GL. C'est malheureusement ce qui se passe dans la pratique, car l'on utilise en général un moût froid (10 à 15°C) pour « encaisser » les thermies dégagées par la fermentation. Si le moût est coulé rapidement il devra être plus chaud pour ne pas refroidir la cuverie, puis les calories dégagées par la suite devront être évacuées par échangeurs en pied de fermenteurs.

#### — En continu :

Les dimensionnements des cuves dans un système multi-étagé (type SPEICHIM ou VOGELBUSCH) sont faits de telle sorte que la première cuve a un temps de séjour tel, que le degré alcoolique est déjà très élevé (voisin de 5° GL). Nous pensons que des volumes plus faibles en tête permettraient d'établir un gradient d'alcool entre 1 et 5° GL qui serait plus favorable à la production de biomasse et donc à la productivité. En toute état de cause, la totalité du moût et de la biomasse doivent être coulés dans la première cuve et non échelonnés sur plusieurs.

## 5) Aération

*L'aération a toujours été indispensable* au bon fonctionnement d'une fermentation de mélasse, contrairement à celle de jus de betterave qui peut se contenter de l'oxygène dissout au cours de la diffusion. Dans les installations actuelles l'air est ajouté, soit dans les cuve-mères, soit dans les cuves de régénération de la crème de levure recyclée, mais non en cuves de fermentation.

Nous voudrions évoquer successivement l'action physiologique de l'air sur la levure et sa mise en œuvre industrielle.

### a) Action de l'air sur la levure

Le métabolisme de la levure peut emprunter deux voies selon la présence ou l'absence d'air.

— Sans air, il y a fermentation et production de biomasse et d'éthanol.

— En présence d'air, il y a **respiration**, et seulement production de biomasse.

Ces deux voies sont parfois utilisées simultanément avec plus ou moins prédominance de l'une sur l'autre.

Par contre, un excès de glucose dans le milieu fermentaire bloque les enzymes de la chaîne respiratoire et **oblige la levure à emprunter la voie fermentaire**. C'est ce que l'on appelle « l'effet CRABTREE » ou contre-effet PASTEUR.

Sans insister sur ces problèmes de métabolisme qui ne sont pas au cœur du sujet il convient cependant de préciser que, compte-tenu des concentrations en sucre rencontrées dans nos fermentations, **il est exclu que l'adjonction d'air, même à forte dose fasse dévier le métabolisme des levures vers la voie respiratoire**. Il n'y a donc pas lieu de craindre, comme certains le pensent, qu'un excès d'air puisse faire baisser le bilan fermentaire au profit de la production de levure. Nous travaillons actuellement sur ce sujet, et des résultats intéressants seront prochainement publiés dans un travail approfondi.

**L'air, à faible dose, et toujours sur la voie fermentaire, est cependant indispensable à la levure.** En effet, la membrane de la cellule de levure est composée de stérols dont la biosynthèse **nécessite la présence d'oxygène moléculaire**.

La levure ne peut donc se reproduire en anaérobiose totale à moins que le milieu ne contienne certains stérols ou leurs précurseurs qui sont des acides gras insaturés. Sur ce plan, certains antimousses sont probablement très actifs, et une étude est en cours sur ce sujet.

### b) Mise en œuvre de l'aération

De tout temps, les cuves-mères ont été aérées sans que l'on se pose la question du taux d'aération. Celui-ci n'a jamais influé sur le bilan fermentaire qui

est resté proche de 62 l d'alcool pour 100 Kg de saccharose. Ceci est bien la preuve de ce que nous disions au chapitre précédent : l'air ne peut être, **sur milieu mélassé**, un facteur de baisse du bilan fermentaire. Nos essais actuels le confirment. Précision bien qu'il s'agit de **mélasse**, car nous avons eu l'exemple d'une distillerie qui, sur milieu plus favorable, (égoûts), a observé une nette baisse de bilan fermentaire, avec production excessive de biomasse.

Nous préconisons d'aérer les cuve-mères ou les reprises de levure à un taux voisin de 1 V.V.H. (volume d'air par volume de cuverie et par heure). Cependant, l'étude que nous menons actuellement montre que l'optimum d'air est atteint bien avant cette valeur. Il n'en reste pas moins indispensable à la levure, **même pendant tout le déroulement de la fermentation**. De plus, les contraintes physiologiques imposées par le non-sucre à la levure, nécessitent une structure membranaire correcte pour rester active jusqu'à la fin de la fermentation et même au-delà, dans le cas de la reprise de levure. L'air, à très faible dose, est ici le facteur de croissance nécessaire. Il a, de plus, l'avantage de maintenir la biomasse en suspension jusqu'à la fin de la fermentation, quand le flux de gaz carbonique ne suffit plus.

**Cette aération permanente, pendant toute la fermentation** est pratiquée depuis deux ans avec profit dans une distillerie de mélasse travaillant par le procédé de cuve-mère. Le bilan fermentaire s'est même amélioré, car nous avons montré **qu'une carence en air** pouvait faire baisser ce bilan. Il y a eu aussi gain de productivité.

Dans l'avenir, l'air devra être mesuré, non pas en débit mais **en % d'oxygène dissout**, en utilisant des **sondes de potentiel d'oxydoréduction**. Le milieu en effet, de par sa charge en matières organiques, peut solubiliser plus ou moins l'air envoyé en cuverie. Le transfert aux cellules se fait alors par la **partie dissoute de cet air**.

## 6°) Reprise des levures : Lavage et traitement acide

Nous voudrions rappeler tout d'abord que l'enrichissement du milieu en biomasse par le procédé de reprise de levure **a pour seul résultat**, prévisible d'ailleurs, **d'augmenter la productivité**. Cette augmentation ne se fait pas dans les mêmes proportions que celles de la biomasse, mais permet cependant un gain de **production de l'usine de 30 à 50%** par rapport à l'exploitation en cuve-mère du même volume de cuverie. Ceci est, bien entendu, très appréciable. Par contre, et contrairement à l'opinion de certains, **le bilan fermentaire reste inchangé**, quel que soit le procédé utilisé. Ceci a été démontré au laboratoire

et plusieurs fois vérifié sur les sites industriels. Cette technologie de reprise de levure doit être, bien entendu, menée dans des conditions optimales. Avant de revenir sur les détails de sa mise en œuvre, il est bon de rappeler les objectifs à atteindre sur le plan biologique. Le vin de mélasse contient, outre la biomasse de levure, une flore bactérienne ( $10^4$  à  $10^6$  germes/ml) non négligeable qu'il est préférable de ne pas recycler avec les levures. Le procédé proposé pour atténuer le niveau de cette contamination est le maintien à pH très bas ( $< 2$ ), par adjonction d'acide dans la crème de levure. Ce traitement acide ne peut être acceptable que si les quantités d'acide qui doivent être ajoutées n'excèdent pas une dose compatible avec une croissance correcte des levures (2 à 3 g/l). Nous savons que l'effet tampon des non-sucre s'oppose à la baisse du pH pour de telles doses d'acidité. Le traitement acide devra donc être précédé d'un **lavage de la crème de levure par de l'eau** de manière à diluer les non-sucre qui seront éliminés dans le surnageant d'une deuxième centrifugation. Voilà donc le but de ce traitement qui comporte deux phases : une première centrifugation suivie d'un lavage à l'eau. Puis une deuxième centrifugation précédant le traitement acide qui permettra de tuer les bactéries sans toucher à la biomasse de levure. La crème ainsi traitée sera régénérée en présence de moût aéré puis constituera le pied de cuve d'une nouvelle fermentation (en dis-continu) ou alimentera la première cuve d'une fermentation continue multi-étagée.

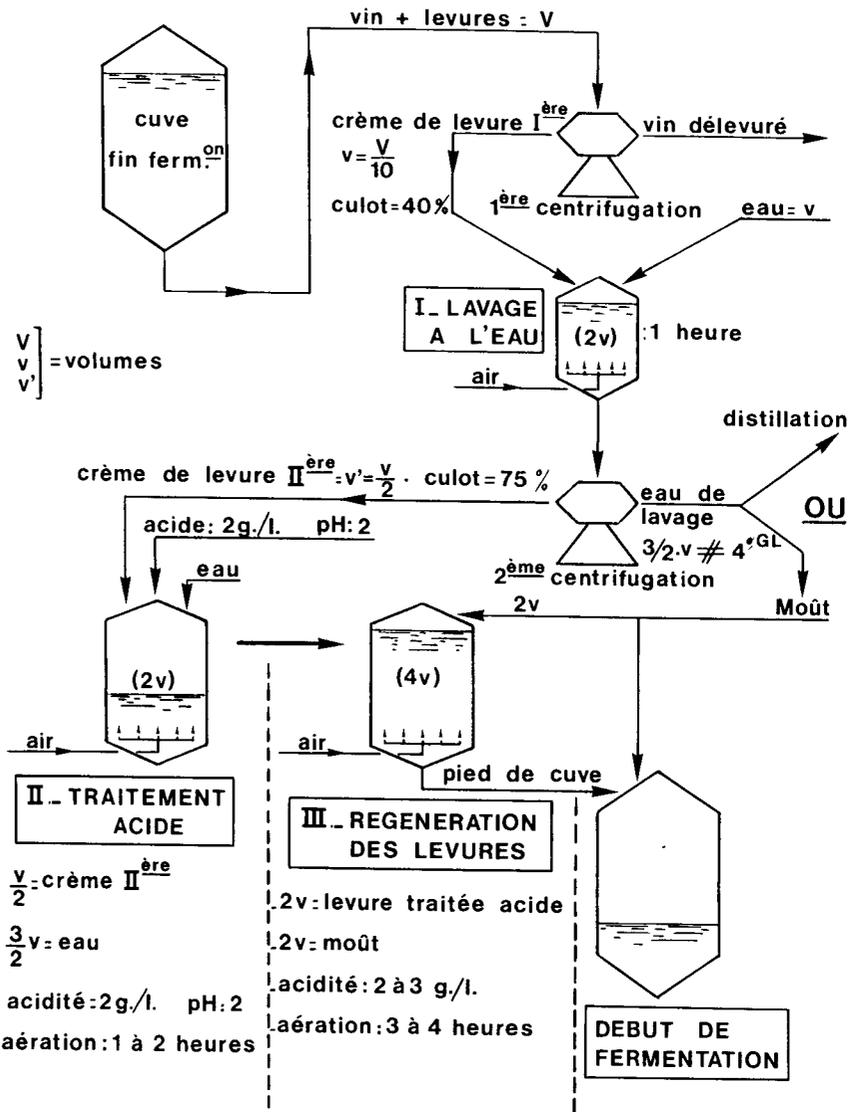


Figure 8 : Technologie de reprise de levure (lavage et traitement acide) en fermentation de mélasse.

Le rôle, qui a souvent été énoncé, de « dégorgeant » des levures dans l'eau pour éliminer les toxines est à prendre avec précaution. Nous avons nous-mêmes effectué au laboratoire pendant plusieurs mois (3), une fermentation discontinue avec reprise de levure sans aucun traitement de la levure. En absence de contamination bactérienne, les performances des levures sont restées inchangées.

De même, le procédé BIOSTIL recycle la levure sans aucun traitement. Nous pensons donc que le but du lavage des levures est uniquement de se débarrasser du non-sucre pour avoir un traitement acide plus efficace.

#### a) Description du procédé

La figure n°8 donne, dans les détails, la mise en œuvre de cette technologie, qui comporte trois parties : le lavage des levures, le traitement acide et la régénération des levures pour donner le pied de cuve.

#### — Première centrifugation et lavage des levures.

Le vin provenant d'une cuve en fin de fermentation est centrifugé une première fois. Le vin déleuvé est envoyé

en distillation. La crème de levure obtenue : **crème primaire**, représente en général 10 % du volume du vin et a un culot de centrifugation de l'ordre de 40 %. Cette crème de levure est mélangée à une fois son volume d'eau, puis agitée, en général par insufflation d'air, durant environ une heure. Ce lavage donne naissance à un **lait primaire** qui est centrifugé une deuxième fois.

#### — Deuxième centrifugation et traitement acide.

La deuxième centrifugation effectuée sur ce lait a aussi pour but de **concentrer la crème de levure au maximum** (75 % de culot) de manière à éliminer le maximum des substances non-sucre du surnageant.

Celui-ci appelé aussi « petites eaux » titre environ 4°GL. Il ne peut être rejeté et doit donc être recyclé. Deux solutions sont possibles : soit il est envoyé en distillation, mais il y a alors dilution du vin et donc dépense supplémentaire d'éner-

gie au niveau de la distillation, soit il est remis dans le moût, ce qui fait une source supplémentaire de contamination bactérienne. Le choix doit être fait en fonction de la qualité bactériologique des circuits.

Cette centrifugation donne naissance à **une crème secondaire** qui est mélangée à quatre fois son volume d'eau. Dans ces conditions de dilution du non-sucre, la dose de 2 g/l d'acide est suffisante pour descendre le pH aux environs de 2. Le traitement acide du **lait secondaire** dure 1 à 2 heures et l'agitation se fait également par l'air. Comme nous l'avons dit précédemment, l'action du pH est ici déterminante pour **tuer les bactéries**. C'est tout-à-fait différent de l'effet **bactériostatique de l'acidité du moût** durant le processus fermentaire. Le traitement acide a donc deux composantes le pH et le temps qui ne doivent agir que sur les bactéries et non sur les levures. Ceci doit être surveillé avec attention.

— **Régénération de la levure et formation du pied de cuve.**

Il est souhaitable, après ce traitement chimique intense de la levure, de lui permettre de se multiplier rapidement avant d'être mise en fermentation, le plus souvent **sans air et à degré alcoolique trop élevé**. Le moût fort est donc **rapidement** coulé sur le pied de cuve qui reste aéré, de sorte que les levures peuvent commencer un bourgeonnement. Cette régénération est maintenue 3 à 4 heures. Le volume ainsi obtenu constitue le pied de cuve qui est envoyé en cuve de fermentation.

**b) Conditions d'un bon fonctionnement**

Nous voudrions évoquer ici les **points essentiels** qui conditionnent le déroulement correct de cette technologie, à savoir la production d'une biomasse de levure en quantité importante, constante et partiellement débarrassé de ses bactéries.

— **Recherche d'un barème optimal de traitement acide.**

Nous avons observé au laboratoire le comportement d'une crème de levure contenant des levures et des bactéries, en fonction de l'intensité du traitement acide qui lui a été appliqué (pH, acidité et temps). Les résultats figurent sur la **figure n° 9**. Nous voyons que le traitement habituel (pH : 2) ne fait décroître les bactéries que d'une puissance de dix mais par contre, il est sans risque pour les levures dont la population reste à peu près stable. Un traitement plus intense peut être envisagé (pH : 1,5 ou 1). Nous constatons alors une très forte décroissance bactérienne. Ceci est assez remarquable, d'autant que la biomasse de levure évolue peu durant une heure.

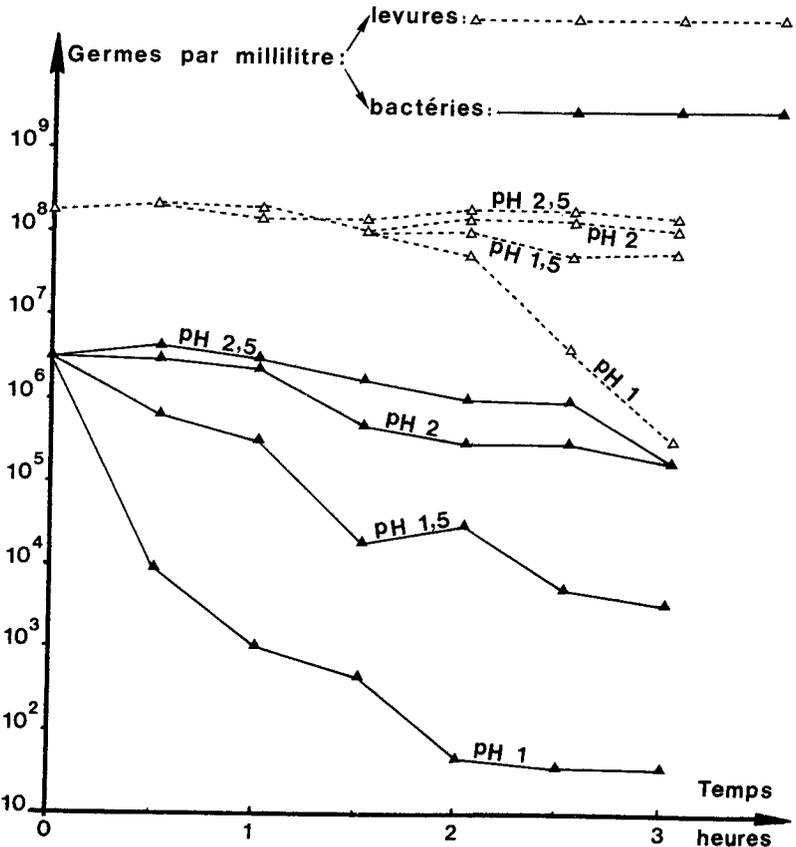
Si le lavage a été efficace, un traitement acide à pH voisin de 1,5 peut être envisagé **sur un temps très court**. Notons la bonne résistance des levures à un tel pH, mais l'inconvénient demeure l'acidité élevée (5 à 8 g/l) qui doit être ajoutée pour un tel pH. Une dilution rapide du pied de cuve sera nécessaire pour abaisser cette acidité, qui est incompatible avec une bonne croissance des levures.

— **Reprise d'une biomasse de levure en bon état.**

En fin de fermentation, sous l'action du degré alcoolique et du non-sucre, la survie des levures est assez courte. Ceci est accentué par le dépôt dans les cuves non agitées, l'acidité organique provenant des bactéries et parfois une température trop élevée en fin de fermentation. Nous préconisons donc quelques améliorations :

- Une bonne régulation thermique : 33°C,
- Une agitation en fin de fermentation,
- L'aération peut être un bon moyen d'agiter, car l'air améliore la survie des

pH	Acidité g/l.
2,5	1,8
2	3,3
1,5	5,5
1	8,2



**Figure 9 : Action du traitement acide sur la biomasse de levures et de bactéries.**

levures par son action sur les structures membranaires des cellules.

— Enfin, les cuves dont la fermentation est achevée **doivent être distillées sans délai**.

Le maintien de la biomasse de levures, durant quelques heures, dans un vin de mélasse provoque rapidement une autolyse des levures. Outre cette décroissance observée, une flore bactérienne se développe rapidement dans le dépôt de levure et l'on constate par ailleurs une production supplémentaire de composés secondaires néfastes à une bonne qualité de l'alcool (ex : aldéhydes). Pour réduire au maximum **cette attente des cuves « chutées »**, l'alimentation de la distillation doit être en permanence ajustée au débit de la cuverie. Ce réglage n'est pas facile à surveiller, mais reste cependant indispensable à une bonne régularité d'une fermentation par reprise de levure.

— **Recherche d'une crème de levure la plus concentrée possible.**

Ce paramètre est très important. Il dépend des performances et de la mise en œuvre du matériel utilisé. **Des culots de levures de 75 à 80 %** sont actuellement des valeurs courantes en deuxième centrifugation. La concentration maximale de la levure a deux avantages :

- En première centrifugation, elle permet de **limiter le volume des eaux de lavage** qui doivent être recyclées.
- En deuxième centrifugation, elle permet **d'abaisser au maximum l'effet tampon des non-sucre** et de descendre la valeur du pH avec le minimum d'acide ajouté.

Pour conclure sur ce procédé de reprise de levure, il est incontestable qu'il permet un **gain de productivité** important par rapport au procédé par cuve-mère.

Mais ceci est souvent obtenu au prix de contraintes technologiques souvent difficiles à maîtriser, sans parler de l'investissement important en matériel de centrifugation.

Le procédé par cuve-mère, malgré sa faible productivité, comporte cependant quelques avantages de régularité de fonctionnement et de simplicité de mise en œuvre. Nous recherchons actuellement dans quelles conditions il serait possible **d'augmenter cette productivité afin de la rapprocher de celle du procédé par reprise de levure**. Des résultats intéressants ont été obtenus sur ce sujet et déjà mis en œuvre dans une distillerie. Nous en reparlerons dans la conclusion générale.

### III - ORIGINE ET PREVENTION DES ACCIDENTS DE FERMENTATION

L'ensemble des paramètres dont nous venons de parler sont globalement responsables de la bonne marche et surtout de la régularité d'un atelier de fermentation. L'accident de fermentation n'est jamais une chute brutale de la productivité, mais une lente décroissance dont les causes sont parfois multiples et souvent difficiles à élucider. Nous voudrions examiner ici, dans quelles conditions se produisent ces accidents et quels sont les moyens de les éviter, tant au niveau de la **conduite** que de la **conception de l'atelier**. Nous commencerons par la **contamination bactérienne** qui reste à l'origine de la grande majorité des accidents de fermentation. Plus récemment, se sont développées sur quelques sites, des **variétés de levures productrices d'acide acétique** (Brettanomyces), et qui ont gravement perturbé la production. Nous exposerons les premiers résultats de travaux sur ce sujet, dans le but d'éviter le développement d'une telle flore. Enfin, nous verrons les toxicités chimiques diverses provenant des produits ou de leur recyclages, ainsi que les erreurs au niveau de la conduite de l'atelier de fermentation.

#### 1°) Contamination bactérienne

Celle-ci reste le point faible de tous les circuits de fermentation de mélasse. Le non-sucre élevé maintient un pH voisin de 5, très favorable au développement de la flore lactique. Au-delà de  $10^6$  germes par millilitre, ces bactéries produisent dans le milieu une acidité organique qui est responsable de l'inhibition de la croissance des levures et donc de la productivité d'éthanol. Son action se manifeste à des doses de 0,5 à 1 g/l d'acidité produite.

Comme il est exclu, pour des raisons de rentabilité financière, de pratiquer la

stérilisation thermique des circuits, nous devons donc tout mettre en œuvre pour que la flore bactérienne ne dépasse pas  $10^6$  germes/ml.

#### a) Origines de la contamination

Le produit sucré utilisé (mélasse ou égoûts) est très peu contaminé, compte tenu des barèmes thermiques élevées auxquels il a été soumis durant sa fabrication. La forte concentration en matière sèche (80 %) empêche également tout développement bactérien. Ces produits ne sont cependant pas complètement stériles (quelques germes par gamme) et apportent donc au milieu l'ensemencement nécessaire. **Au moment de la dilution des moûts** le développement bactérien est très rapide et peut atteindre couramment  $10^4$  à  $10^5$  germes/ml.

A ce niveau, il n'y a pas encore production d'acide organique, mais la fermentation doit pouvoir se dérouler **en présence d'un agent bactériostatique** qui empêche la flore bactérienne d'atteindre ou de dépasser  $10^6$  germes/ml. L'acidité du moût joue donc ce rôle, comme nous en avons déjà parlé.

En dehors du moût, les différents paramètres qui accentuent les risques de contamination bactérienne sont les suivants :

#### — L'atelier de dilution des moûts.

**L'utilisation de bacs** est à proscrire. Ils sont difficiles à nettoyer et imposent au milieu un temps de séjour trop long.

**La dilution en ligne** est préférable pour son faible temps de séjour et la possibilité d'une automatisation facilitée.

#### — La température de fermentation.

Elle ne doit pas dépasser  $33^\circ\text{C}$ . A des températures supérieures ( $35$  à  $37^\circ\text{C}$ ) l'on favorise la croissance des bactéries au détriment des levures qui deviennent moins résistantes à l'alcool et au non-sucre.

#### — Le temps de séjour des cuves chûtes.

Il favorise le dépôt et l'autolyse des levures ce qui est un excellent facteur de contamination bactérienne.

#### — L'utilisation de cuves à fond plat.

Elle favorise les dépôts, agit donc de la même manière que précédemment et doit être particulièrement décommandée dans le cas d'une fermentation continue.

#### — Le stockage des vinasses légères recyclées.

Non concentrées, les vinasses issues de la distillation **ne sont parfois pas stériles, surtout dans le cas de distillation sous vide à basse température**. **Le bac tampon avant recyclage doit être le plus petit possible, maintenu chaud et souvent nettoyé**. C'est également une source de contamination.

#### — L'eau de lavage des gaz de fermentation.

L'alcool entraîné par le gaz carbonique est récupéré par une colonne de lavage. L'eau alcoolisée doit être **de préférence envoyée en distillation** car elle contient une flore bactérienne non négligeable. Il en va de même des eaux de lavage des levures (ou « petites eaux »).

#### b) Lutte contre l'infection bactérienne

En dehors de certaines consignes de conduite ou de conception des installations, la lutte contre l'infection bactérienne passe par une surveillance **permanente de la flore bactérienne** à tous les niveaux de l'installation. Les principaux points à surveiller sont :

- la dilution des moûts,
- la cuve en fin de fermentation,
- la cuve-mère éventuellement
- la crème de levure traitée acide (dans le cas de reprise de levure).

Les techniques de comptage sont multiples. Nous utilisons l'étalement sur boîte de pétri avec le milieu M.R.S. à 0,5 g/l d'actidione. Les comptages peuvent se faire en 24 heures, si la température d'incubation est montée à  $35-36^\circ\text{C}$ . Rappelons le paramètre significatif de l'infection bactérienne : le «  $\Delta$ .Acide ».

C'est une mesure rapide, simple, dont le résultat est immédiat. Il mesure la différence entre l'acidité du vin et celle du moût au coulage. En absence d'infection bactérienne, il se maintient entre 0,5 et 0,8 g/l et **surtout il doit rester constant**.

Son augmentation de 0,5 g/l est significative d'une contamination. Nous renvoyons à la figure n° 6 qui retrace l'évolution du «  $\Delta$ .Acide » en fonction de l'action bactériostatique de l'acidité du moût.

Lorsque celle-ci est insuffisante et qu'il y a augmentation du «  $\Delta$ .Acide » et de la flore bactérienne, l'on peut avoir recours à certains **antiseptiques**.

Nous en citerons deux qui sont couramment utilisés : le fluorure de sodium et la pénicilline (G. sodique de Rhône-Poulenc).

**Les figures n° 10-n° 11 et n° 12** montrent l'action comparée de l'acidité du moût, le fluorure de sodium et la pénicilline sur :

- le taux de croissance des bactéries,
- le «  $\Delta$ .Acide » produit,
- la biomasse de levure.

Comme nous l'avons déjà vu, **l'acidité du moût** s'il a une action sur la croissance des bactéries en a aussi sur les levures. On constate qu'au-delà de 2 g/l son action se répercute sur les levures. A des valeurs plus faibles, la levure est gênée par l'acidité des bactéries comme le montre la courbe des «  $\Delta$ .Acide » (2 à 5 g/l). L'utilisation d'un bon antiseptique agissant sur les bactéries

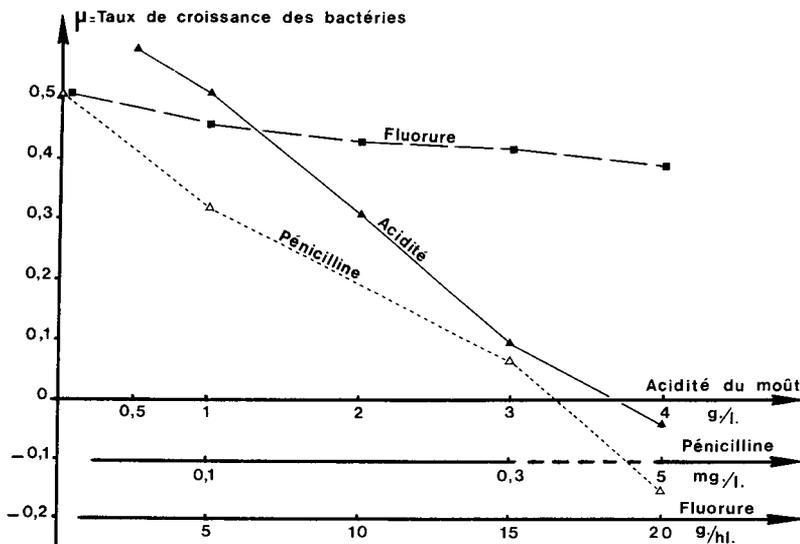


Figure 10 : Taux de croissance des bactéries selon trois agents bactériostatiques : Acidité du moût, Pénicilline, Fluorure.

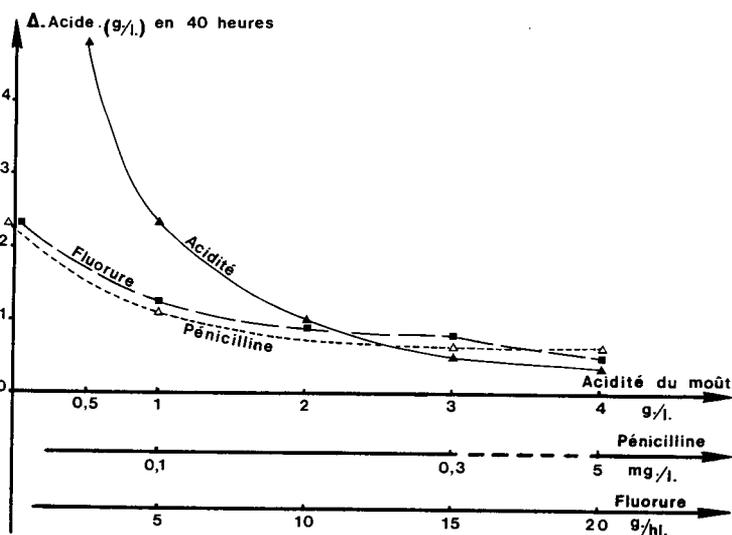


Figure 11 : Production d'acidité organique (Δ.Acide) en fermentation selon trois agents bactériostatiques : Acidité du moût, Pénicilline, Fluorure.

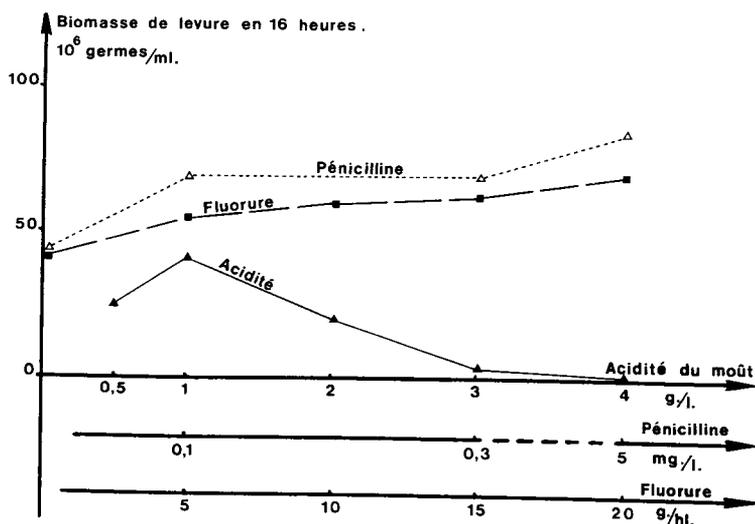


Figure 12 : Biomasse de levure en fermentation, selon trois agents bactériostatiques : Acidité du moût, Pénicilline, Fluorure.

ries et non sur les levures est donc ici très appréciable.

**Le fluorure de sodium** (entre 5 à 20 g/ht de moût) a une faible action sur les bactéries, mais permet une bonne régénération de la biomasse de levure par une **atténuation très correcte du « Δ.Acide »**.

La pénicilline est plus efficace sur la flore bactérienne. Sa dose doit être de 0,3 mg/l (ou, 16, 5 millions d'unités internationales par gramme). Au-delà, son action n'est pas meilleure, mais elle ne risque pas de gêner la levure.

## 2] Contamination levurienne (Brettanomyces)

La fermentation des mélasses est faite par la levure *Saccharomyces cerevisiae*. On utilise, dans la plupart des cas, des levures de panification pour leur facilité d'emploi. Il est possible que des levures dites « sauvages » se développent dans le milieu puisqu'aucune stérilisation n'est effectuée au niveau des produits. Si leur taux de croissance est suffisant, elles peuvent se maintenir et produire de l'alcool sans gêner la fermentation de la souche de boulangerie mise en œuvre initialement.

Cependant, de **graves accidents de fermentation** se sont produits, depuis 2 à 3 ans, par la contamination d'une levure qui **élimine la souche initiale** et reste néanmoins incapable d'effectuer la fermentation avec une productivité convenable.

Trois cas ont jusqu'ici été observés. Le micro-organisme incriminé était dans tous les cas : **Brettanomyces intermedius**.

### a) Rappel du métabolisme des levures : Brettanomyces.

En 1940 M.Th. CUSTERS décrit cette levure dans sa thèse, par sa particularité de développer un effet PASTEUR négatif, que l'on a appelé par la suite **l'effet CUSTERS**.

En effet, la fermentation alcoolique de cette levure est non pas inhibée (Effet PASTEUR) mais **stimulée** par la présence d'air. De plus, sa fermentation s'accompagne d'une **forte production d'acide acétique**.

Nous avons récemment montré que **l'acidité du moût, dans des valeurs de 3 à 4 g/l, stimule la croissance de cette levure alors qu'elle empêche le développement de *Saccharomyces cerevisiae***.

### b) Comment empêcher le développement des Brettanomyces.

Une telle contamination est donc la conséquence d'erreurs de conduite à deux niveaux de l'atelier.

- Un excès d'air,
- Un excès d'acidité des moûts.

Dans ces conditions, la nouvelle souche

de levure (Brettanomyces) s'implante dans le milieu, au détriment de Saccharomyces cerevisiae dont le taux de croissance est fortement diminué par rapport à celui de la souche infectante. De plus, il y a alors biosynthèse d'acide acétique par les Brettanomyces qui finissent par s'antoinhiber et la fermentation est considérablement ralentie voire inachevée. Nous sommes actuellement très démunis devant ce type de contamination. Dans tous les cas, **une liqui-dation complète** de la cuverie est nécessaire et la remise en marche ne peut se faire qu'après un nettoyage et une désinfection totale et minutieuse de tous les circuits.

Les premiers accidents de cette sorte sont apparus sur un site d'implantation du procédé BIOSTIL. Précisons que la Société ALFA-LAVAL préconisait l'utilisation de Saccharomyces pombe à la place de Saccharomyces Cerevisiae pour des raisons, annoncées, de meilleure résistance à la pression osmotique du non-sucre, mais qui nécessiterait, pour augmenter le faible taux de croissance de Saccharomyces pombe, **une très forte aération**. Ceci, allié à une moins bonne maîtrise des acidités des moûts, est probablement responsable des accidents constatés sur le site et qui étaient dus à l'envahissement du milieu par des Brettanomyces..

Par la suite, dans deux autres usines, un phénomène semblable est apparu, et il semble, là aussi, que ce soit le résultat **d'erreurs de conduite au niveau de l'air ou de l'acidité**. Des essais de laboratoire montrent clairement qu'avec une très faible aération (0,5 V.V.H.) et une acidité comprise entre 2 et 2,5 g/l, **les souches de Brettanomyces ne peuvent se développer** en milieu mélassé. Il y a donc lieu de maîtriser parfaitement ces deux paramètres. Nous travaillons actuellement **sur l'aération** et proposerons prochainement des consignes très précises sur ce sujet. Quant à l'acidité des moûts, il serait souhaitable de pouvoir maîtriser la contamination bactérienne **sans avoir recours à un excès d'acidité**. Soit par une meilleure propreté bactérienne du milieu, soit par l'utilisation **d'un antiseptique correct** permettant de travailler à un bas niveau d'acidité des moûts (1 à 1,5 g/l).

### 3°) Toxicités chimiques diverses

En dehors de certaines contaminations, la levure peut être gênée dans son développement par différents produits qui ont été introduits ou ont pris naissance, au niveau de la fabrication du produit sucrier.

#### a) Le sulfite

Présent dans les produits de sucrerie, sa toxicité apparaît en fermentation à partir de 1 g/l de moût. Elle varie également selon le degré de liaison du SO<sub>2</sub>

avec d'autres substances organiques, et aussi selon le pH d'utilisation.

#### b) Les nitrites

Ils se forment souvent dans des diffusions-tours qui facilitent le développement de fermentations nitreuses **anaérobies**. L'inhibition de la fermentation apparaît à partir de 0,3 g/l de nitrites. Sur le site, la présence de vapeurs nitreuses rousses est souvent visible dans les cuves ouvertes. Il y a donc lieu **de bien surveiller la contamination bactérienne des diffusions** pouvant développer une flore anaérobie de bactéries nitreuses.

#### c) Les acides organiques

Nous avons montré dans les mélasses la présence d'acides organiques (type : lactique) (2) qui sont libérés au moment de l'acidification des moûts. Ces acides agissent sur la levure comme ceux dont nous avons déjà longuement parlé et qui sont produits par la contamination bactérienne en fermentation. Ils proviennent ici de la diffusion où une flore identique peut se développer également. L'industrie sucrière connaît bien ces problèmes qu'elle résout à l'aide d'antiseptiques (formol et autres). Notons qu'une surveillance accrue à ce niveau sera bénéfique sur la qualité fermentaire du produit sucré type mélasse. Les acides organiques sont en effet des produits lourds qui se concentrent en cristallisation.

#### d) Additifs divers en sucrerie

La plupart des additifs utilisés en sucrerie (Biocides, antimousses, déviscosants, adjuvants de pressage, ect...) se retrouvent à une concentration multipliée par dix ans dans les mélasses. Il est possible que certaines de ces substances soient nocives pour la levure. Il y a donc lieu de s'en assurer avant utilisation.

## IV. CONCLUSION GENERALE ET PROSPECTIVE DE RECHERCHE

Comme nous le disions en commençant ce travail, nous voulions rendre compte dans quelles conditions fonctionnaient les différents ateliers de fermentations des mélasses. Nous nous fixions pour but de proposer une optimisation au niveau de chaque paramètre et de l'ensemble de la conception des installations. Nous voudrions revenir ici, sur quelques points essentiels qui détermineront notre prospective de recherche dans les années à venir à l'UNION NATIONALE DES GROUPEMENTS DE DISTILLATEURS D'ALCOOL.

### 1°) Conception des installations

Celles-ci sont conçues selon deux grands principes cuve-mère ou reprise

de levure. Dans les deux cas **le bilan fermentaire reste identique**, seule la productivité est augmentée par le procédé de reprise de levure. Ceci se fait souvent au prix **de contraintes technologiques nombreuses** et souvent difficiles à maîtriser.

Pour notre part, **nous souhaitons développer le procédé par cuve-mère** en tentant d'augmenter sa productivité par optimisation de certains paramètres stimulant le développement de la biomasse de levure. Nous avons développé depuis quelques années **l'aération** durant toute la durée de la fermentation. Nous donnons à titre d'exemple, le cas de la distillerie d'ORIGNY-SAINTE-BENOITE qui a pu ainsi augmenter nettement la productivité de sa cuverie, fonctionnant par cuve-mère.

Les chiffres moyens de la dernière campagne sont les suivants :

- Degré alcoolique du vin : 10,6 g/l,
- Matière sèche non-sucre du vin : 10,5 % (13,5 % sur vinasse),
- Temps de fermentation : 27 heures,
- Bilan fermentaire : 61,6 litres d'alcool pour 100 Kg de Saccharose,
- Productivité d'éthanol : g/l/h : 3,10.

La productivité se rapproche donc de celle obtenue par reprise de levure, sans avoir les contraintes de ce procédé.

### 2°) Optimisation de certains paramètres

#### a) L'acidité du moût

**Celui-ci doit rester constant** afin d'apprécier constamment le « Δ.Acide », témoin de la contamination bactérienne. Nous proposons **qu'il évolue entre 2 et 2,5 g/l** de moût, afin d'éviter la contamination par les Brettanomyces.

#### b) Utilisation d'un antiseptique

**La pénicilline** donne de bons résultats mais ne peut être utilisée en permanence par crainte de donner naissance à des germes pénicillo-résistants. Le Fluorure de sodium ne s'emploie qu'en cuve-mère, car le procédé de traitement acide rend son action très nocive pour les levures. Des traces d'acide fluorhydrique détruisent la biomasse de levure. La recherche d'un antiseptique **pouvant compléter l'action bactériostatique de l'acidité du moût aurait de nombreux avantages**.

— **Gain de productivité** par fonctionnement à acidité faible (1 à 1,5 g/l),

**Non-contamination par des Brettanomyces** à de faibles acidités.

**Recyclage des vinasses facilité** par une acidité organique faible en absence d'infection bactérienne.

Nous sommes en rapport avec des producteurs d'antiseptiques qui travaillent sur ce sujet en collaboration avec nous. L'utilisation d'un produit nouveau à ce

niveau reste cependant soumise à quelques conditions, outre son action biologique :

— **Ne pas gêner les levures**, dans une large gamme d'utilisation contre les bactéries.

— **Ne pas donner de produits polluants** dans l'alcool après le traitement thermique de la distillation.

— **Ne pas donner de produits toxiques** dans les vinasses concentrées, souvent utilisées en alimentation du bétail.

Un travail important, et néanmoins très utile, reste à faire dans ce domaine pour les années à venir, surtout dans l'optique d'usines de grosses productions (5 000 hl d'alcool pur par jour).

#### c) L'aération

Nous avons montré récemment au laboratoire que cette aération demeurait **indispensable**, mais pouvait être **réduite à un minimum**. Des chiffres plus précis seront prochainement donnés, ainsi que les méthodes de mesures sur les sites par sondes de potentiel d'oxydo-réduction.

Cette diminution de l'air devrait aussi permettre **d'éviter la contamination**

**par des Brettanomyces** dont la fermentation alcoolique est stimulée à des hautes teneurs en air.

#### d) utilisation d'antimousse

Aux dires des chercheurs spécialisés dans ce domaine, certains antimousses pourraient contenir des acides gras insaturés qui entreraient dans la voie de biosynthèse des stérols de membrane de levures. Ils participeraient ainsi à la survie des levures dans des conditions défavorables d'alcool et de pression osmotique. **Une étude est en cours** sur ce sujet et débouchera sur l'action des antimousses utilisés soit en distillerie, soit à différents stades de la sucrerie et qui se retrouvent plus ou moins chimiquement transformés dans les mélasses.

#### e) Conditions de coulage

**Le maintien d'un milieu peu alcoolisé** en tête de fermentation est là aussi un facteur de croissance des levures. Il peut être favorisé surtout en continu, par le dimensionnement des cuves de têtes imposant au milieu fermentaire des temps de séjour très court afin d'obtenir un gradient d'alcool inférieur à 5°GL.

Nous ne voudrions pas terminer ce tra-

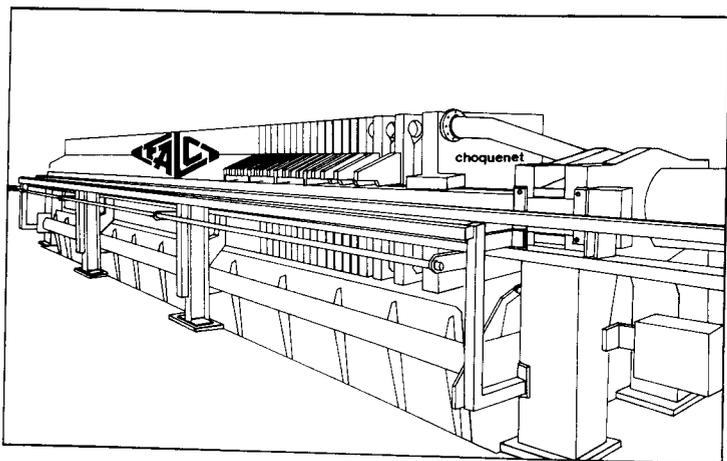
vail sans dire aux Industriels que nous avons avant tout cherché à les informer et à les aider. Nous espérons que ce travail, nécessairement incomplet et critiquable suscitera de leur part des remarques et des informateurs susceptibles de compléter, voire de modifier les grandes lignes des travaux de recherche que nous poursuivrons durant les prochaines années, à leur intention.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) M. de MINIAC. Fermentation alcoolique des sous-produits de sucrerie. Ind. Aliment. Agric. 1984, 101, 3, 123-135.
- (2) G. ALARD, M. de MINIAC. Recyclage des vinasses ou de leurs condensats d'évaporation en fermentation alcoolique des produits sucriers lourds (mélasses et égoûts). Ind. Aliment. Agric. 1985, 102, 9, 877-882.
- (3) M. NOMUS, M. de MINIAC. Gain de productivité d'éthanol en fermentation alcoolique des produits de sucrerie (mélasses et égoûts) Ind. Aliment. Agric. 1985, 102, 971-985.
- (4) M. de MINIAC. Sélection de souches de levures pour la fermentation alcoolique de milieux mélassés enrichis en non-sucre de vinasse. Ind. Aliment. Agric. 1987, 104, 425-439.

# L. CHOQUENET S.A.

19, rue Charles Brunette - B.P. 43  
02301 CHAUNY Cedex - Tél. 23.52.33.28  
Télex 140220 F - Télécopie 23.39.28.30



### FILTRES-PRESSES

et

### FILTRES-PRESSES AUTOMATIQUES

Filtration des jus de 1<sup>re</sup> et 2<sup>e</sup> carbonatation

Filtration des sirops

Filtration des boues de G.P.

### FILTRES GRANDPONT

Filtration des jus de 1<sup>re</sup> et 2<sup>e</sup> carbonatation

de nombreuses références en :

**SUCRERIES : SAS VAN GENT - ERSTEIN - WANZE - ARTENAY  
MOERBEKE - CORBEILLE - ROOSENDAAL - etc.**