

Sélection de souches de levures en vue de la production d'alcool sur lactosérum

par

Maguy LAHAM-GUILLAUME, G. MOULIN, P. GALZY

Chaire de Génétique et Microbiologie

E.N.S.A. - I.N.R.A.

place Viala - 34060 Montpellier cedex (France)

INTRODUCTION

Les sérums de fromageries sont produits en quantités toujours plus importantes. Depuis plusieurs années de nombreuses études ont permis de développer un certain nombre de techniques afin de valoriser les éléments nobles du sérum et de réduire sa charge polluante. Dans le but d'ouvrir une voie nouvelle, nous avons effectué une étude de sélection de souches de levure en vue de la production d'alcool sur sérum déprotéiné.

Les levures assimilant le lactose ont été étudiées par Ratomahenina (1975), Moulin *et al.* (1976). Dans ces études nous avons testé quarante souches appartenant à différentes espèces. Les premiers résultats obtenus par mesure du $Q^{N_{CO_2}}$ glucose ont montré que onze souches présentent un pouvoir fermentaire élevé. Nous avons repris au cours de l'étude présentée ici, ces onze souches afin de tester la quantité d'alcool produite par fermentation.

MATERIEL ET METHODES

Matériel biologique

Les souches testées sont les suivantes :

Candida pseudotropicalis CBS 19384.

Candida pseudotropicalis IP 513.

Candida macédionensis CBS 2073.

Candida salmenticencis CBS 5121.

- Candida k efyr* CBS 834.
Kluyveromyces fragilis CBS 397.
Kluyveromyces fragilis CBS 5975.
Kluyveromyces fragilis CBS 1555.
Kluyveromyces lactis CBS 683.
Kluyveromyces marxianus STV 1043.
Pichia pseudopolymorpha CBS 2008.

Conditions de culture

Toutes les cultures sont réalisées à 28° C sur table d'agitation va-et-vient, en erlenmeyer de 1 l rempli aux 2/3 de leur volume, et en anaérobiose stricte sous atmosphère d'azote R. La figure 1 indique le schéma de l'appareillage. La composition du milieu est celle décrite par Morgan-Harris (1956). Seule la concentration en sucre et la nature du sucre varient.

Méthodes analytiques

Les variations de biomasse ont été déterminées par le dénombrement des cellules à l'aide d'un hématimètre ou par la détermination de la matière sèche par pesée après dessiccation à 108° C jusqu'à poids constant.

Le dosage de l'alcool a été réalisé par la méthode chimique au bichromate de potassium. Le glucose ou le lactose résiduel ont été mesurés par la méthode à l'acide dinitrosalicylique.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

I. Etude de la fermentation en présence de glucose

L'étude a été réalisée en utilisant trois concentrations : 85 g/l ; 200 g/l et 300 g/l. Les ensemencements sont de l'ordre de $30 \cdot 10^6$ cellules par ml. Le tableau 1 présente les résultats obtenus. Pour chaque souche nous donnons le degré alcoolique maximum atteint, la durée de fermentation correspondante et la quantité de sucre exprimée en grammes, nécessaire à la production d'un degré d'alcool. Pour des concentrations en sucre inférieures à 85 g/l, toutes les fermentations sont terminées en 48 h. Le degré alcoolique est alors voisin de 5° pour la majorité des souches. Seules *Pichia pseudopolymorpha* et *Candida salmenticensis* ne transforment pas la totalité du sucre. A la concentration 200 g/l des différences importantes apparaissent.

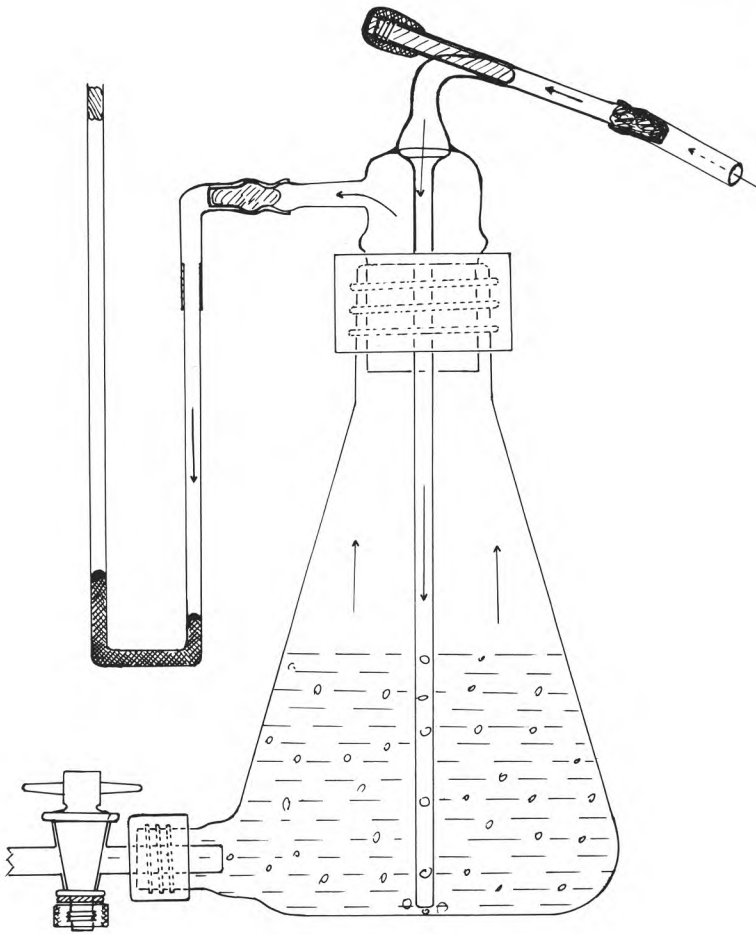


fig. 1

Schéma de l'appareillage utilisé pour des cultures sous atmosphère d'azote.

Certaines souches (*Candida pseudotropicalis* CBS 19384, IP 513, *Candida macedionensis*, *Kluyveromyces fragilis* CBS 397, CBS 5795 et CBS 1555, *Kluyveromyces marxianus*) donnent 12° pour des durées de fermentation de l'ordre de 90 h. Les autres souches donnent un degré alcoolique inférieur, exigent une durée de fermentation deux fois plus longue, n'utilisent pas la totalité du sucre disponible. A la concentration 300 g/l, toutes les fermentations sont ralenties. Les degrés alcooliques sont inférieurs à ceux obtenus à 200 g/l.

TABLEAU 1

Comparaison des différentes souches en culture sur glucose

	Glucose 85 g/l			Glucose 200 g/l			Glucose 300 g/l		
	A	T	R	A	T	R	A	T	R
<i>Candida pseudotropicalis</i> CBS 19384	4,8	48	17,7	12	90	16,6	11,3	240	17
<i>Candida pseudotropicalis</i> IP 513	4,6	48	18,4	12	65	16,6	9,8	240	17,2
<i>Candida macedionensis</i> CBS 2079	5,2	48	16,3	11,8	90	17	10	240	17
<i>Candida salmenticensis</i> CBS 5121	3,5	48	18	8,5	240	18	7	240	18
<i>Candida kefyri</i> CBS 834	4,7	48	18	9,9	168	18	9	240	18
<i>Kluyveromyces fragilis</i> CBS 397	5	48	17	12,4	114	16,1	9,2	240	16,8
<i>Kluyveromyces fragilis</i> CBS 5975	4,9	48	17,3	12	90	16,6	10	240	16,8
<i>Kluyveromyces fragilis</i> CBS 1555	5	48	17	11,2	90	17,8	9	240	17,5
<i>Kluyveromyces lactis</i> CBS 683	4,9	48	17,3	9,3	240	17,6	9	240	17,3
<i>Kluyveromyces marxianus</i> STV 1043	4,8	48	17,7	12,4	114	16,1	10,8	240	16,5
<i>Pichia pseudopolymorpha</i> CBS 2008	1,5	48	18	3,6	168	18	—	—	—

A : degré alcoolique.

T : durée de la fermentation en heures.

R : quantité de sucre en g pour obtenir 1°.

II. Etude de la fermentation en présence de lactose

Les essais de fermentation ont été réalisés pour toutes les souches à 85 g/l de lactose.

Plusieurs souches sont incapables d'utiliser la totalité du lactose : *Kluyveromyces fragilis* CBS 1555 (0,8°) ; *Pichia pseudopolymorpha* CBS 2008 (0,3°) ; *Candida macedionensis* CBS 2073 (0,4°) ; *Candida salmenticensis* CBS 5121 (1°) ; *Candida kefir* CBS 834 (2°) ; *Kluyveromyces marxianus* STV 1043 (0,7°). Seules celles assurant un bon niveau de fermentation ont été testées à 200 et 300 g/l (tab. 2). Notons

TABLEAU 2

Comparaison des souches les plus performantes en culture sur lactose

	Lactose 85 g/l			Lactose 200 g/l			Lactose 300 g/l		
	A	T	R	A	T	R	A	T	R
<i>Candida pseudotropicalis</i> CBS 19384	5,1	48	16,6	10,5	90	17	8,5	360	16,8
<i>Candida pseudotropicalis</i> IP 513	5,2	48	16,3	10,2	90	18	12	240	17,5
<i>Kluyveromyces fragilis</i> CBS 397	5	48	17	10,5	90	18	12,5	240	18
<i>Kluyveromyces fragilis</i> CBS 5795	5	48	17	9,8	90	17	9,5	240	17,2
<i>Kluyveromyces lactis</i> CBS 683	4,4	48	19,3	5,7	90	19,8	—	—	—

A : degré alcoolique.

T : durée de la fermentation.

R : quantité de sucre en g pour obtenir 1°.

tout d'abord que le lactose à 300 g/l n'est pas tellement inhibiteur : il est évident que la pression osmotique exercée est plus faible pour un disaccharide que pour un mono-saccharide à une concentration p/v égale. Il faut remarquer par ailleurs, dans les expériences citées ici, qu'il y avait toujours un peu de sucre résiduel. La fermentation du lactose est toujours un peu plus lente que celle du glucose, particulièrement en fin de processus.

Les résultats obtenus montrent que quatre souches présentent une bonne fermentation sur lactose : *Candida pseudotropicalis* CBS

19384 ; *Candida pseudotropicalis* IP 513 ; *Kluyveromyces fragilis* CBS 397 et *Kluyveromyces fragilis* CBS 5975. Pour ces quatre souches nous avons effectué des essais de fermentation sur lactosérum.

III. Essais de fermentation sur lactosérum

Les essais ont été réalisés à partir de lactosérum déprotéiné en poudre. Des solutions à 150 g/l de lactose ont été préparées. Les fermentations ont été conduites soit en anaérobiose stricte sous atmosphère d'azote, soit en réacteur de 2 l, avec agitation modérée sans aération. L'ensemencement de départ est de $30 \cdot 10^6$ cellules par ml. Le tableau 3 donne les résultats obtenus.

TABLEAU 3

Comparaison des souches en culture sur lactosérum concentré à 150 g/l de lactose

	Culture anaérobiose sous azote R sur lactosérum			Culture en fermenteur non aéré sur lactosérum		
	A	T	R	A	T	R
<i>Candida pseudotropicalis</i> CBS 19384	7,7	72	19,0	8	80	19,0
<i>Candida pseudotropicalis</i> IP 513	8	72	18,7	8,2	85	18,5
<i>Kluyveromyces fragilis</i> CBS 397	8,3	72	18,0	8,3	80	18,2
<i>Kluyveromyces fragilis</i> CBS 5975	8	72	18,7	7,8	90	18,9

A : degré alcoolique.

T : durée de la fermentation.

R : quantité de sucre en g pour obtenir 1°.

En anaérobiose stricte les 150 g/l de lactose sont totalement épuisés en 48 h à 72 h. Le degré alcoolique atteint est de l'ordre de 8°. Le lactosérum déprotéiné renferme donc tous les éléments nécessaires pour assurer une bonne fermentation en anaérobiose stricte. Il est

connu que des acides gras insaturés et des stérols sont indispensables à la croissance anaérobie de la levure (Andreasen *et al.* 1953). Les éléments sont probablement en quantité suffisante dans le lactosérum.

Les essais en fermentation non aérée donnent des résultats comparables.

CONCLUSION

Les onze souches étudiées présentent des $Q^{N_{CO_2}}$ glucose voisins de 150 μ l de CO_2 dégagé par heure et par mg de matière sèche. Parmi ces souches plusieurs cas peuvent être envisagés.

Deux souches ne fermentent que très lentement le glucose : *Candida salmenticensis* CBS 5121 et *Pichia pseudomopymorpha* CBS 2008. Ces souches malgré un $Q^{N_{CO_2}}$ glucose élevé ont probablement leur métabolisme fermentaire partiellement inhibé par des faibles degrés alcooliques.

Cinq souches fermentent bien le glucose, mais ne fermentent que très faiblement le lactose. Elles ne sont pas utilisables dans le projet envisagé. Enfin, quatre souches fermentent les deux sucres dans des conditions comparables : *C. pseudotropicalis* CBS 19384, *C. pseudotropicalis* IP 513, *K. fragilis* CBS 397, *K. fragilis* CBS 5975. Il faut noter que l'inhibition de la fermentation par le sucre est nettement plus marquée dans le cas du glucose que dans le cas du lactose. Pour les deux substrats, les fins de fermentations pour des concentrations en sucre de 200 ou 300 g/l sont relativement longues.

Les quatre souches retenues ici sont potentiellement utilisables pour la production d'alcool sur lactosérum. Dans le cas où l'objectif est la fabrication d'un jus alcoolique soumis à rectification, 10° apparaît comme une concentration optimum. Par contre s'il s'agit d'une fermentation en vue de la fabrication d'alcool de bouche, les souches sélectionnées permettent d'atteindre un degré alcoolique voisin de 12°.

Si l'on peut conclure à la possibilité d'utiliser une des quatre souches, l'optimisation des processus exigera de définir l'action du sucre et de l'alcool sur la cinétique du phénomène.

Summary

A comparative study of the fermentative capacities of 11 yeast strains has been made on glucose and lactose substrates. Two of these strains were found to be capable of producing 12 degree alcoholic solutions on lactose. Further tests show that it is possible to obtain under anaerobic conditions and without any additives, 8 degree alcoholic solutions on concentrated whey.

Reçu pour publication en juin 1979.

Bibliographie

- ANDREASEN (A. A.) and STIER (T. J. B.) (1953). — Anaerobic nutrition of *Saccharomyces cerevisiae*. I. Ergosterol requirement for growth in a defined medium. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 41, 23-36.
- HARRIS-MORGAN (1956). — Occurrence of respiration deficient mutants in baker's yeast cultivated anaerobically. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 48, 95-112.
- MOULIN (G.), RATOMAHENINA (R.) et GALZY (P.) (1976). — Sélection de levure en vue de la culture sur lactosérum. *Le Lait*, 553-554, 1-8.
- RATOMAHENINA (R.) (1975). — Sélection de souches de levures en vue de la culture sur lactosérum. Thèse de 3^e cycle, U.S.T.L. Montpellier.
-