Les diverses espèces de levures se différencient les unes des autres par les diastases, et plus particulièrement par les glucidases, qu'elles sécrètent.

On trouve dans les cellules de levure plusieurs diastases protéolytiques, dont la plus connue est l'*endotryptase*. Celle-ci, constituée probablement par un mélange de plusieurs diastases, se rapproche davantage de la trypsine que de la pepsine, car elle pousse la dégradation des matières albuminoïdes jusqu'au stade amino-acide (Géret et Hahn). Elle se distingue cependant de la trypsine, en ce qu'elle est favorisée par une réaction nettement acide (optimum : 0.2 % en HCl). Elle est gênée par les alcalis, les sucres, l'alcool à 10 %. Elle commence à agir à 5-6°, a comme optimum de température 45° et est détruite par chauffage d'une heure à 60°. L'endotryptase est une distase endocellulaire. Comme elle est capable cependant de liquéfier la gélatine, on doit admettre que dans certaines conditions, elle peut diffuser à travers la membrane cellulaire (Will), notamment lorsque la levure se trouve dans un état anormal (cellules mortes ou malades).

Le groupe des *estérases* comprend, à côté des enzymes des matières grasses (*lipases*), une série d'autres diastases intervenant dans la saponification des esters, de l'acide phosphorique (*phosphatases*), de l'acide sulfurique (*sulfatases*), etc. Ces différentes diastases se rencontrent dans la levure. Elles sont réversibles, c'est-à-dire susceptibles, suivant les besoins de l'organisme, de provoquer l'hydrolyse ou la synthèse des matières grasses et des esters.

La *lipase* de la levure, qui décompose les graisses en acides gras et en glycérine, paraît être endocellulaire : elle intervient dans l'utilisation des matières grasses que l'on rencontre dans le protoplasma, particulièrement à l'époque de la sporulation. Dans certaines levures cependant, elle est capable de diffuser à travers les membranes (Van Tieghem). Il en serait ainsi notamment pour divers Torulas (Rogers et Jensen).

Suivant la nature des corps hydrolysés, on divise les *glucidases* en *disaccharases* ou *polyases*, selon qu'elles transforment en hexoses les disaccharides (saccharose, maltose, lactose et tréhalose), les trisaccharides (raffinose) ou les polysaccharides (amidon, glycogène, inuline).

L'*amylase* transforme l'amidon en maltose et paraît formée par plusieurs diastases distinctes. Elle se rencontre dans de nombreuses espèces de moisissures (*Aspergillus oryzae, Amylomyces Rouxii*, etc.) et de bactéries (ferments butyriques, *Bacillus mesentéricus, B. subtilis*), mais rarement chez les levures (*Sch. Pombe, Sch. mellacei, levure Logos*). L'*inulase*, qui produit du lévulose à partir de l'inuline, ne se trouve non plus que tout à fait exceptionnellement (*Sch. Pombe* et *mellacei, S. marxianus*). Les levures renferment par contre un enzyme très voisin de l'amylase, la *glycogénase*, qui saccharifie le glycogène en donnant d'abord du maltose, puis du glucose. Cette diastase est endocellulaire et n'agit en conséquence que sur le glycogène produit par la levure elle-même.

Le raffinose est scindé en lévulose et mélibiose par la *raffinase* (diastase voisine de la sucrase), et le mélibiose est lui-même décomposé en glucose et galactose par la *mélibiase*. Certaines levures peuvent assurer la décomposition complète (levures basses de brasserie et de boulangerie, *S. pastorianus*, etc.) ; d'autres attaquent le raffinose, mais sont sans action sur le mélibiose (*Sch. Pombe, Sch. mellacei, levure Logos*).

La *sucrase* ou *invertase*, qui hydrolyse le saccharose en glucose et lévulose (sucre interverti), est la plus répandue de toutes les diastases. On la trouve chez beaucoup de moisissures et chez la plupart des levures. Quelques-unes de ces dernières n'en contiennent cependant pas (*S. ostosporus, S. apiculatus, S. Rouxii*, etc.) et ne peuvent en conséquence faire fermenter le saccharose. Chez certaines espèces, la diastase demeure à l'intérieur de la cellule, mais dans beaucoup de cas elle peut diffuser à l'extérieur. La sucrase préfère les milieux acides (pH optimum : 5 environ). Elle agit déjà à 0°, a comme température optima 52° et est très rapidement détruite à 70°. La concentration saccharine la plus favorable est celle de 20 % ; le sucre interverti et le lévulose exercent une action retardatrice sur l'hydrolyse.

La *maltase*, qui transforme le maltose en 2 molécules de glucose, se retrouve dans différentes moisissures (*Asperpillus niger, A. oryzae, Amylomyces*, divers

Mucors) et dans beaucoup de levures. Elle n'existe pas dans *S. apiculatus, exiguus, marxianus, Jorgensenii.* Elle agit mieux en milieu neutre (pH optimum 6.6.) et à la température de 40°.

La *lactase* décompose le lactose en glucose et galactose. Elle ne se rencontre que chez un petit nombre de levures (levures des laits fermentés). Elle est plus répandue chez les moisissures.

La *tréhalase,* qui donne à partir du tréhalose, du glucose et du lévulose, a été rencontrée dans de nombreuses levures de bière et de vin (Kalantar).

La *zymase alcoolique* dédouble les hexoses en alcool et en gaz carbonique. Cette diastase est un produit complexe, constitué sans doute par un mélange de divers enzymes. Harden et Young ont montré qu'elle était constituée, au moins, par une partie colloïdale dont les propriétaires fermentaires disparaissent par chauffage, l'*apozymase ;* et par une partie non colloïdale résistant à la chaleur, la *cozymase.* Cette dernière paraît avoir la structure d'un éther organique phosphoré : ce serait, d'après des travaux récents, un adénylphosphate de magnésie.

La zymase est très fragile. Abandonné à lui-même, le suc de levure perd rapidement son activité, par suite de la destruction de l'apozymase par les protéïnes de la levure et de l'hydrolyse de la cozymase par la lipase.

La zymase préfère un milieu alcalin. L'addition de carbonate et de phosphate de soude exerce un effet favorable sur le pouvoir fermentatif de la diastase. Par contre, l'action de la zymase est arrêtée par le sublimé à 0.1 %, l'alcool à 15 %, le formol à 10 %.

La diastase est détruite par chauffage à 55° ; à l'état sec et si la dessication a été effectuée sous vide à 40°, elle peut toutefois résister jusqu'à 140°. Le pouvoir ferment est maximum vers 12 - 14° (Buchner). La température optima paraît être plus élevée, mais l'attaque par les protéases s'accroît quand la température augmente. La meilleure concentration sucrée est de 25 % environ.

Autolyse de la levure.

Si la quantité de levure est inférieure à 40 % du poids du sucre, la fermentation s'arrête franchement quand le sucre est épuisé. Mais lorsque le poids de levure est supérieure à 40 % de celui du sucre, la fermentation continue, d'autant plus longtemps que la quantité de levure employée est plus grande. La levure vit alors sur sa propre substance : c'est le phénomène d'*autophagie* ou d'*autolyse.*

Deux phases peuvent être distinguées dans l'autolyse : la fermentation du glycogène et la protéolyse. La glycogénase contenue dans la cellule agit sur le glycogène, qu'elle fait fermenter en donnant de l'alcool, du gaz carbonique, de la glycérine, et, suivant Salkowski, de l'acide succinique.

En même temps, les matières azotées sont attaquées par diverses protéases. Parmi les produits de cette digestion, on trouve des bases nucléiques, de la valine, de la leucine, de la guanine, de la lysine, de l'arginine, de l'acide aspartique et de la choline (Kutscher).

L'autolyse est facilitée par l'élévation de la température et une réaction légèrement acide du milieu (pH optimum = 6). Certains sels (phosphates acides, NaCl, acétates, citrates, arséniates favorisent également le phénomène tandis que d'autres (phosphates neutres, nitrates, sels ammoniacaux) le retardent ou le gênent (Lintner).

Action des Agents Physiques et Chimiques

Température.

En général, à l'état humide, les globules de levure sont tués par un chauffage de quelques minutes à 50-60°. Certaines espèces peu résistantes périssent déjà à 45-48°, tandis que d'autres ne sont détruites qu'à 70°. Will a trouvé des levures sauvages pouvant supporter pendant 30 minutes le chauffage à 70°. La

température mortelle varie aussi selon la composition du milieu. La résistance à la chaleur est moindre en milieu acide qu'en milieu alcalin. Elle est plus grande en présence de sucre ou d'amidon: ainsi, dans le pain, la température mortelle serait située aux environs de 68°, d'après Wills.

A l'état de spores, les levures supportent des températures de 5 ou 10° supérieures à celles auxquelles les globules périssent. La levure sèche résiste bien mieux que la levure humide : elle supporte sans périr un chauffage de 5 minutes dans un courant d'air porté à 100°, et même 120° pour certaines espèces.

Le froid a peu d'action sur les levures : on a pu refroidir des cellules à 150 degrés au-dessous de 0 dans l'air liquide, sans altérer leur vitalité, à condition que les variations de température soient progressives et non brutales.

Les températures extrêmes auxquelles la fermentation peut avoir lieu sont voisines de 0° et de 40°. Sauf de très rares exceptions, toute fermentation cesse au-delà de 40-42°. Cochran et Perkins (1) ont cependant étudié des levures qui, chauffées dans un sirop à 58°, pendant 30 minutes, continuaient à faire fermenter le liquide.

La température optima de fermentation est généralement comprise entre 25 et 35°C. Elle varie suivant les races de levure et la composition du milieu. Pour les levures de distillerie des pays tropicaux, elle atteint 32-35°. Il est d'ailleurs possible d'acclimater les races des régions tempérées, dont l'optimum thermique est relativement bas, aux températures élevées des pays chauds (Chaturvedi, Owen).

Mmes E. Bachrach et J. Roche ont montré que l'action prolongée du chlorure de potassium entraînait un déplacement de l'optimum thermique vers les hautes températures. Elles ont constaté qu'au bout de 10 mois de culture sur eau de levure additionnée d'une forte dose de KC (10 %), la levure étudiée avait sa température optima de multiplication cellulaire élevée de 3°. Le même fait a aussi été observé avec le ferment lactique (élévation de 5 à 6° au bout de 3 ans). (2)

La zone des températures optima est, en somme, très voisine de celle des températures mortelles D'autre part, l'action toxique des constituants du moût qui gênent le fonctionnement de la levure (alcool, acides organiques, etc.), se trouve en général considérablement augmentée par l'élévation de la température. Comme la fermentation alcoolique s'accompagne d'un fort dégagement de chaleur (20 à 23 calories par 180 gr. de sucre détruit, d'après (Bouffard), qui élève la température du liquide, on comprend que certaines fermentations commencées à une température trop élevée puissent s'arrêter brusquement en pleine marche.

On est souvent amené, en brasserie et en vinification, à choisir des températures de fermentation très inférieures aux températures optimales, soit pour gêner le développement de certains organismes étrangers, soit pour donner au liquide fermenté des caractères particuliers au point de vue du goût. Par exemple, dans la préparation de la bière par fermentation basse, on descend à 4-10° en cuverie et à 0.5-4° pendant le séjour du liquide dans les caves de garde.

Lumière.

La lumière ne paraît pas avoir une action très marquée. Cependant, d'après Lubimenko (1), elle ralentirait la multiplication cellulaire. L'énergie fermentative ainsi que la quantité d'alcool formée seraient plus faibles pour les levures éclairées que pour celles qui se développent à l'abri de la lumière, la différence étant d'autant plus prononcée que la température est plus élevée. La proportion d'acides produits (surtout acides volatils) serait aussi plus forte et celle de glycérine moindre. D'après Owen (3), une courte exposition aux rayons

(1) Int. Sug. J. XXXV, 26, 1933.
(2) C. R. CXCIV, 1023, 1932.
(3) Ind. Eng. Chem. VI, 480, 1914.

ultra-violets augmenterait la rapidité et l'efficience de la fermentation des mélasses de canne.

Oxygène.

Dans des expériences restées célèbres, Pasteur a montré que la levure, ensemencée dans une solution sucrée placée dans une cuvette plate, brûle le sucre en gaz carbonique et en eau, se reproduit abondamment et ne donne que des traces d'alcool. Ensemencée au contraire dans une solution privée d'air par ébullition et conservée à l'abri de l'air, elle se multiplie beaucoup moins que dans le cas précédent, mais produit uniquement la fermentation alcoolique. Pasteur en conclut que : « la fermentation est la conséquence de la vie sans air, sans gaz oxygène libre... L'être aérobie fait la chaleur dont il a besoin par les combustions résultant du gaz oxygène libre ; l'être anaérobie fait la chaleur dont il a besoin en décomposant une matière dite fermentescible, qui est de l'ordre des substances explosibles susceptibles de dégager de la chaleur par leur décomposition ».

La théorie pastorienne, après avoir été contestée pendant longtemps par certains physiologistes (Cochin, Brown), a reçu au cours de ces dernières années une éclatante confirmation, à la suite notamment des travaux de Meyerhoff.

Il y a antagonisme entre la « fonction végétale » et la « fonction ferment » de la levure : la prolifération des cellules est accrue, mais l'intensité de la fermentation alcoolique est réduite en présence d'air. Cette réduction est toutefois assez variable suivant les races de ferments : relativement minime pour les levures dont l'intensité respiratoire est faible (levures basses de brasserie), elle augmente fortement lorsque le pouvoir respiratoire est très grand (Torulas), ainsi que le montrent les chiffres suivants obtenus par Meyerhoff :

	QO_2	$Q^{O_2}_{CO_2}$	$Q^{N_2}_{CO_2}$
Levure basse H	14.3	130	156
— race 12	92.0	104.5	310
Mycoderme	21.5	4.6	20.6
Torula	179.0	18	270

QO_2 (coefficient respiratoire) indique le nombre de mmc. d'O consommé par mgr. de levure sèche et par heure ; $Q^{O_2}_{CO_2}$, le nombre de mmc. de CO_2 dégagé par le même poids de levure par heure dans une solution sucrée à 5 %, en présence d'air ; $Q^{N_2}_{CO_2}$, la même quantité de CO_2 dégagé dans les mêmes conditions, dans une atmosphère d'azote.

Les meilleurs rendements sont obtenus industriellement lorsqu'on oblige la levure à vivre en vie anaérobie, par exemple en opérant en cuves fermées sous pression d'acide carbonique. Un minimum d'oxygène est cependant nécessaire comme excitant cellulaire : placées dans un milieu de culture complètement dépourvu d'oxygène, les levures ne tardent pas à dégénérer et à mourir (Cochin, Brown).

Acides.

Les levures préfèrent un milieu acide. Le pH optimum, correspondant au maximum de développement des cellules, varie avec la race et les conditions de culture. Il est généralement situé entre 4.5 et 5.0. L'optimum se rapproche de la neutralité, lorsque les conditions de culture deviennent défavorables (élévation de la température, pauvreté du milieu, addition d'antiseptiques, etc). Les bactéries sont beaucoup plus sensibles à l'acidité que les levures, surtout les bactéries putréfiantes, dont la zone de pH optimum est compris entre 6 et 7 et le pH minimum entre 4.4 et 5 habituellement. Dans la technique industrielle, on met à profit cette différence de sensibilité des ferments pour favoriser certains d'entre eux.

Les acides minéraux agissent surtout en fonction du pH. La fermentation est arrêtée par 0.5 % d'acide chlorhydrique, 0.7 % d'acide sulfurique, 0.75 % d'acide phosphorique.

Certains acides organiques ont une action beaucoup plus prononcée. Nous dirons quelques mots de ceux que l'on trouve le plus souvent dans les fermentations de mélasse de canne ; acides formique, acétique, butyrique, lactique, citrique et oxalique.

Johannessohn (1) a constaté que l'acide formique et ses homologues supérieurs, à très faible dilution, accéléraient la fermentation alcoolique et que la concentration optima de ces acides était en rapport direct avec le poids moléculaire. Cette concentration serait de 5.06 gr par 1, par exemple, pour l'acide formique, de 6.6 mg pour l'acide acétique, etc. Si elle augmente, la fermentation est gênée, puis s'arrête. La quantité d'acide qui arrête complètement le fonctionnement de la zymase n'est, toutefois, pas suffisante pour tuer la levure.

Suivant Henneberg, une dose de 0.08 % d'acide formique affaiblirait déjà la levure et une dose de 0.2 % arrêterait son développement. C'est à la présence de ce corps qu'il faut sans doute attribuer une partie des difficultés que l'on éprouve à faire fermenter certaines mélasses, notamment celles de raffinerie où il a été trouvé jusqu'à 0.791 % d'acide formique (Zerban).

Les différentes levures sont inégalement sensibles à l'action de l'acide acétique. Meissner (2) a constaté, par exemple, qu'une dose de 0.25 % de cet acide faisait disparaître complètement les levures Saaz et Frohberg, une dose de 0.375 % la levure Logos, tandis que 15 races de levures de vin se montraient capables de terminer la fermentation en présence de 1 % d'acide. Les effets nocifs de l'acide acétique varient également, ainsi que l'a montré Zikes, suivant que l'acide est ajouté au moût ou prend naissance au cours de la fermentation.

Les levures sont très susceptibles à l'action des acides citrique et oxalique, qui peuvent être produits par des moisissures et des bactéries au cours de la conservation des mélasses. Kayser a constaté que l'addition de 0.2 à 0.4 % d'acide citrique ralentissait fortement la fermentation. Suivant les observations de Buromsky, le développement relatif en présence de 1 % d'acide citrique serait, pour différentes levures : race XII (Berlin) 1.9, Logos 7.2, Frohberg 3.6. Saaz 1.4, *S. ellipsoideus* 21.3, *S. pastorianus* 10.3.

L'acide oxalique, quand sa proportion est inférieure à 0.052 %, intervient comme stimulant de la levure, mais à des doses supérieures il est nuisible et tue les cellules en 2 heures à 0.4-0.5 %. Suivant Lebedeff l'action est beaucoup plus sensible dans les solutions de sucre pur : l'acide oxalique serait déjà nuisible à 0.001 % et les cellules tuées à 0.1-0.2 %. Bien que les sels de l'acide oxalique soient beaucoup moins nocifs que l'acide libre, l'oxalate de Ca se montre cependant toxique à la dose de 0.25 %.

Neale et Maerker ont trouvé que l'acide butyrique retardait le développement de la levure à la concentration de 0.05 % et l'arrêtait complètement à celle de 1 %. Müller cependant, a observé qu'une dose de 0.5 % d'acide butyrique ne ralentissait que légèrement la fermentation, mais affectait beaucoup plus fortement la croissance cellulaire. Celle-ci serait déjà gênée à la faible concentration de 0.005 %, d'après Juslin. L'acide butyrique, aux doses relativement faibles produites au cours de la conservation des mélasses qui ont été exposées à l'humidité, peut en conséquence être cause des fermentations paresseuses de certains moûts.

Les levures montrent, par contre, une grande tolérance vis-à-vis de l'acide lactique, qui constitue un des antiseptiques les plus couramment utilisés en distillerie de matières amylacées. Hayduck, par exemple, a observé que ce corps n'exerce une action retardatrice sur les levures que s'il atteint une concentration de 1.35 %. A 0.5 %, il stimule le développement cellulaire. Il en est du moins ainsi lorsque la température demeure relativement basse. Mais si elle dépasse 40° C au cours de la fermentation, l'acide lactique peut se montrer très nuisible et réduire fortement le rendement en alcool, ceci étant dû en partie

(1) Biochem. Z. XLVII, 97

(2) Erlangener Dissert, Berlin 1897.

à l'accroissement de la toxicité de l'acide avec l'élévation de la température, mais surtout à la prépondérance prise par les bactéries lactiques.

Ashby a étudié, à la Jamaïque, l'action des acides acétique, lactique et butyrique, à diverses concentrations, sur une levure à bourgeonnement (*Saccharomyces*) et sur une levure à scissiparité (*Schizosaccharomyces*) de rhummerie, ensemencées dans un moût de jus de canne et de vinasse, ayant une densité de 15° Brix et une acidité initiale de 0,24 % en SO_4H_2. Il a obtenu les résultats suivants :

Levure	Acide	Qnantité %	Pourcentage de sucre fermenté en					
			1	2	3	4	5	6 jours
Saccharomyces. . . .	Acétique	0.2	11	26	40	49	55	64
—	—	0.5	3	6	12	36	48	62
—	—	1.0	Pas de fermentation					
Schizosaccharomyces .	—	0.2	6	21	40	54	64	78
—	—	0.5	4	16	37	52	63	76
—	—	1.0	4	18	30	42	55	69
Saccharomyces. . . .	Lactique	0.2	12	30	44	55	64	72
—	—	0.5	12	29	43	53	64	72
—	—	0.7	9	23	36	48	60	70
Schizosaccharomyces .	—	0.2	7	21	37	51	67	85
—	—	0.5	4	18	34	50	65	79
—	—	0.7	6	24	40	56	72	89
—	—	1.4	3	20	36	52	66	80
Saccharomyces. . . .	Butyrique	0	21	44	69	86	100	—
—	—	0.1	15	31	54	69	81	93
—	—	0.15	Pas de fermentation					
Schizosaccharomyces .	—	0	10	28	56	83	100	—
—	—	0.15	5	14	37	60	83	100
—	—	0.4	2	3	6	9	13	20
—	—	0.5	Pas de fermentation					

Alcools.

Le pouvoir antiseptique des alcools s'accroît rapidement à mesure que le nombre d'atomes de carbone augmente. Ainsi, Regnard a observé qu'une solution de 2 gr. de glucose dans 250 cc. d'eau ne fermentait plus en présence de :

Alcool méthylique	20 %
— éthylique	15 —
— propylique	10 —
— butylique	2.5
— amylique	1
— caproïque	0.2
— caprylique	0.1

Les diverses levures se montrent très inégalement résistantes aux fortes concentrations alcooliques. Dès qu'il atteint 6 à 8°, l'alcool éthylique devient antiseptique pour certaines d'entre elles, tandis que d'autres races peuvent produire 15 à 16 % d'alcool sans être incommodées. Went et Geerligs ont observé, par exemple, que le *Saccharomyces Vordermannii*, trouvé dans les distilleries de Java, pouvait faire fermenter rapidement de solutions renfermant 18-19 % de glucose. Inui a décrit, sous le nom de *Saccharomyces Awamonii*, une levure dont l'activité commence à être gênée seulement par 13 % d'alcool et n'est complètement arrêtée qu'à partir de 20 % d'alcool. D'après Gray (1),

(1) J. Bacteriology XLII, 561, 1941.

la tolérance envers l'alcool ne serait pas particulière au genre ou à l'espèce, mais dépendrait uniquement de la race de levure.

L'action de l'alcool est sous la dépendance étroite de la température. Ainsi, Muller-Thurgau (1) a noté, pour la levure particulière qu'il a étudiée, que la fermentation était arrêtée par les quantités d'alcool ci-après (en poids) :

3.8 %	à la	température de	36° C
7.5 —		—	27°
8.8 —		—	18°
9.5 —		—	9°

Antiseptiques.

On désigne sous le nom d'antiseptiques des substances qui entravent le développement des ferments. Suivant la dose employée, ils peuvent paralyser certains phénomènes vitaux (reproduction, fermentation, etc.) ou provoquer la destruction complète des cellules. A faible dose, ils gênent la multiplication des levures et accroissent le pouvoir ferment.

Le mode d'action des antiseptiques est très variable. Ils peuvent agir comme oxydants (permanganate de K, hypochlorites), comme hydrolysants (acides forts), en coagulant les colloïdes protoplasmiques (phénols, créosote) ou en formant avec eux des combinaisons d'absorption (sublimé corrosif, métaux lourds), etc.

L'action antiseptique dépend non seulement de la nature et l'origine des microbes ou de la levure, mais encore de nombreux autres facteurs : température, réaction, composition chimique du milieu, etc. Elle est augmentée par l'élévation de la température, l'acidité du moût et sa pauvreté en matières nutritives. Biernacki indique, pour divers produits, les concentrations accélérant et empêchant la fermentation :

	Concentration la plus faible empêchant la fermentation.	Concentration la plus forte accélérant la fermentation.
Sublimé	1 : 20.000	1 : 300.000
Permanganate de K.	1 : 10.000	1 : 100.000
Brome	1 : 4.000	1 : 50.000
Thymol	1 : 3.000	1 : 20.000
Acide benzoïque	1 : 2.000	1 : 10.000
— salicylique	1 : 1.000	1 : 6.000
Quinine	1 : 400	1 : 8.000
Carbol	1 : 200	1 : 1.000
Acide sulfurique	1 : 100	1 : 10.000
— borique	1 : 25	1 : 8.000

Les levures peuvent être habituées à supporter des doses croissantes d'antiseptique. Elles acquièrent ainsi un état physiologique nouveau, qui peut persister même après une série de cultures et se manifester par une variation dans la composition des produits formés. Dans le cas d'acclimatement aux fluorures, par exemple, la levure s'enrichit de plus en plus en substances minérales : la chaux qui apparaît à l'intérieur de la cellule insolubilise le fluor, sous forme de sel de chaux. Il y a réduction de la quantité de glycérine et d'acide succinique formés.

Les antiseptiques les plus utilisés dans les industries de fermentation sont l'anhydride sulfureux (vinification), l'acide fluorhydrique et les fluorures (distillerie), l'acide sulfurique dilué, le lait de chaux, les bisulfites, le formol (nettoyage de la cuverie).

Toxines.

Hayduck a signalé le premier, en 1909, l'existence dans la levure d'une endotoxine capable de tuer celle-ci, lorsqu'on l'extrait des cellules et qu'on l'introduit dans le milieu de culture.

(1) In F. Fafar — Technical Mycology. London, 1898-1910.

Ferbach (1) a confirmé cette existence et observé que la substance toxique paraît jouer vis à vis de la levure, et aussi vis à vis des bactéries, le rôle d'un antiseptique. L'endotoxine de la levure partage avec certaines toxines connues la propriété de traverser les filtres de porcelaine et celle d'être détruite à la température de 100°. Mais elle se distinguerait nettement par sa volatilité : elle est facilement entraînée avec la vapeur d'eau, lorsqu'on distille les macérations toxines sous pression réduite, de manière à ne pas dépasser 40° (Fernbach).

Dans certaines conditions, les toxines produites par les levures pourraient se diffuser dans le liquide de culture et empêcher un nouveau développement du ferment dans ce milieu (solution *vaccinée* ou *immunisée*). Boulard (2) a indiqué un procédé pour obtenir ce résultat avec les boissons fermentées.

« Avec un liquide, tel qu'un moût de vin par exemple dosant 250 gr. de sucre par litre, on détermine une première fermentation par la méthode habituelle, avec une ou plusieurs levures. Losque la fermentation est bien déclarée et que 20 ou 30 gr. de sucre ont été transformés en alcool, on chauffe le liquide pendant une heure environ, à une température supérieure de quelques degrés seulement à la température mortelle des levures qui se trouvent dans le vin. En règle générale, il suffit d'atteindre 45° C. Le liquide est ensuite refroidi, puis ramené à la température optima de fermentation. Il est une fois encore ensemencé avec les mêmes levures, puis lorsque la fermentation est de nouveau nettement déclarée, on le chauffe une seconde fois comme il a été précédemment indiqué. Il suffit en général de 3 opérations de ce genre pour arrêter toute fermentation, et pour rendre le liquide infermentescible, même après addition d'une quantié importante de levure et alors que la dose de sucres non fermentés est encore supérieure à 150 gr. par litre ».

Ce phénomène paraît d'ailleurs très général, et il serait possible, par cette méthode, de vacciner des liquides quelconques avant leur complète transformation et de prévenir leur envahissement ultérieur par un ferment déterminé (Boulard).

Longévité des levures.

Les levures sont susceptibles de se maintenir longtemps dans les mêmes milieux sans périr. Duclaux, examinant, après 11 à 17 ans, de vieilles cultures de Pasteur, a observé que, sur 26 levures, 6 seulement ne pouvaient revivre. Klöcker a constaté qu'on retrouvait des cellules vivantes dans des solutions de saccharose et de moût de bière, après 20 et 30 ans. Enfin, Gayon et Dubourg ont examiné des vins fabriqués en 1810, 1818, 1819, 1832, 1836 et 1846 et constaté qu'ils renfermaient encore des levures capables de provoquer la fermentation alcoolique.

La faculté de conservation dépend d'ailleurs de plusieurs facteurs : race et origine de la levure, présence ou absence de lumière, milieu de culture, etc. D'après Will, les levures sauvages ont une vitalité plus prolongée que celles de culture, dont certaines races peuvent mourir très vite. La lumière solaire semble assez nuisible à la conservation. Ce seraient les levures vivant en aérobiose à la surface des liquides qui auraient la vitalité la plus grande, d'après Henneberg.

Culture, isolement et examen des Levures

Méthodes de culture.

On utilise, pour la culture des levures, les méthodes classiques de la bactériologie. Les appareils nécessaires sont : les tubes à essai, les tubes de Roux, les boîtes de Petri, les flacons d'Erlenmeyer, l'autoclave Chamberland, etc. et, pour les recherches physiologiques, les ballons de Pasteur, de Chamberland, de Feudenreich, les flacons de Hansen, etc.

Toutefois, contrairement aux bactéries, les levures demandent une réaction

(1) C. R. CXLIX, 437, 1909.
(2) C. R. CLXXXIII, 1422, 1926

légèrement acide. Les milieux de culture doivent être placés en couches minces, de façon à réaliser le maximum d'aération, si l'on veut obtenir la multiplication des cellules ; et, au contraire, en flacons profonds, si l'on désire provoquer la fermentation alcoolique. Les milieux liquides les plus communément employés sont les suivants :

Milieu de Pasteur :	Eau distillée	1.000 gr
	Sucre candi	20 —
	Tartrate d'Am.	0.1 -
	ou Carbonate d'Am.	1.0 -
	Cendres de levure	1.0 -

Cette solution a été utilisée par Pasteur dans la plupart de ses études sur la fermentation alcoolique.

Milieu de Hansen :	Peptone	1.0 gr
	Maltose	5.0 —
	Phosphate de K.	0.3 —
	Sulfate de Mg.	0.2 —
	Eau distillée	100.0 —
Milieu de Mayer :	Sucre	15.0 gr
	Phosphate de K.	5.0 —
	Sulfate de Mg.	5.0 —
	Phosphate de Ca.	0.5 —
	Nitrate d'Am.	0.75 -
	Eau distillée	1.000 cc.
Milieu de Laurent :	Sulfate d'Am.	4.71 gr
	Phosphate de K.	0.75 —
	Sulfate de Mg.	0.1 —
	Eau distillée	1.000

On peut ajouter un sucre fermentescible quelconque à cette solution, qui a été utilisée par Laurent dans ses travaux sur la nutrition hydrocarbonée des levures.

Pairault conseille, pour l'étude des levures de rhum, la solution suivante :

Sirop de batterie (densité 1.37)	170 gr
Malto-peptone de brasserie	1.5 cc.
Acide sulfurique concentré	5 gouttes
Mélange nutritif spécial	1 gr
Eau, q.s. pour faire	1 litre

Filtrer si nécessaire et stériliser 20 minutes à l'autoclave à 120°. La formule du mélange nutritif spécial est : Phosphate d'Am. : 100, sulfate de K. : 60, sulfate de Mg. : 10, phosphate acide de Ca. : 30.

On utilise aussi souvent comme milieux de culture : le moût de bière et les extraits de malt ; les jus de fruit ; les décoctions de carotte, pomme de terre, etc. ; l'eau de levure. Cette dernière se prépare en faisant bouillir 100 gr. de levure fraîche dans 1 litre d'eau distillée ; on filtre et stérilise. Pour obtenir une forte prolifération des cellules, il importe d'ajouter du sucre.

Comme milieux solides, on peut employer des tranches de pomme de terre, de navet, de carotte, etc., ou bien encore du moût de bière, des jus de fruit, que l'on additionne de 8 % de gélatine ou de 1.5 % de gélose.

L'étude de la sporulation des levures exige une technique spéciale. Tout d'abord, les cellules doivent être jeunes et bien nourries, ce que l'on obtient en cultivant la levure, pendant 48 h, environ, dans un milieu nutritif (moût de bière, par exemple) avec transferts répétés. Puis, les cultures sont soumises à une période d'inanition, par ensemencement sur bloc de plâtre ou dans un milieu peu nutritif.

Dans la *méthode d'Engel-Hansen*, on prépare un bloc de plâtre tronconique ou cylindrique, en gâchant du plâtre de Paris avec 3 parties d'eau. Le bloc est placé dans une boîte de verre, au fond de laquelle on met un peu d'eau distillée ou de moût de bière, montant jusqu'à la moitié environ de la hauteur du bloc

La boîte est recouverte d'un couvercle, sans que celui-ci empêche la libre circulation de l'air. Pour réduire les risques d'infection par les bactéries, on peut avantageusement remplacer la boîte de verre par un flacon de Hansen. Après que l'appareil a été stérilisé, par chauffage à 115° C pendant 1/2 h., on dépose la levure sur le plâtre au moyen d'un fil de platine stérilisé, et on porte à l'étuve à la température la plus favorable pour la sporulation (25 à 30° généralement). Au bout d'une centaine d'heures, la plupart des cellules ont formé des ascopores.

Dans la *méthode de Gorodkowa*, plus simple que la précédente et qui a donné d'excellents résultats à Guilliermond, on ensemence avec de la levure jeune et vigoureuse, un milieu gélatiné ayant la composition suivante :

Eau distillée	100.0	gr
Gélatine	1.0	—
Bouillon de viande	1.0	—
Chlorure de Na.	0.5	—
Glucose	0.25	—

La levure se développe vigoureusement après l'ensemencement, mais le bourgeonnement s'arrête bientôt, en raison de la faible quantité de sucre disponible. Au bout de 2 à 3 jours, la sporulation est terminée.

On a employé, pour obtenir la formation de spores, de nombreux autres milieux ; eau de levure, gélatine ou gélose nutritive, tranches de carotte, etc. La culture sur carotte est particulièrement indiquée pour les études cytologiques (Guilliermond). La plupart des levures, surtout celles du genre *Schizosaccharomyces*, produisent sur ce milieu des ascospores au bout de 6 à 8 jours et parfois en moins de temps.

Purification et isolement.

Le principe des méthodes actuellement appliquées, pour purifier et isoler les levures est de diluer le liquide contenant les microorganismes, de façon qu'il n'y ait plus qu'une seule cellule dans un volume donné du milieu de culture.

Méthode de Hansen. — On commence par diluer le mélange de levures avec de l'eau distillée. On prélève une goutte du liquide et l'on détermine au microscope, en se servant d'un verre quadrillé, le nombre de globules qui s'y trouvent. On dilue ensuite, de manière qu'il n'y ait plus qu'un seul globule dans chaque deuxième goutte. Il importe, au cours de ces manipulations, d'agiter fortement le contenu des flacons, pour avoir une séparation complète et une répartition uniforme des cellules dans l'eau de dilution. On ensemence alors une gouttelette de liquide dans une série de ballons contenant du moût stérile et on abandonne les ballons à eux-mêmes, jusqu'à ce que les colonies se soient développées sur le fond des récipients.

Les ballons montrant une seule tache de levure contiennent une culture pure, provenant d'une seule cellule.

Une seconde méthode, imaginée par Koch et perfectionnées par Hansen, utilise des milieux solides, à la gélatine ou à la gélose. Le mélange de levures est d'abord dilué dans de l'eau distillée et, après numération des globules, on ensemence une goutte dans un volume convenable de moût gélatinisé à 30° C. On agite bien, pour séparer les microorganismes, et on étale une goutte du mélange sur une lamelle quadrillée. On place celle-ci dans une chambre humide ordinaire ou, mieux, une chambre humide de Bottcher (encore appelée cellule de Van Tieghem et Lemonnier), que l'on peut examiner au microscope à tout moment. Il est facile en conséquence de suivre le développement des colonies par des observations microscopiques régulières. Lorsque l'observateur aperçoit un germe bien isolé il le marque au pointeur ou en inscrivant le numéro du carré de la lamelle quadrillée. Il ne reste qu'à porter la colonie dans un milieu liquide, après développement suffisant.

Un inconvénient de la culture en milieu solide est que la nourriture n'arrive aux germes que par diffusion et si lentement que ceux-ci peuvent mourir avant leur complet développement.