Méthode de Lindner. — Lindner, après avoir dilué la levure (dans un moût de bière, par exemple), de façon que le liquide ne contienne qu'un globule environ par goutte, touche successivement un certain nombre de points d'un vase stérile de Petri avec le liquide, que l'on a introduit dans une pipette flambée à fine ouverture. Partout où il y aura une seule cellule, il se formera une seule tache. Il est facile ensuite, à l'aide du fil de platine, de transporter les colonies dans un milieu nutritif en vue de les multiplier.

Un autre procédé, connu sous le nom de méthode des gouttelettes de Lindner, consiste à déposer, au moyen d'une plume métallique stérilisée, de petites gouttelettes de la dilution de levures, en lignes plus ou moins serrées, sur un porte-objet que l'on retourne sur la chambre humide, pour permettre l'examen microscopique.

La méthode de Lindner est plus simple que celle de Hansen, mais moins sûre. L'examen microscopique aidant, elle donne cependant de très bons résultats.

Examen des levures.

Numération des cellules. — On compte directement, à l'aide du microscope, les globules de levure qui se trouvent en suspension dans de l'eau contenue dans un très petit récipient de dimensions connues.

L'appareil généralement employé est constitué par un porte-objet sur lequel est fixé, avec du mastic, un couvre-objet de 0.2 mm. d'épaisseur, au milieu duquel on a pratiqué une ouverture circulaire. Celle-ci est fermée à sa partie supérieure par une lamelle s'appliquant exactement sur la cuvette. Le porte-objet est muni d'un réseau micrométrique. Chaque carré du réseau a 0.05 mm. de côté et constitue la base d'un prisme dont le volume est de 0.0005 mmc. On peut aussi utiliser un hemocymètre construit pour la numération des globules du sang.

Après avoir dilué et agité fortement le moût, de façon à obtenir une répartition homogène des levures, on dépose une goutte de liquide dans la cuvette de l'appareil, que l'on recouvre de sa lamelle, en évitant d'emprisonner de bulle d'air. On attend quelques minutes que les cellules en suspension se soient déposées et on effectue le dénombrement des globules (au grossissement de 300) dans des séries de carrés placés les uns à côté des autres. On fait alors une seconde préparation, sur laquelle on opère de même et on continue jusqu'à ce que le nombre moyen des cellules contenues dans 5 carrés, par exemple, ne varie plus notablement.

Développement des levures. — Il est facile de suivre au microscope le développement des levures. Après avoir dilué le milieu de culture, de façon qu'une goutte de celui-ci ne renferme plus qu'un petit nombre de cellules, on dépose une gouttelette du liquide sur un couvre-objet que l'on place dans une chambre humide de Bottcher. On peut ainsi conserver les cellules de levure pendant une période de 8 jours sans danger de contamination et suivre les phénomènes de bourgeonnement, sporulation, germination de spores, etc.

Pour observer le développement des ferments à différentes températures, on a construit de petites étuves (étuves de Ranvier, de Vidal, etc), qui s'adaptent sur la platine du miscroscope et qui sont maintenues à la température voulue par un régulateur. Mais, le plus souvent, on peut se passer de ces appareils, en mettant les cellules dans une étuve ordinaire pendant l'intervalle des opérations.

L'examen de la germination de spores présente certaines difficultés, du fait qu'il demeure toujours dans les préparations quelques cellules qui n'ont pas sporulé et qui se développent avant les ascospores. On peut parer à cet inconvénient en opérant comme suit. Une petite portion de la culture de levure, faite sur milieu solide (gélatine, carotte, etc.), est étendue au moyen d'une spatule sur un porte-objet stérile, et celui-ci est placé à l'étuve à 55 - 60° pendant 12 heures. Les cellules végétatives sont tuées et seules les ascopores survivent. On mouille alors la préparation avec un peu d'eau, et une goutte est placée dans la chambre humide. On peut aussi, comme l'a préconisé Hansen, traiter

la levure avec de l'alcool absolu ou de l'alcool à 50 % ; les cellules végétatives sont tuées en une minute, tandis que les ascopores résistent pendant longtemps.

Réactions microscopiques. — D'une manière générale, les levures vivantes ne prennent pas les matières colorantes usuelles. Cependant, traités avec le rouge neutre (en solution aqueuse à 1 : 10.000), les corspuscules métachromatiques sont légèrement teintés, tandis que le noyau et le protoplasma restent incolores. Les levures mortes se colorent facilement avec le bleu de métylène à 0.5 % ou le violet de gentiane.

Pour étudier le noyau, on opère d'abord la fixation, au moyen de la solution au picroformol de Bouin ou de la solution de Perenyi, puis on colore à l'hématoxyline ferrique de Heidenhain. On peut aussi, après fixation dans la solution de Bouin, employer la méthode à l'hématoxyline de Delafield.

La membrane de la levure se colore, après fixation, par le bleu de méthylène d'Ehrlich ou l'aniline de Hanstein.

La teinture d'iode (solution de Lugol) colore en rouge brun le glycogène, et l'acide osmique (solution de Flemming) en jaune ou brun noirâtre les globules gras. Pour distinguer ces derniers des gouttelettes d'huile, qu'on rencontre souvent dans les cellules des voiles, on traite successivement par l'alcool et l'acide sulfurique concentré : les gouttelettes huileuses prennent alors une teinte gris verdâtre, qui devient finalement brun noirâtre.

Propriétés physiologiques. — Pour déterminer la *résistance à l'acidité*, on peut employer la méthode très simple de Duclaux. Elle consiste à ensemencer, avec la levure, des tubes de moût sucré acidulé à 1, 2, 3 % d'acide tartrique. On note le temps écoulé entre l'ensemencement et l'apparition d'un trouble, dû au développement de la levure.

La *température optima* de fermentation est déterminée, en ensemençant les levures dans un moût très riche en sucre, pour être sûr qu'il restera du sucre non fermenté, et en portant à l'étuve à diverses températures, maintenues constantes (23°, 30°, 35°, etc.). Au bout d'une dizaine de jours, on dose le sucre restant. On opère d'une façon analogue pour connaître l'aptitude de la levure à faire fermenter les moûts riches en sucre. On ensemence un moût renfermant 30 % de glucose et on dose le sucre restant après fermentation.

L'aptitude à faire fermenter les divers sucres constitue un caractère très important pour la distinction des levures. On peut aisément se rendre compte de cette propriété au moyen de la méthode de Lindner. On place dans une chambre humide ordinaire une goutte de solution aqueuse de levure à l'aide du fil de platine, on ajoute une petite quantité de sucre à étudier, préalablement bien pulvérisé. On recouvre avec la lamelle couvre-objet, dont on ferme les côtés avec un peu de vaseline, et on porte à l'incubateur. En examinant le lendemain la préparation au microscope, l'apparition ou l'absence de bulles de gaz carbonique indique si le sucre est attaqué par la levure. Pour s'assurer qu'il s'agit bien de bulles de CO_2, on peut laisser tomber quelques gouttes de potasse caustique sur le pore-objet : la bulle de CO_2 se contracte et disparaît. Il est indispensable d'opérer l'ensemencement avec une trace imperceptible de levure : autrement, le glycogène contenu dans les cellules pourrait donner lieu à un dégagement d'acide carbonique.

On peut aussi ensemencer la levure à étudier dans des solutions de sucre inverti, de saccharose, etc., et suivre, à l'aide du polarimètre, les variations de la rotation polarimétrique du liquide. On se rend ainsi compte de la disparition plus ou moins rapide des sucres en C_6, de la vitesse d'interversion des sucres en C_{12}, etc.

La détermination du *pouvoir ferment* et de l'*activité* de la levure, qui présentent une importance toute particulière au point de vue industriel, se fait par différentes méthodes. On peut effectuer le dosage de l'alcool ou du sucre au cours du processus de la fermentation, mais ceci présente l'inconvénient de demander beaucoup de temps, si de nombreuses déterminations sont nécessaires.

Il est plus commode de doser, par voie volumétrique ou gravimétrique, la quantité d'acide carbonique dégagé. Le dosage volumétrique exige l'emploi

d'un appareil spécial pour recueillir tout le gaz produit pendant la fermentation : on peut se servir d'un azotomètre ordinaire, que l'on garnit de mercure, pour éviter l'absorption de gaz qui se produirait avec l'eau ou les autres liquides. Plus simplement, on peut se contenter de faire des pesées successives du ballon à fermentation, muni d'une fermeture spéciale permettant le libre dégagement du gaz carbonique et retenant la vapeur d'eau entraînée, la valve de Meissl ou celle d'Alwood, par exemple, qui obligent le gaz à barboter dans de l'acide sulfurique avant de s'échapper dans l'athmosphère.

Dans l'essai commercial des levures, on délaie 5 gr. de levure pressée (ou 50 gr. de levure liquide) avec 400 cc. de solution de sucre à 10 % dans de l'eau distillée. On introduit dans un flacon à fermentation, on bouche avec une fermeture à fermentation et on pèse le flacon. On place ensuite celui-ci dans un bain-marie ou une étuve rigoureusement réglée à 30°C. Au bout de 24 h., on pèse de nouveau et la perte de poids en gr. d'acide carbonique représente le pouvoir ferment.

L'activité, ou *pouvoir impulsif*, de la levure se détermine comme suit, par la *méthode de Meissl*.. On pèse une petite quantité de levure (1 gr.) et on la dilue avec 50 cc. de solution sucrée, à laquelle on a ajouté des sels nutritifs (1), dans une petite fiole à fermentation. On pèse le tout. On place l'appareil pendant 6 heures dans une étuve à 30°C et, après passage d'un courant d'air pour chasser l'acide carbonique qui se trouve encore dans la fiole, on pèse à nouveau. La perte de poids, calculée en gr. pour 100 gr. de levures, est le nombre qui mesure le pouvoir impulsif. Meissl appelle levure normale celle qui, dans ces conditions, dégage 1,75 gr. de CO_2, et lui donne la valeur de 100.

Conservation des levures.

Les travaux de Hansen ont montré qu'il était possible de conserver pendant longtemps les levures dans des solutions de saccharose pur, à 10 %. La plupart des espèces peuvent ainsi survivre pendant des périodes variant de 15 à 17 ans. Holm recommande la solution suivante :

Saccharose	10 gr.
Tartrate d'Am.	0.5—
Phosphate monopotassique	0.1—
Sulfate de Mg.	0.2—
Eau : quantité suffisante pour	100 cc.

On emploie généralement pour conserver les levures, le flacon de Hansen.

Un autre procédé, préconisé par Will, consiste à dessécher la levure, de façon qu'elle ne renferme plus que 15 à 20 % d'eau, et à la mélanger avec de la silice pulvérisée, du plâtre de Paris et du charbon. Le mélange est séché à 40° et placé dans des récipients hermétiquement clos. Par cette méthode, on a pu conserver pendant 9 ans certaines levures. Au cours de cette période, les levures forment des ascopores (Hansen).

Il est prudent de regénérer les levures conservées au laboratoire de temps à autre (tous les mois par exemple), par réensemencement dans de nouveaux tubes de milieu sucré stérile.

Identification et classification.

Le polymorphisme et la variabilité des propriétés physiologiques des levures rendent difficiles la caractérisation de l'identification des espèces. Grâce aux travaux de Hansen, nous pouvons cependant arriver à différencier celles-ci avec une précision très satisfaisante. Hansen a utilisé comme caractères distinctifs : la forme et les dimensions des cellules à différentes températures et dans différents milieux ; la forme des ascospores et leur mode de germination ; les tempéraures optimales et extrêmes de bourgeonnement, de sporulation et formation du voile ; l'aspect du voile et des cultures sur milieux solides (agar, gélatine) ; les propriétés biochimiques, et plus particulièrement l'action sur les

(1) La solution sucrée se compose de 400 gr. de sucre raffiné, 25 gr. de phosphate monoammonique et 25 gr. de phosphate mono -potassique. On dissout 5 gr. du mélange dans 50 cc. d'eau de puits.

différents sucres. Lindner a ajouté : l'aspect des « colonies géantes », obtenues en inoculant une large plaque de gélatine en son milieu.

Les caractères les plus importantes sont les températures auxquelles se forment les voiles et les ascospores. Aussi, lorsqu'une levure ne produit pas de voile ou ne donne pas de spores, son identification devient-elle beaucoup plus délicate, sinon impossible.

Nous donnons ci-après la classification de Hansen, modifiée par Guilliermond.

Les levures sont divisées en deux familles : les *Saccharomycétacées*, ou levures vraies, qui forment des ascospores — et les *Non-Saccharomycétacées*, ou non-levures, qui ne donnent pas de spores.

Levures vraies.

Elles se subdivisent en 5 groupes :

1er groupe. — Levures à cellules cylindriques, rectangulaires ou ovales, se multipliant par cloisonnement transversal. Asques à 4 ou 8 ascopores, résultant généralement d'une conjugaison isogamique. Levures végétant sur moût de bière sous forme de dépôt. Ce groupe ne renferme qu'un seul genre : *Schizosaccharomyces.*

2e groupe. — Levures se multipliant par bourgeonnement. Asques provenant d'une conjugaison (parfois rudimentaire). Ce groupe comprend les genres :

Zygossaccharomyces : asques résultant d'une copulation hétérogamique ; ascospores à membrane épaisse et lisse ;

Debaromyces : asques résultant d'une copulation le plus souvent hétérogamique ; ascospores globuleuses, à membrane verruqueuse ;

Nadsonia : asques dérivées par bourgeonnement d'une cellule formée par conjugaison hétérogamique ; ascospores à membrane verruqueuse plus ou moins épaisse ;

Schwanniomyces : traces de conjugaison ; ascospores à membrane verruqueuse, formée de deux parties inégales séparées par un anneau saillant ;

Torulaspora : cellules arrondies, ressemblant à celles des *torulas*, avec un large globule oléagineux au centre ; traces de conjugaison dans la formation des asques.

3e groupe. — Levures se multipliant par bourgeonnement, formant dans les solutions sucrées d'abord un dépôt, puis un voile plus ou moins muqueux, sans occlusions d'air ; ascospores lisses, rondes ou ovales à 1 ou 2 membranes, germant par bourgeonnement. Produisent généralement de l'alcool.

Ce groupe comprend les genres :

Saccharomycodes : cellules se divisant par un processus intermédiaire entre le bourgeonnement et la scissiparité, ascospores à une seule membrane, germant sous la forme d'un tube ;

Saccharomycopsis : ascospores à deux membranes, germant par bourgeonnement ;

Saccharomyces : cellules rondes, ovoïdes, ellipsoïdes ou oblongues, ascospores à une seule membrane, germant par bourgeonnement, avec parfois formation d'un mycelium rudimentaire ;

Hansenia : cellules apiculées, c'est-à-dire pourvues à l'une de leurs extrémités ou aux deux d'une petite pointe, qui les fait ressembler à un citron ; ascospores hémisphériques en forme de chapeau, à rebord saillant.

Le genre *Saccharomyces*, le plus important au point de vue des industries de fermentation, se subdivise en six sous-groupes :

a) Levure faisant fermenter le dextrose, le maltose et le saccharose, mais non le lactose : *S. cerevisiae, carlsbergensis, pastorianus, intermedius validus ellypsoideus, turbidans, willianus, Vordermanii, Sake etc.*

b) Levures faisant fermenter le dextrose et le saccharose, mais non le maltose ni le lactose : *S. marxianus, exiguus, mandshuricus, Zopfii, coreanus,* etc

c) Levures faisant fermenter le dextrose et le maltose, mais non le saccharose ni le lactose : *S. Rouxii Soja, Lindnori, Mangini, Chevalieri,* etc.

d) Levures faisant fermenter le dextrose, mais non le maltose, le saccharose ni le lactose : *S. mali Duclauxi, unisporus, etc.*

e) Levures faisant fermenter le lactose : *S. lactis, fragilis,* etc.

f) Levures ne produisant pas d'alcool et dont les caractéristiques de fermentation sont peu connues : *S. conglomeratus, theobromae,* etc.

4e groupe. — Levures à bourgeonnement, formant dès le début, sur milieu sucré, un voile sec et opaque, avec occlusions d'air. Ascospores caractéristiques, munies d'une sorte de membrane et souvent d'un rebord saillant. Le plus souvent, les espèces de ce groupe ne donnent pas d'alcool, mais produisent des esters aromatiques. Le groupe comprend les genres :

Pichia : cellules souvent cylindriques ; ascospores hémisphériques, irrégulières ou anguleuses ; mycelium rudimentaire, assez développé ;

Willia : Ascospores en forme de citron ou de chapeau, pourvues d'un rebord ou d'un anneau saillant.

5e groupe. — Levures à bourgeonnement dont les affinités sont mal connues. Ascospores fusiformes. Ce groupe comprend les genres :

Monospora : asques à une seule ascospore en forme d'aiguille, germant latéralement par un bourgeonnement ;

Nematospora : asques avec plusieurs ascospores fusiformes, terminées par un cil.

Non-levures.

Cette famille, qui groupe toutes les levures ne formant pas d'ascospores et dont la place dans la classification est incertaine, comprend les genres suivants :

Torula : Cellules généralement sphériques, possédant souvent au centre un gros globule oléagineux. Les espèces de ce genre forment très souvent un voile (ou dans certains cas un anneau), mais seulement après fermentation. Les voiles sont toujours visqueux et sans bulles d'air. Un certain nombre de *torulas* contiennent des pigments rouges (levures rouges ou roses), plus rarement noirs ou bruns.

Pseudosaccharomyces : Cellules à forme apiculée.

Mycoderma : Cellules le plus souvent allongées, cylindriques, tendant à rester réunies en minces chaînettes. Elles forment dès le début de la culture sur moût de bière des voiles plissés, remplis de bulles d'air. Certaines espèces renferment un pigment rouge ou rose. Les mycodermes végètent normalement au contact de l'air et sans donner d'alcool.

Cryptococcus : Levures ressemblant aux Torulas, parasites de l'homme et des animaux.

Champignons à forme levure.

Ils comprennent des espèces appartenant aux groupes les plus divers. Les plus intéressants au point de vue des industries de fermentation sont les genres *Endomyces, Monilia, Oïdium.*

Endomyces. — Champignons formant sur moût de bière, dès le début, un voile épais, duveteux, constitué par un mycelium typique, se désarticulant en arthrospores. Les cellules issues du bourgeonnement des articles du mycelium donnent des asques renfermant 4 ascospores.

Oïdium. — Champignons présentant les mêmes caractéristiques que les précédents, mais ne produisant jamais d'asques.

Monilia. — Champignons végétant sur moût de bière, sous forme d'un voile mycodermique, plus rarement d'un anneau, d'abord composé par des levures,

puis un mycelium typique, donnant naissance par bourgeonnement latéral ou terminal à des levures et ne produisant jamais d'asques. Parfois le mycelium se désarticule en arthrospores.

Les levures les plus importantes au point de vue des industries de fermentation appartiennent aux genres *Saccharomyces*, qui englobe la plupart des races de culture, et *Schizosaccharomyces*, qui comprend quelques levures intéressantes des pays chauds. Nous examinerons ci-après les principales espèces intervenant dans la fermentation des produits de la canne à sucre.

Principales levures de rhummerie

Schizosaccharomyces Pombe Lindner.

Cellules généralement rectangulaires, arrondies aux extrémités, mesurant 7 x 4.5 mus en moyenne. Elles se multiplient par cloisonnemeni, la cloison transversale divisant la cellule en parties inégales. Dans certaines conditions (absence d'air), les cellules s'allongent beaucoup et peuvent présenter de nombreuses cloisons transversales, sans séparation des éléments. Parfois, il se forme des ramifications latérales. Les cellules ne renferment pas de glycogène.

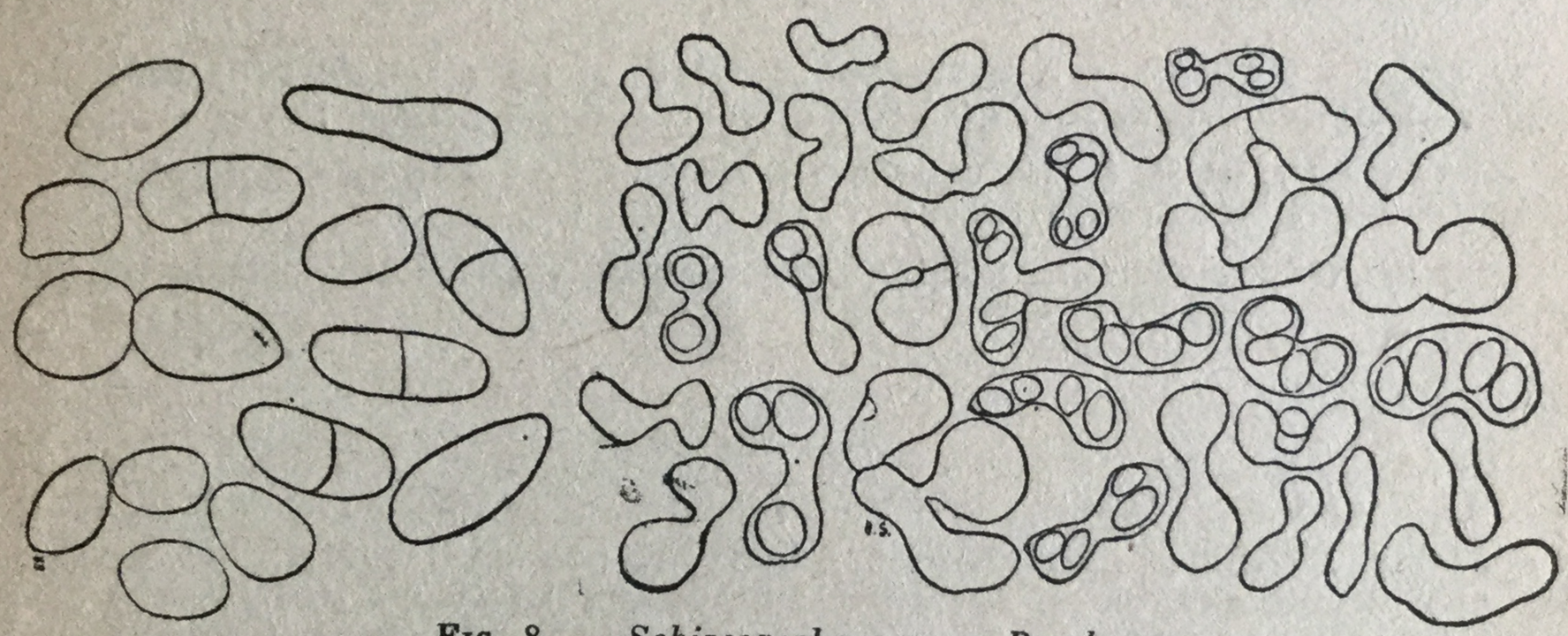


FIG. 8. — *Schizosaccharomyces Pombe*.
Cellules végétatives. Formation des asques.

La sporulation se produit facilement sur tranches de carottes (au bout de quelques heures), dans les vieilles cultures sur gélatine et dans le moût de bière après fermentation. Asques en forme d'haltères. Ascopores au nombre de 4, naissant par paire dans chaque renflement de l'asque, mesurant environ 4 mus de diamètre et présentant à la surface de leur membrane une substance amyloïde qui se colore en bleu par l'iode.

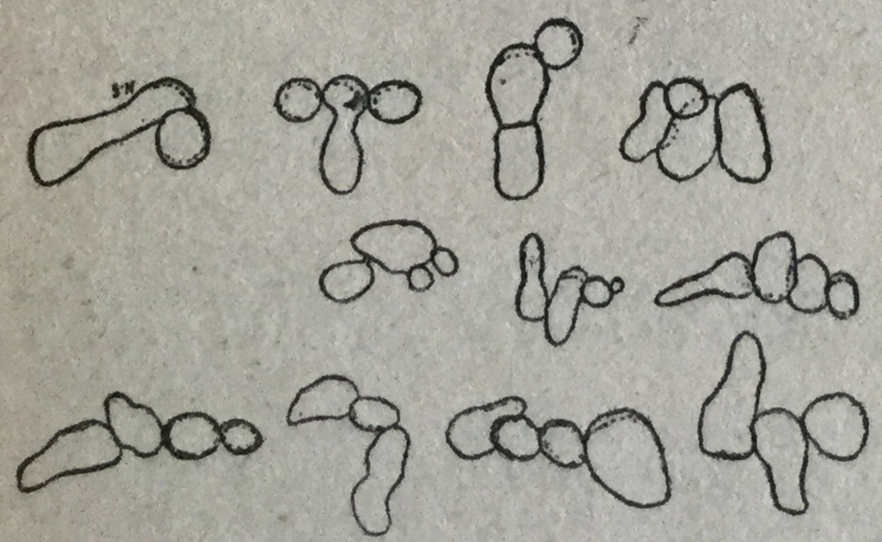


FIG. 9. — *Schizosaccharomyces Pombe*.
Germination des ascospores, d'après Guilliermond.

La levure ne forme pas de voile sur moût de bière ; mais elle produit un anneau au bout d'un mois. Sur gélatine, elle donne une couche compacte de fines cannelures, avec liquéfaction du milieu. Beijerinck a signalé l'existence d'une variété sporogène, formant des colonies blanches sur gélatine et d'une variété asporogène, produisant des colonies brunes sur le même milieu.

Le *Sch. Pombe* est une levure de surface à forte atténuation, provoquant une fermentation vigoureuse. Température minima 25°C ; température optima 30 - 35°. Il fait fermenter le glucose, le lévulose, le saccharose, le maltose, le raffinose l'inuline et la dextrine.

Il a été découvert par Saare et Zeidler, dans une bière de mil fabriquée par les indigènes de l'Afrique tropicale, le *dollo* ou *pombé*. On l'a parfois utilisé avec succès pour la production du rhum par levain pur (Arroyo).

Schizosaccharomyces mellacei Jorgensen.

Espèce très voisine de la précédente, dont elle se distingue par ses cellules un peu plus grandes (1) et par la propriété qu'elle possède de faire fermenter le mannose, sur lequel la levure Pombé n'a aucune action. C'est une levure à forte atténuation limite, donnant de bons rendements en alcool et supportant une acidité relativement élevée. Elle est toutefois moins active et fait fermenter les sucres plus lentement que la plupart des *Saccharomyces*.

Isolé à partir de mélasses et de vinasses envoyées en 1893 de la Jamaïque au laboratoire de Jorgensen, à Copenhague, le *Sch. mellacei* a été étudié ensuite par Greg, Allan et Ashby.

Greg a signalé l'intérêt présenté par cette levure, qui lui a donné en même temps qu'un excellent rendement alcoolique, un rhum très aromatique. Mais la durée de la fermentation, de 3-6 jours dans le cas des levures à bourgeonnement, était portée à 12 jours (moût à 21° Brix).

Allan a constaté qu'à la Jamaïque elle constitue presque la seule levure rencontrée dans les distilleries produisant du rhum grand arôme. Dans les autres rhummeries, on trouve, en proportions à peu près égales, les races à bourgeonnement et celles à scissiparité. Les premières prédominent généralement au début de la campagne rhummière, pour être souvent supplantées au bout de quelque temps par les secondes, lorsque l'acidité des moûts augmente.

Ashby a isolé plusieurs races de *Schizosaccharomyces*. La plupart d'entre elles sont des levures hautes, réunies en chaînes de 4 cellules ou plus, et formant à la surface des moûts un chapeau blanc brunâtre. Quelques-unes sont, cependant, des levures basses, présentant des cellules isolées ou réunies par 2 (2). Ces dernières assurent une fermentation plus rapide (6-8 jours au lieu de 8-10 jours, dans des essais de laboratoire de l'auteur). L'atténuation limite est à peu près la même dans les deux cas, mais les levures basses donnent une proportion d'alcool un peu plus forte que les levures hautes, lesquelles produisent plus d'esters et de matière sèche.

En ce qui concerne la résistance à l'alcool, Ashby a constaté que les levures à scissiparité examinées par lui pouvaient produire 12-14 % d'alcool, mais seulement au bout d'un laps de temps prolongé (20-24 jours). Pendant les 7-9 premiers jours, au cours desquels il se forme 9-10 % d'alcool, la fermentation est régulière et relativement rapide, après quoi elle se ralentit beaucoup. Les doses d'alcool qui gênent et qui arrêtent l'activité des levures hautes sont respectivement de 8.5 et de 12.5 % environ, tandis que pour les levures basses elles atteignent 9.5 et 14 % en volume. Pratiquement, une concentration en sucres de 16 % constitue la limite maxima permettant à la fermentation d'être terminée au bout d'un laps de temps raisonnable (10-12 jours).

Les *Schizosaccharomyces* sont beaucoup plus tolérants vis-à-vis à l'acidité que les *Saccharomyces*. Alors que ceux-ci voient leur activité arrêtée par 1 % d'acide acétique ou 0.15 % d'acide butyrique, les premiers sont à peine gênés

Par contre, lorsque le milieu est peu acide, les levures à bourgeonnement, plus actives, prennent rapidement possession du terrain. Aussi, dans les moûts de vesou, dont l'acidité est généralement inférieure à 0.5 %, trouve-t-on uniquement des formes à bourgeonnement. Les levures à scissiparité prédominent au contraire dans les moûts de mélasse acides et sont pratiquement les seules présentes lorsque l'acidité dépasse 1 %.

D'après Cousins, les *Schizosaccharomyces* seraient véhiculés par l'air, car

(1) Guilliermond a observé que, cultivé sur tranches de carotte, les celllules de **Sch. Pombe** mesuraient environ 7 mus de long sur 4,5 de large et celles de **Sch. mellacei** 9,5 x 5 mus.

(2) Ces levures basses pourraient dans certaines conditions se transformer en levures hautes. Ashby a, en effet, observé qu' une des levures isolées par lui produisait à l'origine une fermentation basse, mais qu'après avoir été conservée pendant 2 mois dans un moût de jus de canne fermenté et rajeunie, elle se comportait comme les levures hautes.

on les voit apparaître brusquement dans les moûts de distillerie, où il n'est pas possible de les rencontrer au début de la campagne rhummière.

N. Deerr a également isolé d'une mélasse du Pérou un *Schizosaccharomyces*, aux cellules allongées, parfois en forme de massue, mesurant 7.5-12 mus x 3.5-4 5 mus ; ascospores souvent irrégulières, au nombre de 4 par asque. Cette levure présentait quelques différences avec le *Sch. Pombe* et le *Sch. mellacei*.

Pairault a observé que les levures à scissiparité dominaient au début du siècle dans les rhummeries de mélasse de la Martinique et de la Guadeloupe. « Cette levure, écrit-il, se montre exclusivement dans les cuves de mélasses de nos Antilles, surtout lorsque la température est exceptionnellement élevée ».

D'après Kayser, les *Schizosaccharomyces* des Antilles françaises se distingueraient du *Sch. Pombe* et du *Sch. mellacei* car ils ne possèdent pas la propriété de faire fermenter la dextrine. Le même auteur a signalé d'ailleurs, l'existence de plusieurs races (ou espèces), se différenciant entre elles par la forme et les dimensions des cellules, l'aspect des colonies géantes, etc. Il décrit notamment les quatre formes suivantes :

Levure IV (Martinique) : Schizosaccharomyces ramifié et allongé de 9.1 à 20 mus de long sur 2.1 à 3.6 de large. Colonie géante petite, légèrement discoïde, à centre légèrement surélevé, un peu cratériforme.

VI (Martinique) : Schizosaccharomyces non ramifié, très long et uniforme; 11.7 à 18.2 mus de long sur 1.8 à 3.6 de large. Colonie légèrement festonnée et bombée, de couleur jaunâtre, apparence luisante.

IX (Guadeloupe) : Schizosaccharomyces à globules rectangulaires ; 8.5 à 14 mus de long sur 2.2 à 2.7 de large. Colonie à centre légèrement surélevé, avec lobes festonnés, jaunâtre.

XII (Guadeloupe) : Schizosacchraromyces court, ramifié, 7.5 à 14.5 mus de long sur 2.7 à 4.5 de large. Colonie semblable à celle de VI.

Kayser a, en outre, signalé une propriété intéressante des levures à scissiparité : celle de donner des quantités d'alcools supérieurs sensiblement moins importantes que les levures à bourgeonnement.

Schizosaccharomyces asporus Eijkmann.

Cette levure à scissiparité a été rencontrée par Eijkmann dans les distilleries d'arak, à Batavia. Elle se distingue du *Sch. Pombe* par le fait qu'elle ne produit pas d'endospores. Beijerinck la regarde comme une variété asporogène de cette dernière espèce. Suivant Groenwege, elle constituerait le principal agent intervenant dans la fermentation de l'arak de Batavia Elle supporte des concentrations en sucre très élevées, la densité des moûts dans les distilleries d'arak étant de 1130 environ (27° Brix) Signalons qu'Ashby, à la Jamaïque, a pu également faire fermenter par le *Sch. mellaceï* des moûts de mélasse et vinasse, ayant comme densité 30° Brix et renfermant 23.3 % de sucre au départ.

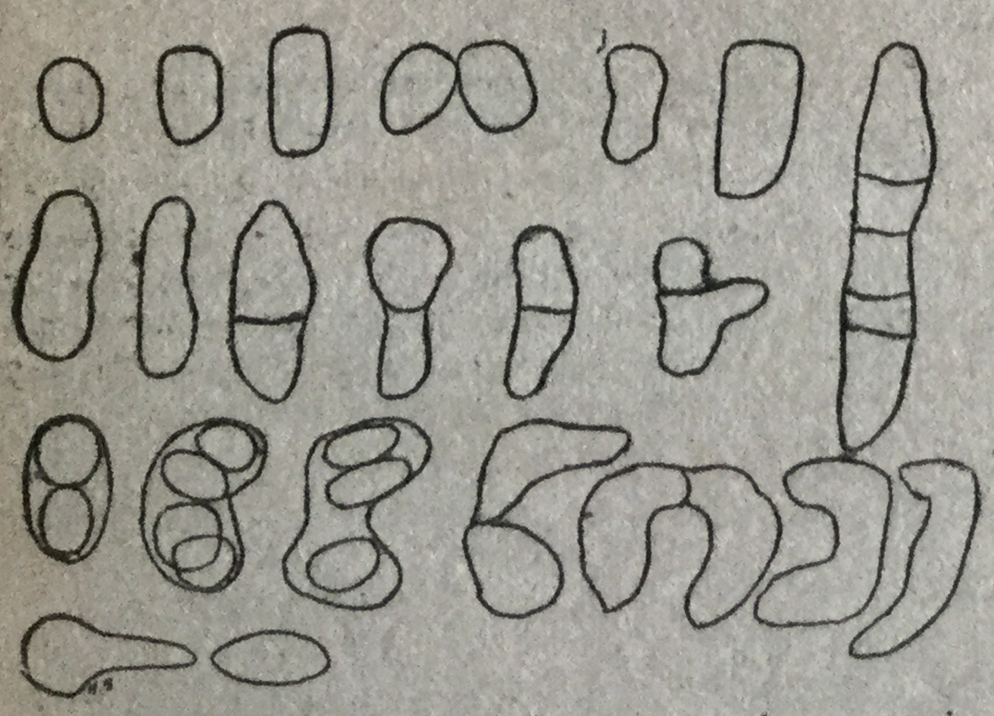


Fig. 10. — *Schizosaccharomyces formosensis* Cellules végétatives, d'après Nakazawa.

Schizosaccharomyces formosensis Nakazawa.

Cellules ellipsoïdales ou irrégulières, mesurant 9.2-16..8 mus sur 4.8 mus ; ascospores ellipsoïdales sans glycogène, mais à membrane imprégnée d'amyloïde. La levure forme sur moût de bière un voile à 25-27° et un anneau à 25-37°. Elle fait fermenter le glucose, le lévulose, le saccharose, le maltose,

le galactose le mannose, le raffinose, l'inuline et la dextrine. Température optima de multiplication : 32°C.

Cette levure a été isolée de produits sucrés à Formose, par Nakazawa, lequel a trouvé dans le même habitat deux autres espèces à scissiparité : *Sch. sautawensis* Nakazawa et *Sch. Nokkoensis,* dont les caractères sont assez peu différents de ceux du *Sch. formosensis.*

Zygosacharomyces major Takahashi et Yukowa.

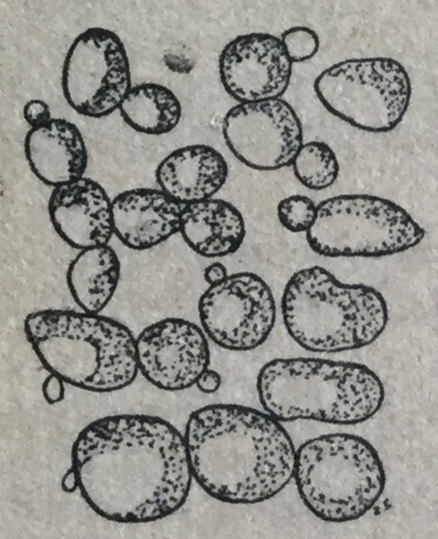
Cellules sphériques de 3.7-7.5 mus de diamètre, parfois ovales, renfermant du glycogène. Spores transparentes, rondes ou ovales, de 3-4.5 mus de diamètre en général, au nombre de 1 à 4 par asque.

La levure, qui appartient au groupe des levures basses, forme sur extrait de « koji » un anneau au bout de 3 jours. Elle fait fermenter le glucose, le lévulose, le mannose, le saccharose, le maltose, mais non pas le galactose, le lactose, ni le raffinose.

Le *Zygosaccharomyces major*, isolé par Takahaski et Yukawa du « Shoju » (condiment japonais à base de soja) en voie de maturition, a été rencontre par Hall, James et Nelson dans les mélasses de canne de la Barbade, en même temps que le *Zygosaccharomyces Nussbaumeri* Loghead et Heron.

Saccharomyces cerevisiae Hansen.

Cellules rondes ou ovales. Températures limites de développement dans le moût de bière : minima 1.3°, maxima 40°. Ascospores au nombre de 1 à 4 par asque (parfois 5), très réfrigentes et pourvues d'une membrane bien distincte ; diamètre variant de 2.5 à 6 mus. A 37°5 et à 9°, les ascospores ne se forment pas: elles apparaissent à 36-37° au bout de 24 heures environ ; à 30° (optimum) au bout de 20 h., et à 11-12° au bout de 10 jours. Températures limites pour la



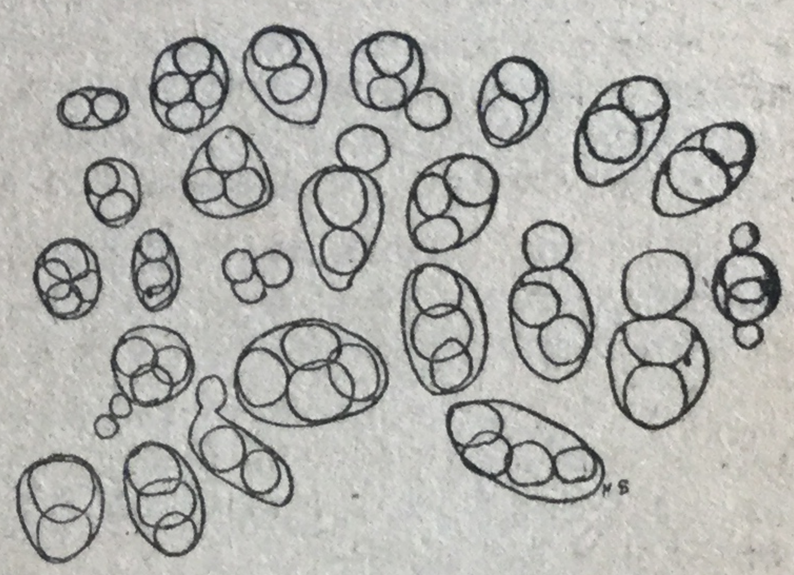


FIG. 11. — *Saccharomyces cerevisiae.*

Cellules végétatives, d'après Hansen. Formation des asques, d'après Hansen.

formation du voile : 5° et 38°. Le voile apparaît à 33-34° au bout de 9-18 jours ; à 6-7° au bout de 2-3 mois ; et à 20-22° (optimum) au bout de 7-10 jours. A 20-34° les cellules du voile ont une forme allongée et une apparence bizarre ; dans les vieux voiles, on rencontre toutes sortes de cellules, certaines très longues, ayant l'apparence d'un mycelium. La levure fait fermenter le glucose le lévulose, le saccharose, la maltose, mais non le lactose.

Le *S. cerevisiae,* trouvé par Hansen dans les brasseries de Londres et d'Edimbourg, est très répandu en brasserie et en distillerie. On rattache à cette espèce de nombreuses levures, hautes ou basses, dont la position systématique est mal connue. A signaler notamment celles du type Frohberg et du type Saaz, les premières à faible atténuation et les secondes à atténuation

moyenne. Ces levures comprennent diverses races très utilisées, surtout celles du groupe Frohberg, dans les fermentations industrielles.

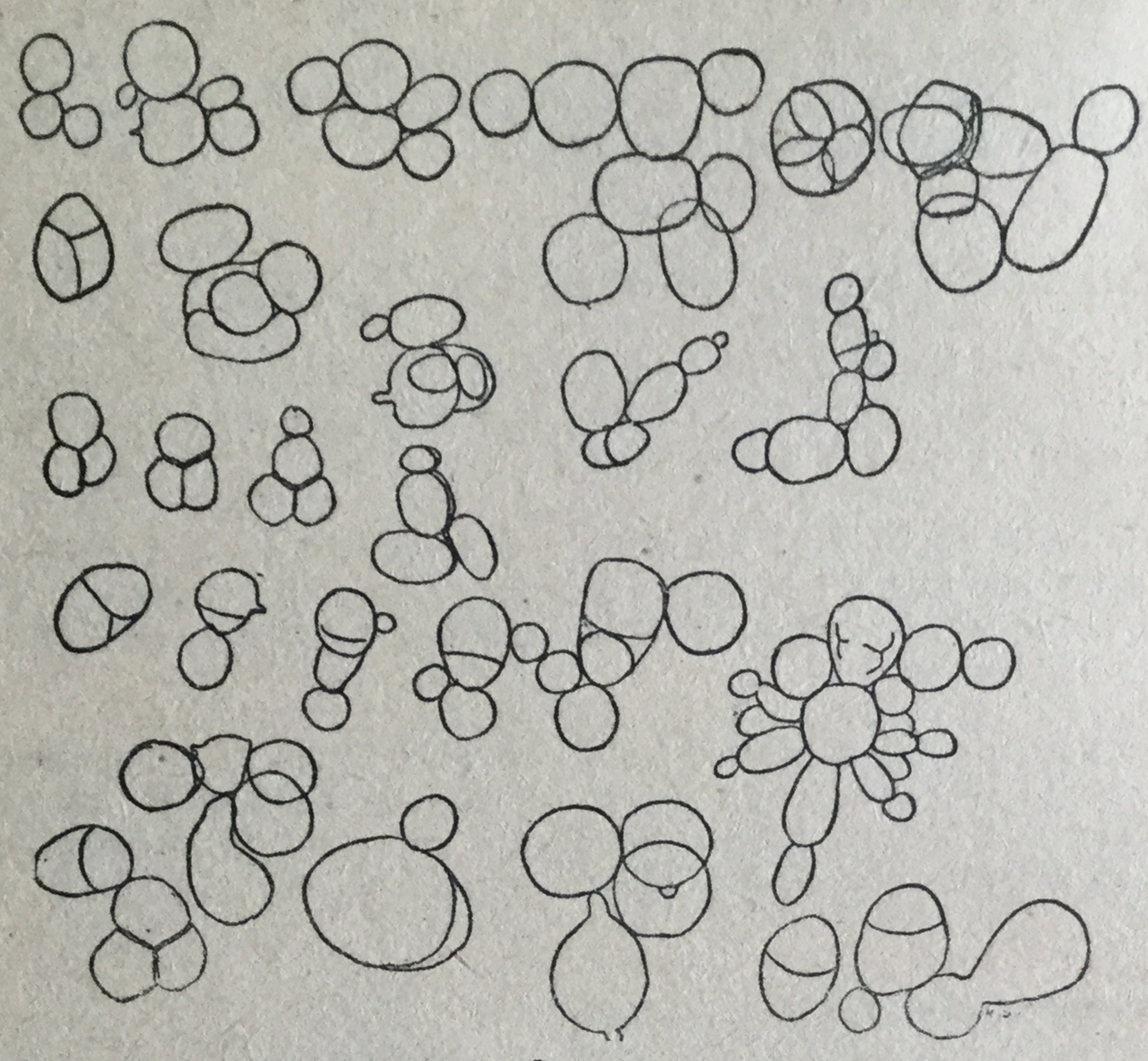


Fig. 12. — *Saccharomyces cerevisiae.*
Germination des ascospores, d'après Hansen.

Saccharomyces Vordermannii Went et Prisen-Geerligs.

Cellules rondes ou piriformes, mesurant 6-7 x 5-5 mus, les plus jeunes restant assez longtemps soudées aux anciennes. Dans les vieilles cultures sur agar, on trouve aussi des cellules allongées, filiformes, entourées de cellules ordinaires. Ascospores au nombre de 4 dans chaque cellule (2-3, d'après N. Deer.). La levure ne forme pas de voile à la surface des liquides sucrés, mais seulement un anneau au contact des parois du vase.

Elle fait fermenter le glucose, le lévulose, le saccharose, le maltose et le raffinose, mais non le lactose ni la dextrine. La fermentation, qui est très rapide, cesse en présence de 9 à 10 % d'alcool.

Le *S Vordermanii* a été découvert par Went et Geerligs dans le *ragi*, levain employé pour la fermentation de l'arak de Batavia. Certains auteurs le rattachent au *S cerevisiae*, les caractères qui distinguent les deux espèces étant peu importants.

S Peck et N. Deerr ont étudié les ferments isolés d'échantillons de mélasses de canne provenant de divers pays producteurs de rhum (Cuba, Demerara, Java, Maurice, Natal, Pérou, Trinidad). Ils n'ont rencontré que des levures à bourgeonnement, sauf dans la mélasse du Pérou, où il existait exclusivement une levure à scissiparité. Les différences qu'ils ont notées entre les organismes ne leur ont pas paru suffisamment nettes, pour pouvoir être considérées comme spécifiques. Ces auteurs regardent en conséquence les levures à bourgeonnement isolées par eux comme des variétés du *Saccharomyces Vordermannii*. Au point de vue physiologique, elles se développent lentement de 20 à 25° et très rapidement à 32° ; elles font fermenter le glucose, le lévulose, le saccharose et le maltose.

Pairault, qui a examiné les levures de rhum des Antilles françaises, considère que celles-ci, à l'exception des *Schizosaccharomyces*, se rattachent à la levure de bière (*S. cerevisiae*).

« Elles sont cordialement rondes, écrit-il, parfois ovales ; celles du vesou