

## CHAPITRE IV

### LES LEVURES (1)

On groupe vulgairement sous le nom de *levures* tous les microorganismes qui, placés dans une solution sucrée, donnent naissance à de l'alcool et à du gaz carbonique, c'est-à-dire déterminent la fermentation alcoolique.

Au sens botanique du mot, on désigne ainsi des champignons unicellulaires, présentant des formes ovales ou rondes, se multipliant par bourgeonnement ou par scissiparité et produisant des ascospores (Guilliermond). Les levures constituent la famille des *Saccharomycetacées*, laquelle forme avec celle des *Endomycetacées*, le groupe des *Protoascées*, ou *Ascomycetes inférieurs*.

A côté de ces levures bien caractérisées, il en est d'autres qui ne donnent jamais d'asques. Il est difficile de préciser si ce sont des levures vraies ayant perdu leur pouvoir de produire des spores, ou si elles représentent des formes dérivées de champignons plus élevées et fixées à l'état de levures. Aussi les classe-t-on dans un groupe provisoire, désigné sous le nom de *Non-Saccharomycetacées*.

Enfin, il existe des champignons mycéliens qui peuvent donner naissance par bourgeonnement à des cellules ayant la forme de levures, susceptibles de se multiplier à leur tour pendant plusieurs générations par bourgeonnement. Chez d'autres champignons, le mycelium se désarticule en cellules rectangulaires (*arthrospores*), capables de continuer à se diviser par cloisonnement transversal comme les *Schizosaccharomyces*. On désigne habituellement ces organismes sous le nom de *champignons à forme levure*.

Les levures sont très répandues dans la nature : on les trouve dans l'air, le sol, à la surface des végétaux (fruits, feuilles, etc.), surtout lorsque ceux-ci renferment du sucre. Dans les régions froides et tempérées, elles hivernent dans le sol, mais sous les tropiques elles persistent à longueur d'année sur les plantes. On les rencontre notamment à la surface des tiges de canne, représentées par de nombreuses espèces (*Saccharomyces*, *Torula*, etc.) et accompagnées de moisissures (*Aspergillus*, etc.) et de bactéries (acétiques, butyriques, lactiques).

#### Morphologie, développement et composition.

Les levures se présentent sous la forme de cellules généralement isolées, très polymorphes (rondes, ovales, elliptiques, en forme de citron, de poire, de bâtonnet, etc.) mesurant de 1 à 9  $\mu$  de long sur 1 à 5  $\mu$  de large. Forme et dimensions varient avec l'âge de la levure et le milieu de culture : l'acidité par exemple détermine l'allongement des cellules, tandis que l'oxygène les fait devenir ovales ou globuleuses. Aussi n'est-il pas possible de se baser uniquement sur les caractères morphologiques pour identifier les espèces. Il y a cependant souvent dans une culture une forme prédominante, parfois caractéristique (levures apiculées, torulas, etc.).

La reproduction des levures s'opère le plus souvent par bourgeonnement, mais elle peut aussi se faire par scissiparité ou par sporulation.

Dans la multiplication par bourgeonnement, il se forme, à la surface des

(1) Guilliermond (A.) et Tanner (F. J.) - The Yeasts, New-York, 1919.

globules de levure, un petit bourgeon, qui grossit peu à peu et prend bientôt les dimensions de la cellule mère. Le noyau se divise par amitose. Les jeunes cellules se détachent avant d'avoir atteint leur complet développement, ou restent encore quelque temps adhérentes ; puis chaque cellule se met à proliférer à son tour. Lorsque les globules demeurent unis en paquets rameux ou chapelets pouvant avoir 15-20 cellules, on a une *levure haute*, qui monte à la surface des moûts, soulevée par le gaz carbonique, et y forme une sorte de chapeau. Quand, au contraire, les globules sont isolés ou réunis deux par deux, ils constituent une *levure basse*, qui demeure au fond des cuves de fermentation.

Les levures du genre *Shizosaccharomyces* sont caractérisées par leur multiplication par scissiparité : la cellule s'allonge et, après avoir atteint une certaine taille, forme une cloison médiane, diversement dirigée, qui la divise en deux cellules filles. Celles-ci peuvent se séparer immédiatement ou rester unies pendant quelque temps, constituant des excroissances en forme d'outres très allongées. Dans certaines conditions (insuffisance d'air notamment), elles ont une tendance marquée à rester adhérentes et à constituer des chaînes ramifiées

La fermentation terminée et le liquide étant devenu immobile, les globules de levure peuvent continuer à se développer en aérobiose : ils viennent former à la surface du liquide un voile, une couronne ou un anneau sur la ligne de contact de cette surface avec le récipient. Les conditions de formation du voile (rapidité, températures limites, etc.), ainsi que l'aspect de celui-ci, constituent des caractères permettant de différencier les espèces. Dans certains cas, le voile apparaît dès le début de la fermentation (*Willia*, *Mycoderma*, etc.) ; dans d'autres, il ne se forme pas du tout.

Les spores sont les organes de résistance des levures vis-à-vis des agents extérieurs. On admet, avec Hansen, qu'elles ne se forment qu'à partir de cellules jeunes et vigoureuses, placées dans des conditions alimentaires défavorables, en présence d'oxygène et entre certaines limites de température, variables d'ailleurs avec les races de levure. On trouve des spores dans les voiles, et on peut les obtenir facilement en plaçant de la levure jeune bien nourrie, en masse pâteuse sur certains milieux solides. Le nombre de spores par cellule, ou *asque*, varie entre 1 et 12 ; il est souvent caractéristique d'une race ou d'une espèce de levure. Leurs dimensions vont de 1.5 à 5  $\mu$ s. Les ascospores sont d'ordinaire sphériques ou ovales, mais elles présentent parfois des formes caractéristiques : hémisphériques, triangulaires, limoniformes, etc. Le mode de germination des spores est aussi quelquefois caractéristique de l'espèce.

Chez certaines levures, l'asque résulte de la copulation de deux cellules, de dimensions égales (isogamie) ou inégales (hétérogamie). Dans le premier cas, deux cellules semblables s'unissent l'une à l'autre par un mince canal ; les spores se forment dans les deux renflements de l'asque, qui présente l'aspect d'une haltère. Dans le deuxième cas, une petite cellule s'unit par un canal à une grande cellule ; le contenu de la première émigre dans la seconde, où naissent les ascospores.

La conjugaison isogamique s'observe dans les genres *Shizosaccharomyces* et *Zygosaccharomyces* ; la conjugaison hétérogamique dans les genres *Debaryomyces*, *Nadsonia* et quelques *Zygosaccharomyces*. On trouve d'ailleurs des cas intermédiaires entre l'iso et l'hétérogamie. Certaines levures (*Schwanniomycetes*, *Torulasporea*) présentent seulement des vestiges de sexualité : les cellules peuvent faire plusieurs tentatives pour s'unir, sans y parvenir, et donnent naissance à plusieurs filaments, qui s'irradient autour d'elles. Enfin, dans quelques espèces (*S. Ludwigi* par exemple), il se produit, lorsque la conjugaison n'a pu avoir lieu au moment de la formation des asques, une copulation entre ascospores (*parthénogamie*).

La composition chimique des levures est fort variable selon les conditions de culture et la race étudiée. Pour une levure donnée, elle se modifie aussi, du moins quantitativement, au fur et à mesure de la fermentation.

La teneur en eau est toujours élevée et voisine de 70-75 %. La composition de la matière sèche varie entre les limites suivantes :

Glucides et lipides .....	20 à 63 %
Protides .....	35 à 63 —
Matières minérales .....	5 à 11 —

Les glucides les plus importants sont le *glycogène*, matière de réserve dont la quantité peut atteindre 38 % en fin de fermentation, et une *mannane* que l'on trouve dans la membrane cellulaire.

La teneur en matières grasses atteint généralement 2 à 5 % de la matière sèche. Elle peut cependant s'élever à 20 % dans les vieilles cultures dégénérées et même, pour certaines races, jusqu'à 50 %. Les graisses de la levure sont constituées principalement par les esters des acides palmitique, laurique, linolique et arachidique. On y trouve aussi en petite quantité des lécithines et des phytostérols (*ergosterol*).

Les matières azotées, ou protides, sont formées, dans la proportion de 90 %, par des protéines vraies (*cerevisine*, *zymocaseine*) et des nucléines. Les matières azotées non protéiques comprennent des peptones, des amino-acides (leucine, valine, lysine, etc.), et des amides (xanthine, hypoxanthine, guanine) Meisenheimer (1), qui a étudié les matières azotées de la levure par hydrolyse en présence de toluène, a trouvé, parmi les produits de dégradation des protéines, tous les amino-acides communs, y compris la gluosamine, dont on n'avait pu jusqu'alors déceler la présence. D'après cet auteur, l'azote de la levure se répartirait comme suit :

N ammoniacal .....	11 %
N des bases nucléiniques .....	7 —
N de l'arginine-histidine .....	22 —
N de la lysine-choline .....	4 —
N des acides monoaminés .....	56 —

Quant aux matières minérales, elles sont constituées principalement par de l'acide phosphorique (45 à 60 % des cendres), de la potasse (30 à 40 %) et de la magnésie (4 à 8 %). On y trouve aussi, mais en petites quantités, de la chaux, de la soude, de la silice, du fer, du soufre et du chlore. La proportion des diverses matières ci-dessus varie d'ailleurs dans de larges limites, suivant la composition chimique du milieu dans lequel s'est développée la levure. Cette observation s'applique surtout à la chaux et à la magnésie, qui peuvent être très abondantes ou en quantités très faibles.

### Nutrition des levures.

Comme tous les êtres vivants, la levure a besoin, pour son entretien et son développement, de matières azotées, hydrocarbonées et minérales. Il importe d'ailleurs de distinguer l'action de ces substances sur la multiplication de la cellule d'une part, et sur la fonction zymasique, c'est-à-dire sur la fermentation, d'autre part. Il y a fréquemment antagonisme entre la fonction végétale et la fonction ferment.

### Matières minérales.

Le rôle que jouent les matières minérales vis-à-vis de la multiplication des levures a d'abord été étudié par Mayer (2). Cet auteur a constaté que le milieu nutritif le plus favorable avait la composition ci-après, qui correspond à peu près, en ce qui concerne l'équilibre des divers éléments minéraux, à celle des cendres de la levure :

Phosphate monopotassique .....	5.0 gr.
Sulfate de magnésie .....	5.0 —
Phosphate tricalcique .....	0.5 —
Nitrate d'ammoniaque .....	0.75 —
Sucre .....	15.0 —
Eau distillée .....	1.000 cc.

Les phosphates et la potasse ont une importance capitale dans la nutrition de la levure. Le soufre est également indispensable.

La chaux et la magnésie, qui ne peuvent se remplacer l'une par l'autre,

(1) Woch. Brauerel XXXII, 325, 1915.

(2) Lehrbuch der Gärungschemie. 5<sup>e</sup> éd. 1902.

ne paraissent pas absolument nécessaires, mais jouent cependant dans le chimisme interne de la cellule un rôle qui les rend extrêmement utiles. Seifert a, en effet, constaté que la levure dégénère rapidement dans les milieux privés de chaux. Hayduck et Kenneberg ont aussi observé que, placées dans une solution de sucre pur, les levures de bière meurent très vite, mais que si l'on ajoute au milieu une petite quantité de sels de chaux, leur vitalité est beaucoup plus grande. Il est probable que la mort des cellules est déterminée par la formation à l'intérieur de celles-ci d'acides, qui se trouvent neutralisés en présence de la chaux ou des autres alcalis.

Mayer considérait les sels de fer comme inutiles. Cependant d'autres auteurs (Molich, Wehmer) estiment qu'ils exercent une action favorable sur la multiplication de la levure.

Les phosphates et le soufre ont également une influence considérable sur la fonction zymasique. Elion a pu constater que le phosphate monopotassique et le phosphate neutre d'ammoniaque produisaient une augmentation du dégagement d'acide carbonique, qui varie, pour un temps donné, entre 23 et 63 % suivant les levures. Harden et Young ont montré que les phosphates solubles, jouent un rôle essentiel dans l'action de la zymase alcoolique.

Stern a observé que, dans un milieu nutritif complètement privé de soufre, on ne peut obtenir la fermentation complète du sucre. Mais si l'on ajoute du sulfate de Ca et du sulfate de Mg, la transformation du sucre est intégrale.

Quand ils dépassent une certaine proportion dans le milieu de culture, les éléments minéraux n'interviennent plus utilement dans la nutrition de la levure, ni dans la fermentation. Stern a observé qu'au delà de 250 mgr. par litre de solution sucrée (additionnée de 250 mgr. d'azote sous la forme d'asparagine), il n'y a plus accroissement de la quantité d'azote assimilé, du poids de levure ni du sucre consommé.

Indépendamment des éléments ci-dessus, reconnus indispensables au développement et à la fonction zymasique de la levure, il est d'autres sels minéraux qui, à doses modérées, exercent une action favorable. On a ainsi reconnu que le pouvoir ferment étant augmenté par de petites doses de sels de manganèse (Kayser et Marchand), de protochlorure d'étain et de sous-nitrate de bismuth (Gimel), de sulfate de cuivre et de cyanure de sodium (Hildebrandt et Boyce), etc... Les sels d'aluminium ont aussi une légère action stimulante sur la fermentation et la multiplication cellulaire (Sikes), tandis que ceux de lithium sont nuisibles.

### Matières azotées.

Les protéines proprement dites (albumines, caséine, fibrine), non diffusibles à travers les membranes cellulaires, constituent de mauvais aliments azotés. Suivant Pasteur et Mayer, les levures ne peuvent assimiler l'albumine du blanc d'œuf ni la fibrine du sang. Dans certaines conditions toutefois, les matières azotées complexes pourraient être utilisées. Ainsi, Boullanger a constaté que le lait,ensemencé avec certaines levures, se coagule peu à peu et qu'au bout de quelques mois le coagulum se liquéfie, avec formation de sels ammoniacaux, de tyrosine et de leucine : il y a donc eu dissolution et digestion de la caséine.

Les albumines et les peptones constituent, par contre, de bons aliments pour la levure. Duclaux (1) a montré que les matières azotées contenues dans l'eau de levure, et qui sont constituées surtout par des peptones, auraient même sur la multiplication des cellules une action plus favorable que les sels ammoniacaux. Hayduck, expérimentant avec l'asparagine et la peptone, a constaté que cette dernière favorisait beaucoup plus la multiplication de la levure que l'asparagine.

Les produits de dégradation plus avancée des albuminoïdes (amides, acides aminés, etc.) sont assimilés plus facilement que les albumines. L'assimilabilité varie toutefois avec la nature de ces substances. Certains amino-acides, comme la leucine, l'isoleucine, l'adénine, l'acide aspartique, sont aisément absorbés,

(1) Traité de Microbiologie : t. III. La fermentation alcoolique. Paris, 1905.

tandis que d'autres (histidine, choline, thymine, hypoxanthine) le sont difficilement. Parmi les amides, l'allantoïne, l'asparagine et l'urée sont assimilés, mais non la créatine, la créatinine, ni l'acide succinamique.

Suivant Lindner (1), les composés dont les groupements hydrocarbonés sont en longues chaînes ouvertes (leucine, adénine, lysine) sont plus facilement absorbés que ceux à chaîne fermée (histidine, thymine, choline). La race de levure a également une grande importance : les levures les plus aérobies utilisent plus aisément les composés azotés difficilement assimilables.

Le carbone des acides aminés et des amides ne peut servir à la levure pour sa nutrition. Ehrlich a montré que l'azote était absorbé, probablement à l'état d'ammoniaque, et transformé en matière protéique, tandis que le reste de la molécule était rejeté dans le milieu, sous forme d'alcools supérieurs. Effront a aussi signalé l'existence d'une amidase, qui agit sur les amides, en donnant naissance à de l'ammoniaque et à des acides volatils.

Les sels ammoniacaux sont très bien absorbés par les levures, ainsi que l'ont constaté de nombreux expérimentateurs (Pasteur, Duclaux, Mayer, etc.)

En présence d'un mélange d'azote ammoniacal et d'azote organique, les levures s'attaquent d'abord et de préférence aux sels ammoniacaux. Mais ceux-ci ont, ainsi que l'a montré Duclaux, une action beaucoup plus favorable sur le fonctionnement de la zymase que sur la multiplication cellulaire. Ci-après les accroissements en levure sèche obtenue avec diverses matières azotées (Bokorny) (2) :

Sels ammoniacaux	+	saccharose	=	71.8 %
—		+ glucose	=	113.0 —
Asparagine	+	saccharose	=	103.7 —
Acide aspartique	+	—	=	61.3 —
Leucine	+	—	=	90.3 —
Tyrosine	+	—	=	61.3 —
Glycine	+	—	=	25.8 —
Peptone	+	—	=	177.0 —

Contrairement à ce qui se produit dans le cas des plantes supérieures, les nitrates sont mal utilisés par la levure. Suivant Laurent, ils ne pourraient être assimilés et, en se transformant en nitrites, ils exerceraient une action toxique sur les levures. Toutefois les expériences de Kayser (3) et celles de Ferebach et Lanzerberg (4) ont montré que si les nitrates gênent la multiplication cellulaire, ils activent l'action de la zymase et favorisent la fermentation. D'après Nicoleau (5), l'azote nitrique manifeste son action accélératrice sur la levure ferment à partir d'une concentration en nitrate d'environ 5 %, avec un optimum variable suivant le milieu, la quantité initiale de semence, la vigueur de la levure, etc.

Il résulte en définitive des études qui ont été faites sur le sujet, que les aliments de choix pour le développement et la multiplication de la levure sont les matières azotées complexes sous forme de peptones, tandis que pour l'exercice des fonctions de fermentation, ce sont les matières azotées profondément dégradées et aussi voisines que possible de la forme d'ammoniaque.

Au-delà d'une certaine proportion, les matières azotées exercent une action défavorable sur la fermentation, Suivant Pringsheim, la quantité d'azote donnant les meilleurs résultats au point de vue du rendement alcoolique varierait, suivant les races de levure et les conditions du milieu, entre 0.004 et 0.008 %

### Matières hydrocarbonées ou glucides.

Le méabolisme hydrocarboné des levures est différent, selon que celles-ci vivent en aérobiose (fonction végétale) ou en anaérobiose (fonction fermentaire ou zymasique).

(1) Chem. Ztg XXXIV, 1144, 1910.

(2) Chem. Ztg, XL, 366, 1916.

(3) C. R. CXLIIV, 574 1907, CLI, 816, 1910.

(4) C. R. CLI, 726, 1910.

(5) Les nitrates dans la vie de la levure. Paris 1924.

En *vie aérobie*, la levure peut utiliser, comme aliments d'entretien, de nombreux composés organiques. D'après les recherches de Laurent (1), elle est capable d'assimiler le carbone des sels organiques (acétates, lactates, citrates, tartrates, malates, succinates), des acides organiques (citrique, tartrique, succinique lactique), de l'alcool éthylique et des polyalcools (glycérine, mannite), des sucres en  $C_6$  et en  $C_{11}$ , et des corps susceptibles de donner des sucres, des **glucosides** ou des **dextrines**. Par contre, les esters, les acides gras (à l'état d'acides), les amides, le glyocolle, l'hydroquinone, la cellulose, etc. ne pourraient nourrir la levure.

Bokorny est arrivé à des conclusions à peu près semblables. Il semble, cependant, que dans certaines conditions et pour certaines espèces, les levures puissent utiliser l'alcool éthylique (Trillat, Kayser, Lindner).

Le maltose paraît être le sucre le plus facilement assimilé par la levure en aérobiose ; le saccharose, le glucose, le lévulose, le raffinose le sont moins facilement, tandis que le lactose et les dextrines ne sont utilisés que dans certains cas particuliers. Il n'existe d'ailleurs pas de relation entre la fermentescibilité d'un sucre et son assimilabilité en aérobiose : le *Sch. Pombe*, par exemple, qui fait fermenter activement le saccharose, le glucose et le lévulose, est incapable d'assimiler ces derniers (Lindner et Saito) (2).

En *vie anaérobie*, ou fermentaire, la levure n'attaque plus que certains sucres et les polysaccharides donnant naissance à ces derniers par hydrolyse.

Suivant Fischer et Thierfelder (3), seuls sont fermentescibles les sucres renfermant dans leur molécule 3 atomes de carbone (ou un multiple de 3). Il semble y avoir cependant des exceptions à cette règle : les pentoses (arabinose, xylose), par exemple, peuvent être attaqués par certaines levures (Lindner). D'autre part, les trioses paraissent être transformés en hexoses avant toute fermentation. Pratiquement il n'y a guère que les 3 hexoses suivants : d-glucose, d-fructose (lévulose) et d-mannose, qui soient directement et facilement attaquables. La fermentation du d-galactose n'est obtenue qu'avec des levures acclimatées à ce sucre.

La levure manifeste une préférence marquée pour l'un ou l'autre des hexoses fermentescibles (phénomène de la *fermentation élective*). Dans un mélange de glucose et de lévulose, par exemple, on constate que le glucose disparaît d'ordinaire plus rapidement que le lévulose au début de la fermentation. Par la suite, le phénomène se renverse, de sorte que finalement, il reste dans le liquide un excédent de glucose. Certaines races cependant font exception : ainsi des levures de Sauternes, décrites par Dubourg, font disparaître le lévulose plus rapidement que le glucose du début à la fin de la fermentation. La propriété élective dépend aussi de la constitution du milieu de culture et de la température. Ainsi, en présence de sels de manganèse, le lévulose disparaît plus vite que le glucose (Kayser)

Les disaccharides (saccharose, maltose, lactose, tréhalose) et les trisaccharides (raffinose) ne sont attaqués que si la levure possède les diastases nécessaires pour effectuer leur hydrolyse en hexoses fermentescibles. La plupart des espèces font fermenter la saccharose, beaucoup le maltose, mais peu attaquent le raffinose et le tréhalose

Quant aux polysaccharides (amidon, dextrines, inuline, etc.), ils peuvent subir la fermentation alcoolique sous l'action de certains champignons (*Mucors*), mais ils ne sont attaqués que tout à fait exceptionnellement par les levures. A signaler cependant que les *Sch. Pombe* et *Sch. mellacei*, par exemple, font fermenter la dextrine et l'inuline.

#### Pouvoir ferment et activité des levures.

On désigne sous le nom de *pouvoir ferment*, le rapport de la quantité de sucre consommé à la quantité de levure produite, c'est-à-dire la quantité de

(1) Ann. Inst. Pasteur III, 1889.

(2) Woch. Braueri XXVII, N° 41, 1910.

(3) Ber. Deut. Chem. Ges. XXVII, 2114, 1894.

sucre que l'unité de poids de cette levure est capable de faire disparaître. Ce pouvoir varie suivant la race de levure et les conditions du milieu de culture. Certaines races, notamment celles utilisées dans la fabrication d'alcool industriel, peuvent pousser à fond la fermentation des moûts très riches en sucre, tandis que d'autres s'arrêtent avant d'avoir transformé tout le sucre.

Le pouvoir ferment représente, ainsi que le fait remarquer Lindet (1), la somme du *pouvoir végétal* et du *pouvoir zymase*, c'est-à-dire des quantités de sucre utilisé par la levure pour son entretien et son développement d'une part; pour la fermentation de l'alcool sous l'action de la zymase d'autre part. Ces deux pouvoirs sont complémentaires, de telle sorte que le poids d'alcool formé diminue lorsque la quantité de sucre utilisé pour le fonctionnement de la vie végétale s'accroît. Lindet a montré que la part de la fonction végétale est d'autant plus importante et celle de la fonction zymasique d'autant plus faible, que la fermentation est plus lente. Plus est faible la quantité de levure ensemencée, plus la fermentation se prolonge et plus s'abaisse le rendement en alcool. Cependant, quand on dépasse une certaine limite (1 p. 1000 de levure supposée sèche), on obtient bien une fermentation très rapide, mais alors, l'entretien et la respiration d'un nombre excessif de cellules déterminent une consommation exagérée de sucre au titre végétal.

On appelle *activité* d'une levure, la quantité de sucre que l'unité de poids de celle-ci fait disparaître dans l'unité de temps. Cette activité varie également avec les races de levure et avec les conditions du milieu.

Enfin une levure est dite à faible ou à forte *atténuation limite*, suivant que la quantité de sucres fermentescibles restant dans le moût à la fin de la fermentation est plus ou moins importante. Si on compare leur action dans les liquides sucrés de compositions diverses, les races de levure se classent toujours dans le même ordre. Ceci a permis de les grouper industriellement en levures à faible atténuation (type Saaz), à atténuation moyenne (type Froberg) et à forte atténuation (type Logos, levure Pombe).

Le pouvoir d'atténuation d'une levure n'est pas dû uniquement à la faculté que possède celle-ci de faire fermenter les hydrates de carbone, mais encore à sa résistance aux conditions de plus en plus défavorables du milieu au fur et à mesure que la fermentation avance (augmentation d'acidité, appauvrissement du moût, etc). « En somme l'atténuation limite d'un moût ne correspond pas à la disparition de toute matière fermentescible ; l'arrêt (au moins apparent) de la fermentation est dû à un ensemble de facteurs qui freinent le phénomène de plus en plus énergiquement » (Van Laer).

Dans les distilleries d'alcool industriel, on donne la préférence aux levures dont le pouvoir ferment et l'activité sont élevés, c'est-à-dire qui donnent en peu de temps une forte production d'alcool. On cherche également à réaliser les conditions qui portent le pouvoir ferment et l'activité à leur maximum. Il n'en est pas toujours ainsi dans la fabrication des eaux-de-vie, où, pour obtenir des produits aromatiques, il y a souvent intérêt à ralentir la fermentation. Parfois même, dans l'industrie des boissons fermentées, il convient de s'adresser aux levures à faible atténuation, laissant dans le liquide une certaine quantité de sucre non transformé (fabrication du cidre doux, par exemple).

### Diastrases.

Les réactions chimiques dont est le siège la cellule vivante (hydrolyses, oxydations et réductions, condensations diverses) se font par l'intermédiaire de « catalyseurs biochimiques », appelés *diastases* ou *enzymes*.

On divise celles-ci en deux grands groupes : les diastases de digestion ou *hydrolases*, qui hydrolysent les aliments, et les diastases de respiration ou de fermentation, les *desmolases*, qui effectuent le phénomène d'oxydation et de réduction, ainsi que les ruptures de molécules organiques.

Dans le premier groupe, on distingue les *esterases*, qui provoquent les phénomènes d'estérification et de saponification, les *glucidases*, qui hydrolysent les glucides et les *nitrogénases*, qui hydrolysent les protides. La plus connue des desmolases est la *zymase alcoolique*.

(1) C. R. CLXIV, 58, 1917 ; CLXVI, 910, 1918.

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 diastase 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. ostoporus*, *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 optimale 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 (*Aspergillus 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 protéines 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 dessiccation 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 optimale 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, arséniate) 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).

M<sup>mes</sup> 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.* CXCV, 1023, 1932.

(3) *Ind. Eng. Chem.* VI, 480, 1914.

ultra-violetts augmenterait la rapidité et l'efficiéce 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 pastorienné, 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 :

	$QO_2$	$QCO_2^O$	$QCO_2^N$
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 ;  $QCO_2^O$ , 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 ;  $QCO_2^N$ , 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 comprise 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, accélèrent 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 Froberg, 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, Froberg 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) Erlangerer 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  $\text{SO}_4\text{H}_2$ . Il a obtenu les résultats suivants :

Levure	Acide	Quantité %	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 Geerligts 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 Awamoni*, 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.

Fernbach (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 toxiques 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. Lorsque 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 optimale de fermentation. Il est une fois encoreensemencé 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 quantité 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 ascospores.

Dans la *méthode de Gorodkova*, 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 perfectionnée 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.

*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 mm<sup>3</sup>. 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 microscope 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 ascospores 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 ascospores 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 corpuscules métachromatiques sont légèrement teintés, tandis que le noyau et le protoplasma restent incolores. Les levures mortes se colorent facilement avec le bleu de méthylène 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 ensemençer, 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 ensemençe 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<sub>2</sub>, on peut laisser tomber quelques gouttes de potasse caustique sur le pore-objet : la bulle de CO<sub>2</sub> 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 ensemençer 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<sub>6</sub>, de la vitesse d'intervention des sucres en C<sub>12</sub>, 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'atmosphère.

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<sub>2</sub>, 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 ascospores (Hansen).

Il est prudent de régénérer 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 températures 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 mono-ammonique et 25 gr. de phosphate mono-potassique. On dissout 5 gr. du mélange dans 60 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 :

1<sup>er</sup> groupe. — Levures à cellules cylindriques, rectangulaires ou ovales, se multipliant par cloisonnement transversal. Asques à 4 ou 8 ascospores, 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*.

2<sup>e</sup> 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 ;

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

3<sup>e</sup> 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*, *ellipsoideus*, *turbidans*, *willianus*, *Vordermanni*, *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*, *Chevalier*, 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.

**4<sup>e</sup> 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.

**5<sup>e</sup> 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*, *Oidium*.

*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.

*Oidium*. — 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  $\mu$  en moyenne. Elles se multiplient par cloisonnement, 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.

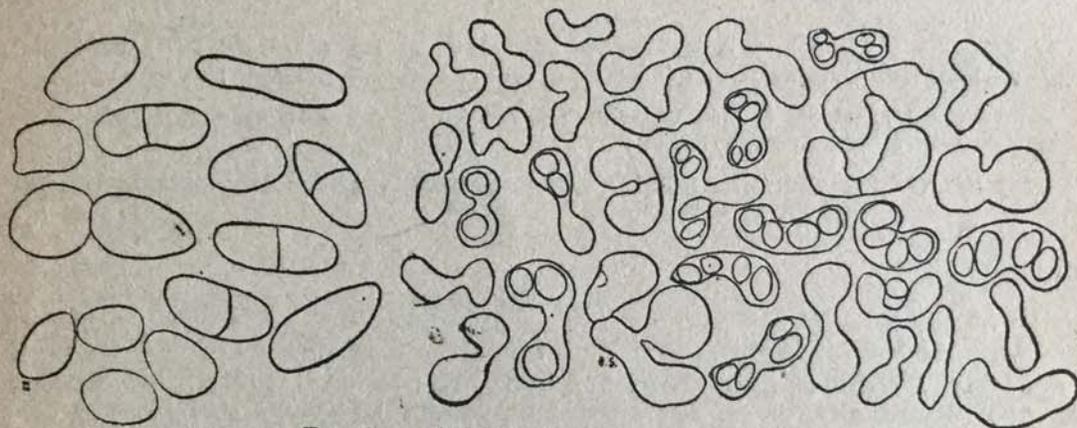


FIG. 8. — *Schizosaccharomyces Pombe*.

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. Ascospores au nombre de 4, naissant par paire dans chaque renflement de l'asque, mesurant environ 4  $\mu$  de diamètre et présentant à la surface de leur membrane une substance amyloïde qui se colore en bleu par l'iode.

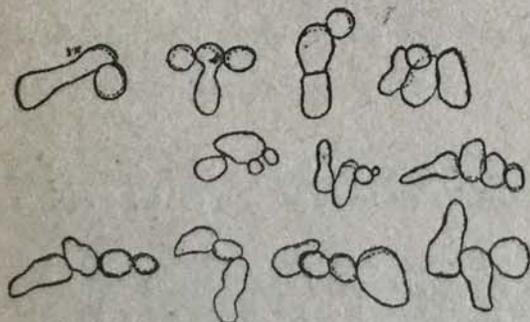


FIG. 9. — *Schizosaccharomyces Pombe*.

Germination des ascospores, d'après Guilliermond.

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.

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,

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 limitée, 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 rhumeries, 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 rhumière, 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 limitée 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) Guilhaumon a observé que, cultivé sur tranches de carotte, les cellules de *Sch. Pompe* mesuraient environ 7  $\mu$ s de long sur 4,5 de large et celles de *Sch. mellacei* 9,5 x 5  $\mu$ s.
- (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 rajeuni, 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) : *Schizosaccharomyces* 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. mellacei* des moûts de mélasse et vinasse, ayant comme densité 30° Brix et renfermant 23.3 % de sucre au départ.

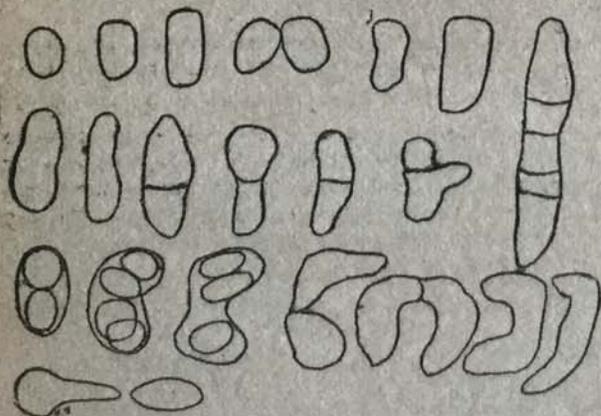


FIG. 10. — *Schizosaccharomyces formosensis*  
Cellules végétatives, d'après Nakazawa.

### *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  $\mu$  de diamètre, parfois ovales, renfermant du glycogène. Spores transparentes, rondes ou ovales, de 3-4.5  $\mu$  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 Takahashi et Yukawa du « Shoju » (condiment japonais à base de soja) en voie de maturation, a été rencontré 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 réfringentes et pourvues d'une membrane bien distincte ; diamètre variant de 2.5 à 6  $\mu$ . 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

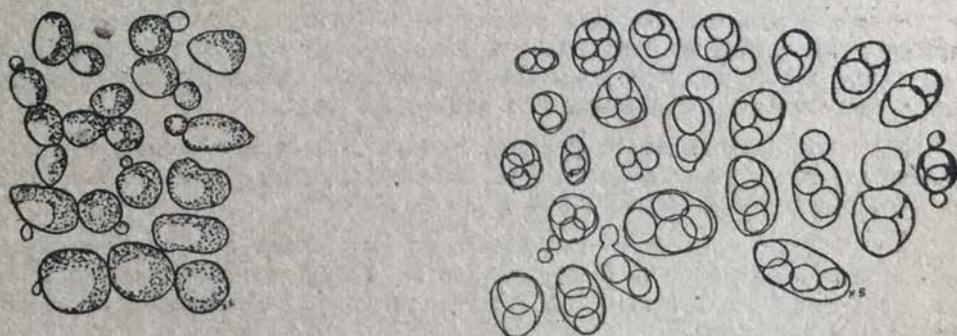


FIG. 11. — *Saccharomyces cerevisiae*.

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 Froberg 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 Froberg, dans les fermentations industrielles.

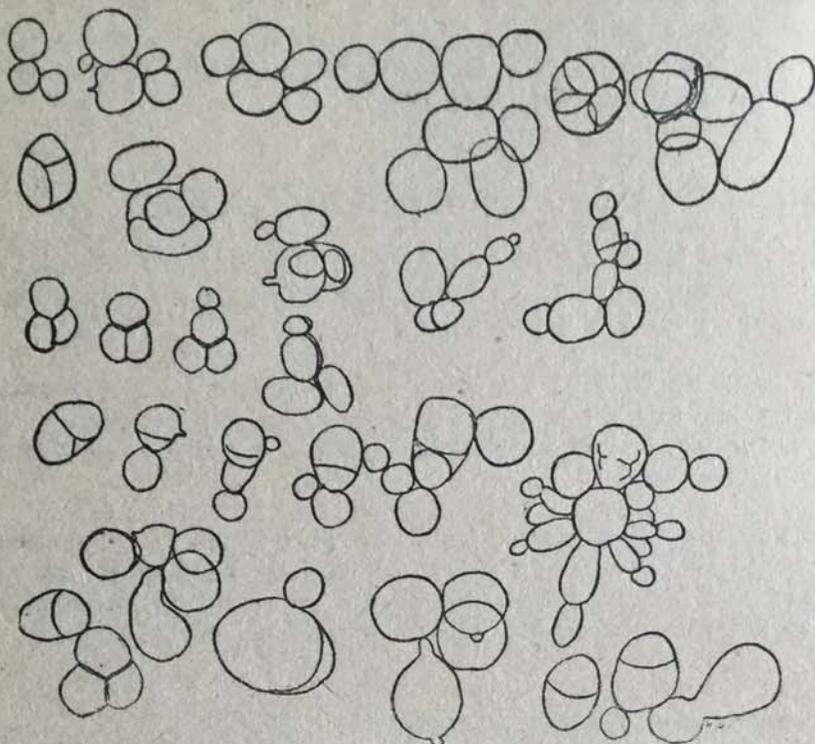


FIG. 12. — *Saccharomyces cerevisiae*.  
Germination des ascospores, d'après Hansen.

### *Saccharomyces Vordermannii* Went et Prisen-Geerligs.

Cellules rondes ou piriformes, mesurant 6-7 x 5-5  $\mu$ s, 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. Deerr.). 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. Vordermannii* 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

sont en général plus petites et plus rondes que celles prises dans les cuves de mélasse : les premières ont de 3 à 7  $\mu$  de longueur, les autres de 7 à 9. Les levures de rhum affectionnent des températures élevées ; leur activité est très faible au-dessous de 23° ; leur température de prédilection paraît être 35°, mais quelques-unes supportent encore vaillamment des températures de 41-42 et même 43°. Beaucoup de levures de rhum ne fermentent pas le maltose ; sur 40 essayées, 18 étaient dans ce cas. Dans la même rhumerie, j'ai à quelques jours d'intervalle rencontré des levures qui fermentaient le maltose et d'autres qui ne le fermentaient pas. Les unes et les autres paraissent à peu près également actives, d'après les essais faits. Les levures de rhum se tiennent généralement au fond des cuves, où elles se rassemblent en masses compactes. Quelques levures sont des levures de surface et forment au-dessus des cuves des écumes d'un beau jaune, qui sont ordinairement enlevées. Ces levures hautes sont en général des *Schizosaccharomyces*. »

Kayser a constaté la présence, dans les mélasses reçues des colonies françaises (Martinique, Guadeloupe, Réunion), de levures à scissiparité et à bourgeonnement, de levures basses, hautes et à voile. Les *Saccharomyces* de surface étaient en général peu actifs et n'avaient qu'un faible pouvoir fermentatif. La plupart des levures examinées supportaient un chauffage de 10 minutes à 55° et même, l'une d'entre elles, 2 minutes à 60°. La grande majorité faisait fermenter le lévulose, le glucose, le saccharose, le maltose, le mannose, le raffinose, le galactose et l'inuline, mais aucune n'attaquait la dextrine. Quelques levures hautes ne sécrétaient pas de sucrase et laissaient le saccharose intact. Le pouvoir alcoogène, la quantité et la qualité des acides (fixes ou volatils) produits, la réaction optima du milieu, l'odeur dégagée au cours de la fermentation, l'aspect des colonies géantes, etc., variaient d'une levure à l'autre.

Il est probable en conséquence qu'à côté des levures du groupe *cerevisiae*, il existe, dans les moûts de rhumerie, d'autres *Saccharomyces*, se différenciant notamment par leur action sur les divers sucres et les caractéristiques culturales (forme des colonies géantes). L'identification et la classification de ces levures demandent des études complémentaires.

### Levure Logos.

Levure de grande importance industrielle, mais dont les caractères morphologiques ont été peu étudiés. Elle possède des cellules allongées, ressemblant

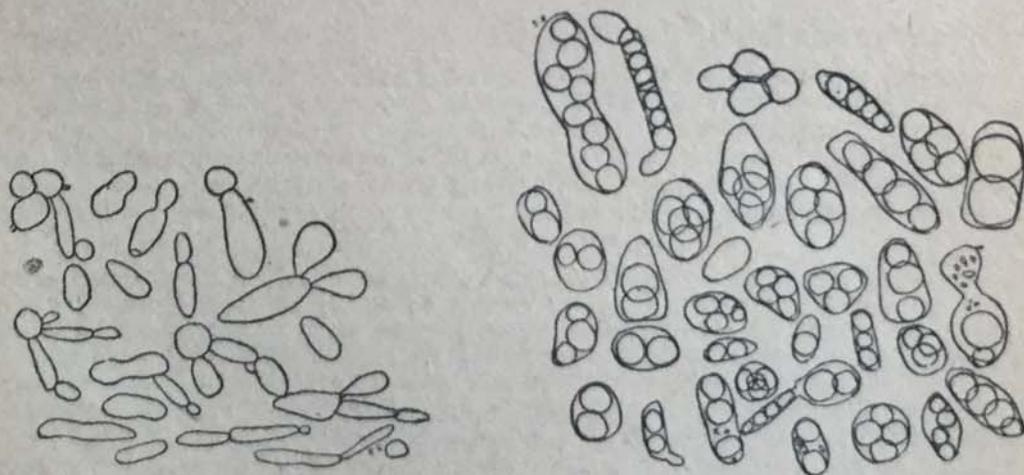


FIG. 13. — *Saccharomyces pastorianus*.

Cellules végétatives, d'après Hansen.

Formation des asques, d'après Hansen.

à celles du *Saccharomyces pastorianus* Hansen. Isolée par Van Laer et Denamur des levains employés à la brasserie Logos et Cie, à Rio-de-Janeiro, elle paraît tenir son origine d'une fermentation spontanée de jus de canne. C'est une

levure basse à fermentation lente, produisant peu d'alcool, mais ayant une très forte atténuation limite. Elle fait fermenter le glucose, le lévulose, le saccharose, le maltose, le galactose, le mannose, l'inuline et la dextrine.

### *Saccharomyces ellipsoideus* Hansen.

Cellules elliptiques ou arrondies, se développant sur moût de bière entre 0°5 et 40-41°. Asques généralement ellipsoïdales et petites, renfermant 1 à 4 spores mesurant 2 à 5 mus. A 4° et 32°5, les ascospores ne se forment pas ; elles apparaissent au bout de 26 heures à 30.5-31°5 ; de 21 h. à 25° (optimum) et de 41 jours à 10°5. Le voile ne se forme pas à 5°, ni à 38° ; il est complètement développé à 33-34° (optimum) au bout de 8-12 jours, et à 6-7° au bout

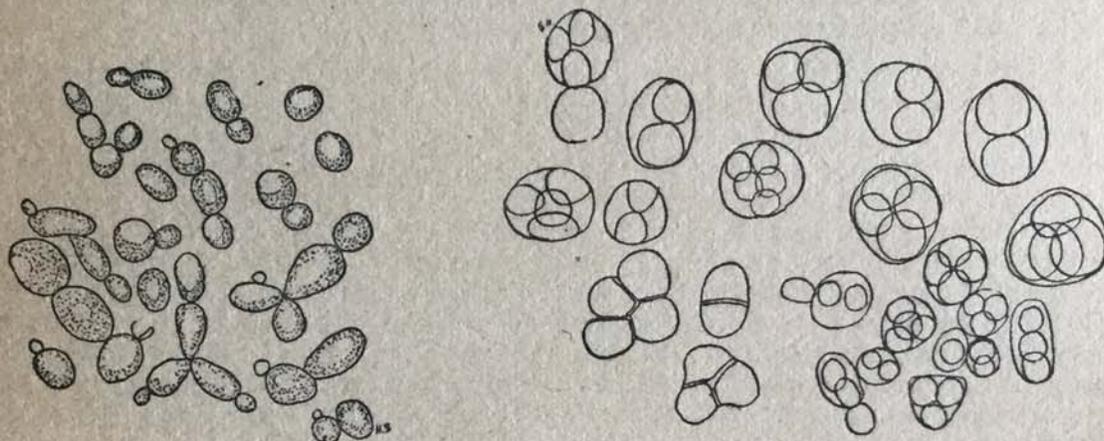


FIG. 14. — *Saccharomyces ellipsoideus*.

Cellules végétatives, d'après Hansen.

Formation des asques, d'après Hansen.

de 2-3 mois. Les cellules du voile sont souvent en forme de saucisse. La levure fait fermenter le glucose, le saccharose et le maltose.

Le *S ellipsoideus* a été découvert par Hansen à la surface des raisins. Il joue le rôle principal dans la fermentation du vin, et on y rattache de nombreuses races. Les levures de vin, notamment celles de Champagne, sont assez souvent employées dans la fabrication du rhum par levains purs ; on les utilise particulièrement à Cuba et parfois à la Martinique.

### *Saccharomyces Zopfii* Artari.

Cellules sphériques ou ellipsoïdales, de 3-6 mus de diamètre. Températures maxima de bourgeonnement 33-44°, optima 28-29°. Ascospores sphériques, de 1.5-3 mus de diamètre, au nombre de 1-4 par cellule (2 généralement) : température maxima de sporulation 32°. Les cellules végétatives peuvent supporter une température de 66-67°, et même, suivant Owen, de 90° pendant 10 minutes. La levure fait fermenter le glucose, le lévulose et le saccharose, mais n'a aucune action sur le maltose ni sur le lactose.

Isolé par Artari au cours de la fabrication du sucre en Saxe le *S Zopfii* a été rencontré par Owen dans les sucres de Cuba, où il constitue un des principaux agents de détérioration de ce produit, ainsi que dans les mélasses « blaskstnap ». Schweizer et Fischlin l'ont également trouvé dans les moûts de cerise et constaté qu'il produisait des quantités élevées d'acides volatils et d'esters. L'eau-de-vie obtenue était de qualité inférieure et présentait une odeur de fusel très prononcée.

Comme autres *Saccharomyces* intervenant dans la fermentation des mélasses de canne, on a encore signalé les espèces suivantes :

*Saccharomyces secundus* Groenewege. Cette levure qui se rattache au groupe *cerevisiae*, a été trouvée par Groenewege (1) dans une distillerie de Batavia. Elle jouerait un rôle relativement important dans la fermentation

(1) Arch. Suikerind. Ned. Indie XXIV, Med. N° 16, 1916.

*Saccharomyces javanensis* Groenewege. Même origine que la levure précédente ; importance très secondaire.

*Saccharomyces formosensis* Nakazaw (1). Isolé par Nakazawa, à Formose, d'un moût de mélasse de canne fermenté.

*Saccharomyces robustus* Nakazawa et *S. preciosus* Nakazawa (2). Isolées d'un moût de jus de canne fermenté à Manille, ces levures, qui ont un pouvoir ferment élevé, attaquent le glucose, le lévulose, le saccharose, le galactose, le mannose, le raffinose et le tréhalose, mais non le maltose, l'inuline ni la dextrine. Température optimales : 33 et 33°5 ; pH optimal 4.7-6.4 pour la première espèce et 5.3-6.1 pour la seconde.

### *Pichia californica* Siefert.

Cellules généralement ovales, mesurant 4-8 mus de long sur 3-5 mus de large, renfermant un corpuscule très réfringent. Elles forment un voile délicat, qui tombe au fond du récipient lorsqu'on le remue. Températures limites de bourgeonnement, dans un vin à 8° : 7-12° et 33° ; optima 28-30°. Dans le moût de bière, température maxima voisine de 39°. Températures limites de sporulation, 5-6° et 39-40° ; optimum voisin de 34°. Ascospores sphériques et réfringentes, mesurant 2-3 mus de diamètre, se formant seulement dans une solution alcoolique à 12 %.

Isolée par Siefert d'un vin rouge de Californie, cette levure a été rencontrée par Saito (3) dans la fermentation des moûts de mélasse de canne à l'île de Bonin (Japon) et constituerait le principal agent de cette fermentation.

### *Willia (Torula) Van Overeem.*

Isolée par De Kruyff du « ragi » et du « tapé » de Java, cette levure joue un rôle important dans la fabrication de l'arak de Batavia.

### *Torula* spp.

Ces levures constituent un groupe assez hétérogène, caractérisé par la forme généralement sphérique des cellules et l'absence de sporulation. Elles font souvent fermenter les sucres, surtout le glucose et le lévulose. De nom-

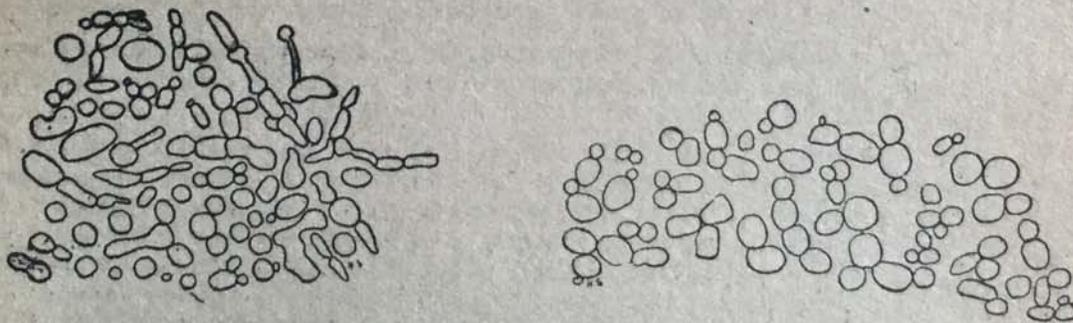


FIG. 15. — *Torulas*, d'après Hansen.

breuses formes ont été décrites par Hansen, Will, Pearce et Barker, Wehmer, etc...

Très répandues dans la mélasse, les *Torulas* interviennent fréquemment dans la fermentation spontanée des moûts sucrés. Douées d'un grand pouvoir oxydant, elles produisent beaucoup d'esters, dont la quantité croît avec la

(1) J. Agr. Chem. Soc. Japan IX, 285, 1933.

(2) J. Agr. Chem. Soc. Japan XII, 356, 1936.

(3) Z. Shiritusind. XXXI, 565, 1908.

richesse en azote et l'aération. Elles sont aérophiles, préfèrent l'azote amidé et ont comme pH optimum 4,5, suivant Kayser (1).

Ashby a isolé à la Jamaïque une espèce qui fait fermenter spontanément la mélasse, diluée ou non diluée (90° Brix). Elle ne forme pas de voile, mais seulement un anneau. Incapable d'invertir le saccharose, elle ne fait que faiblement fermenter le jus de canne ; mais, dans les moûts de mélasse, elle donne environ 8 % d'alcool. Elle détermine une fermentation très lente et produit des quantités considérables d'esters : jusqu'à 18 % de l'alcool formé, au bout de 24 jours.

Browne a décrit, sous le nom de *Torula communis*, une espèce qu'il a trouvée dans les sucres bruts de Cuba et qui fait fermenter le sucre inverti, mais non le saccharose. Elle peut se développer dans les solutions sucrées les plus concentrées et joue un rôle important dans la détérioration des sucres bruts, surtout entre le 9<sup>e</sup> et 15<sup>e</sup> jour suivant la fabrication.

### Monilia spp. — Odium spp.

Le genre *Monilia* comprend des champignons végétant sur moût de bière, sous forme d'un voile mycodermique ou, rarement, d'un simple anneau.

Browne a rencontré deux espèces : *Monilia nigra* et *M. fusca* Browne, à pigment noir, dans le sucre brut (dont ils provoquent la détérioration) et les mélasses de canne.

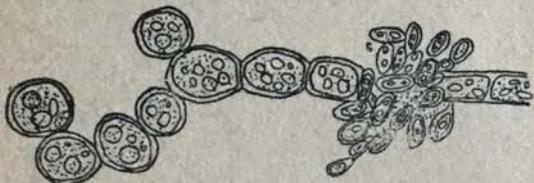


FIG. 9. — *Monilia nigra*. d'après Browde.

Sur agar saccharosé, les colonies de *M. nigra* se présentent d'abord sous la forme de taches étoilées. Elles sont constituées par des hyphes disposées radialement et donnant naissance à des cellules-levures transparentes. Lorsque les colonies ont atteint une certaine taille (1-15 mm), les hyphes se désarticulent en bouquets de conidies noires. Les cellules-levures,

de forme elliptique, peuvent donner naissance à de nouveaux hyphes ou se multiplier par bourgeonnement comme les levures. Le *M. fusca* se différencie de la *M. nigra*, par la coloration brun verdâtre des conidies, la longueur moindre des hyphes et la tendance moins prononcée à donner des cellules-levures.

Ces deux champignons se développent bien dans les solutions de sucre brut, excepté les plus concentrées, avec légère production de gaz et d'une odeur fruitée. Ils déterminent l'inversion du saccharose.

Went et Prinsen-Gleerligns (2), à Java, ont isolé du « ragi » une levure, qu'ils ont appelée *Monilia javanica* et qui interviendrait, d'après ces auteurs, dans la fermentation de l'arak de Batavia. Elle se présente sous l'aspect de cellules arrondies ou piriformes, parfois irrégulières, formant, au bout de 1-2 jours, un voile à la surface des liquides sucrés. Sur agar, on obtient des filaments mycéliens, donnant naissance à des cellules à forme levure. La *M. javanica* fait fermenter le glucose, le lévulose, le saccharose, le maltose et le raffinose mais non le lactose ni la dextrine. Elle produit environ 5 % d'alcool au bout d'une dizaine de jours. L'alcool obtenu possède un goût assez désagréable.

Peck et Deerr ont trouvé dans une mélasse de canne du Natal, une *Monilia* voisine de la *M. javanica*. Elle présentait l'intéressante propriété de donner au cours de la fermentation une odeur fruitée rappelant celle du meilleur rhum Jamaïque. En culture pure sur moût de mélasse, elle produisit 7,5 d'esters pour 100 d'alcool formé. Les esters étaient constitués principalement par de l'acétate et du butyrate d'éthyle.

(1) C. R. Acad. Agr. XI, 449, 1925.

(2) Verhand. Königl. Akad. Wetensch. Amsterdam IV, N° 2, 1895.

On a observé diverses autres espèces de *Monilia* susceptibles de faire fermenter les sucres, en donnant de l'alcool. A citer notamment *Monilia candida* Bonorden et *M. vini* Osterwalder. Leur pouvoir ferment est généralement faible.

Signalons enfin qu'Arroyo, à Porto-Rico, a utilisé dans la fermentation du jus de canne (Cf. Chap. VI.) un *Oidium*, l'*O. suaveolens*, trouvé dans la sève d'un arbre d'ombrage utilisé dans les plantations de caféiers. Ce champignon forme à la surface des moûts une fine pellicule. Il n'a que peu d'action sur les sucres, mais, en s'attaquant aux matières protéiques du milieu, il donne naissance à des quantités importantes d'acides organiques et d'esters. L'odeur dominante du bouquet est celle de pomme mûre.

---