Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin, 1991, **25**, N° 2, 85-97

DIFFÉRENCIATION DES PRINCIPALES ESPECES DE LEVURES DE VIN PAR L'ANALYSE DES ACIDES GRAS LIBRES TOTAUX PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE.

N. ROZES et Aline LONVAUD-FUNEL

Institut d'Œnologie, Université de Bordeaux II
351, cours de la Libération, 33405 Talence (France)

Résumé : *La différenciation des levures de fermentation des levures de contamination du vin par l'analyse de leurs profils en acides gras libres totaux a été évaluée. L'étude porte sur 39 souches de levures représentant 24 espèces. Les cultures se déroulent à la température de 25°C, en aérobiose et en milieu liquide.*

Par cette méthode, il est possible de différencier S. cerevisiæ des autres genres de levures, mais il semble toutefois difficile de déterminer de façon exacte la souche responsable de la contamination.

Enfin, ces résultats montrent qu'il est important d'étudier le métabolisme des acides gras, molécules indispensables à la survie des cellules afin de comprendre certaines réponses physiologiques des différentes espèces de levures.

INTRODUCTION

La fermentation alcoolique d'un moût de raisin est réalisée dans la majorité des cas par *Saccharomyces cerevisiæ*. Néanmoins, il peut arriver lors de l'élaboration des vins (filtration, vieillissement en barriques, mise en bouteille) que certaines levures dites de contamination altèrent les qualités organoleptiques du produit.

Les méthodes conventionnelles, observations microscopiques, tests physiologiques et biochimiques (BARNETT, 1983) sont peu discriminantes et peu rapides. Plus récemment, des techniques d'identification ont été proposées, mais elles nécessitent un matériel coûteux et une certaine technicité. Elles sont fondées sur la variabilité du génome de la levure : profils des caryotypes (BLONDIN et VEZINHET, 1988), polymorphisme de restriction de l'ADN mitochondrial (AIGLE et *al.* 1984).

L'analyse de la composition en acides gras totaux cellulaires par chromatographie en phase gazeuse est utilisée depuis longtemps comme critère d'identification chez les bactéries (ABEL et *al.*, 1963, MOSS et *al.*, 1974). Depuis cette technique a été testée chez la levu-

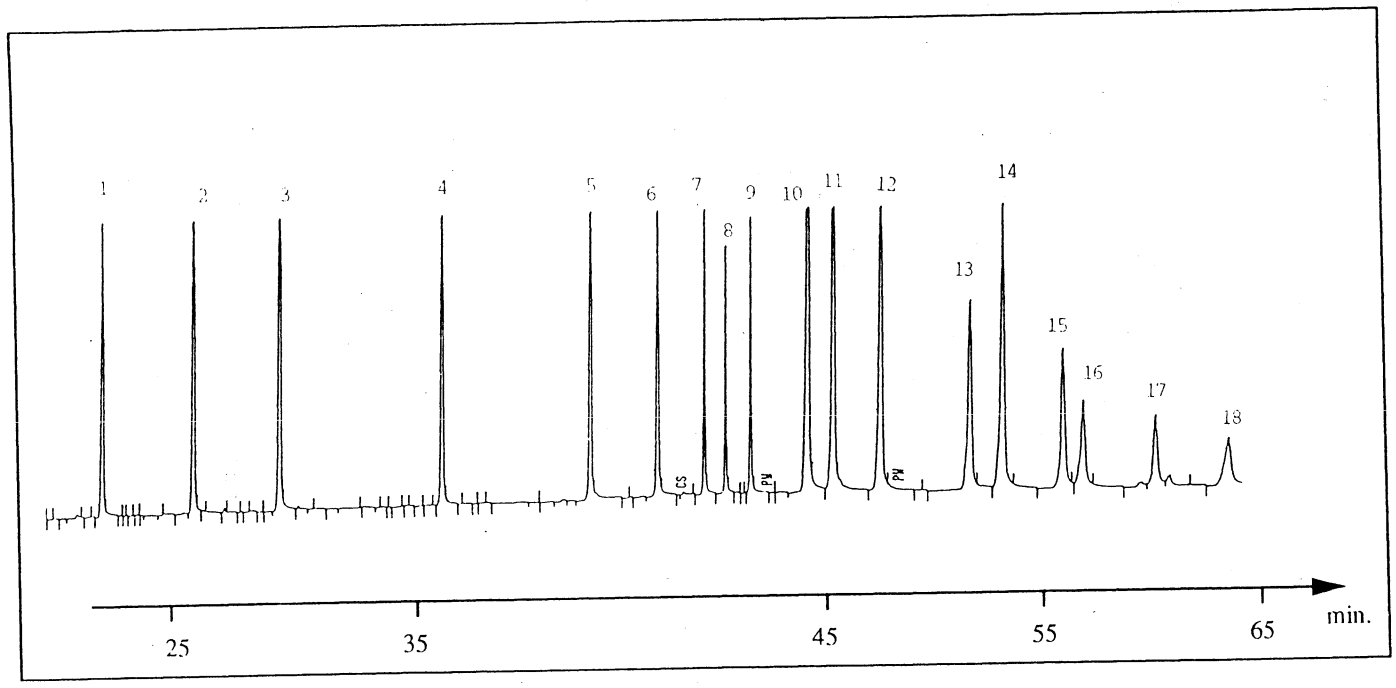


Fig. 1. : Chromatogramme d'une solution standard d'acides gras libres.

1 : acide caproïque (C6) - 2 : acide heptanoïque (C7) - 3 : acide caprylique (C8) - 4 : acide caprique (C10) - 5 : acide laurique (C12) - 6 : acide tridécanoïque (C13) - 7 : acide myristique (C14:0) - 8 : acide myristoléique (C14:1) - 9 : acide pentadécanoïque (C15) - 10 : acide palmitique (C16:0) - 11 : acide palmitoléique (C16:1) - 12 : acide heptadécanoïque (C17) - 13 : acide stéarique (C18:0) - 14 : acide oléique (C18:1) - 15 : acide linoléique (C18:2) - 16 : acide nonadécanoïque (C19) 17 : acide linolénique (C18:3) - 18 : acide arachidique (C20:0).

re notamment par GUNASEKARAN (1980), COTTREL (1985) KOCK (1986) TREDOUX (1987), OOSTHUIZEN (1987).

Dans ce travail, nous évaluons la possibilité de différencier les principales espèces de levures de vin en dosant uniquement les acides gras libres totaux cellulaires. Le dosage conventionnel des acides gras méthylés ne convient pas car il persiste après méthylation, des acides gras libres sur le chromatogramme. Les analyses sont effectuées sur des culots cellulaires de levures cultivées en conditions standard.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I — SOUCHES ET CONDITIONS DE CULTURE

Les différentes souches de levures étudiées proviennent du Centraalbureau voor Schimmelcultures, Yeast division, (Delft, The Netherlands (CBS)), de la collection de l'Institut d'Œnologie ou bien sont des levures commerciales. La vérification préalable des genres et des espèces a été effectuée par des tests biochimiques (galerie API) . Les cultures sont réalisées en erlenmeyers de 100 ml, contenant 50 ml de milieu, à partir de précultures âgées de 24 h. La composition du milieu (KOCK, 1985) est : 80 g/l de glucose (Sigma); 6,7 g/l de Yeast Nitrogen Base (Difco) exempts d'acides aminés et de 5 g/l de sulfate d'ammonium (Prolabo) ramené à pH 3,5. Il est stérilisé par filtration sur membrane Millipore de 0,45 µm. Les cultures inoculées à 1.10^6 cell./ml se déroulent à 25°C dans un bain agité (100 U/mn).

Les cellules, 1.10^8 cell./ml, sont récoltées en phase stationnaire (VILJOEN, 1986), c'est-à-dire pour la plupart des levures, après 48 heures de culture, par centrifugation à 2.500 g (Hettch EBA 3S). Les culots cellulaires lavés par trois fois avec de l'eau distillée stérile froide (+4°C), peuvent être utilisés immédiatement ou bien conservés à - 80°C.

II — EXTRACTION DES ACIDES GRAS LIBRES

La méthode d'extraction des acides gras libres totaux cellulaires est inspirée de celle mise au point par MOSS and *al.*, (1982). Les culots des cellules sont saponifiés par 1 ml de NaOH 5 p. cent (w/v) dans du méthanol aqueux 50 p. cent (v/v) à 100°C pendant 30 minutes. Après refroidissement des tubes, 0,5 ml de HCl 6N est ajouté. L'extraction est réalisée à trois reprises par 0,4 ml d'un mélange hexane (SDS) / méthyltertiobutyl éther (MTBE, ALDRICH), entrecoupée d'agitations de 20 secondes. L'extrait total obtenu est ensuite évaporé sous vide, puis est redissous dans 0,3 ml de MTBE.

III — ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE

Les acides gras libres sont dosés par chromatographie en phase gazeuse. Un microlitre d'extrait est injecté dans un chromatographe Hewlett Packard 5890 équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (F.I.D.) réglé à la température de 250°C. L'injection (220°C) est du type « splitless » sans division pendant 30 secondes et la température du four est programmée de 50 °C à 240 °C, à raison de 5°C par minute. La séparation des différents acides gras

TABLEAU I

Pourcentage de la composition en acides gras libres totaux des levures du genre *Saccharomyces*.

Genre	Espèce	Souche	Acides gras (%) (c)										
			C8	C10	C12	C14:0	C14:1	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
Saccharomyces	*cerevisiæ* (a)	B0 213	-	1,2	1,9	4,0	1,3	16,7	43,2	7,1	24,6	-	-
		Fermichamp	0,2	1,0	1,4	1,8	0,3	21,0	35,6	6,4	32,3	-	-
	cerevisiæ (b)	522 Davis	0,3	1,1	1,4	1,6	0,3	19,8	44,3	6,2	25,0	-	-
		EG8	-	0,5	1,3	2,4	0,5	16,0	47,3	3,5	28,5	-	-
		CBS 6978	0,2	1,0	1,6	1,9	0,5	16,4	48,8	5,4	24,2	-	-
		Fermirouge	-	0,5	0,8	1,6	0,5	12,4	51,0	6,2	27,0	-	-
		Fermicryo	0,2	1,1	1,4	1,7	0,3	19,5	43,9	7,3	24,6	-	-
		HK4	0,3	1,0	1,7	3,3	1,6	12,9	47,6	5,1	26,5	-	-
		Levuline K2	0,2	0,7	1,1	1,6	0,3	19,8	43,2	7,0	26,1	-	-
		Uvaferm CM	0,3	1,6	1,8	2,4	0,6	18,5	46,0	4,8	24,0	-	-
		VL1	0,2	0,8	1,2	1,7	0,5	15,2	48,6	6,0	25,8	-	-
		Sg 25	0,3	1,5	1,8	1,9	0,7	13,0	44,1	5,4	31,3	-	-
		Fermipan	-	1,2	2,4	2,8	0,7	19,0	47,9	3,6	22,4	-	-
		HB 12	0,5	1,8	1,9	1,9	0,5	15,0	46,8	5,2	26,4	-	-
		X	0,1	0,6	0,9	1,2	0,3	13,3	44,6	6,1	32,9	-	-
		CBS 6203	0,2	1,4	1,8	1,9	0,4	18,6	46,9	5,2	23,6	-	-
	italicus	61 IV	-	1,2	1,3	1,8	0,5	17,6	43,0	8,0	26,6	-	-
	rosei	SETRIC	-	0,4	0,7	1,9	0,3	19,9	32,6	4,4	23,1	16,7	-
		SC44	-	0,5	0,2	1,6	-	20,8	20,3	5,3	40,4	8,1	2,8

(a) race *bayanus* - (b) race *cerevisiæ* - (c) Pourcentage calculé par rapport à la totalité des aires. Moyenne de 4 extraits.

est effectuée sur une colonne capillaire HP-FFAP greffée TPA (longueur = 25 m, diamètre intérieur = 0,2 mm, épaisseur du film = 0,3 µm). Le gaz vecteur est l'hélium (débit de 1ml/mn).

Chaque pic est caractérisé par son temps de rétention et il est identifié d'après les chromatogrammes obtenus à partir de mélanges étalons d'acides gras (Sigma) : acides gras saturés pairs et impairs de 6 à 20 atomes de carbone et acides gras mono et polyinsaturés (figure 1). L'aire des pics est déterminée par intégration automatique (HP-3393 A) et la proportion de chaque acide gras est exprimée en pourcentage par rapport à la totalité des aires.

IV — PRÉSENTATION DES RÉSULTATS

Le traitement des données a été réalisé sur un ordinateur Macintosh. Le programme utilisé, ŒNO (1989), est un sous-ensemble du logiciel ADDAD (1985) permettant les analyses multidimensionnelles en composantes principales.

RÉSULTATS

L'étude a porté sur 39 souches (16 genres au total) de levures les plus fréquemment rencontrées en œnologie. Les tableaux I et II représentent les moyennes des résultats de 4 extraits issus d'une seule culture pour chaque souche étudiée.

I — COMPARAISON DES PROFILS EN ACIDES GRAS LIBRES DU GENRE *SACCHAROMYCES*

L'espèce *cerevisiæ* ne synthétise par d'acides gras polyinsaturés à nombre égal ou supérieur d'atomes de carbone à l'acide oléique (C18:1) (tableau I).

D'autre part, la comparaison des résultats obtenus pour les deux souches de *S. cerevisiæ* race *bayanus*, montre que des souches appartenant à une même espèce peuvent avoir des différences significatives quant à leur composition en acides gras totaux ($p<0,01$ au test de Student). En revanche, *Saccharomyces italicus* présente un profil semblable avec celui de *S. cerevisiæ*.

D'un autre côté, l'espèce *rosei* diffère de l'espèce *cerevisiæ*, par la présence d'acide linoléique (C18:2) pour la souche SETRIC et de l'acide linolénique (C18:3) pour la souche SC44.

Les rapports C16:1/C18:1 des deux souches *rosei* 1,41 pour SETRIC et 0,50 pour SC44, sont bien inférieurs au rapport moyen (16 espèces) de *S. cerevisiæ* qui est de 1,74.

II — COMPARAISON DES PROFILS EN ACIDES GRAS LIBRES DES AUTRES GENRES

Les résultats sont rassemblés dans le tableau II. *Hanseniaspora uvarum* se caractérise des autres genres par l'absence comme chez *Saccharomyces cerevisiæ* d'acides gras polyinsaturés. Toutefois, le rapport C16:1/C18:1 de 5,79 permet une discrimination immédiate avec *S. cerevisiæ*.

TABLEAU II

Pourcentage de la composition en acides gras libres totaux des principales espèces de levures de vin.

Genre	Espèce	Souche	Acides gras (%) (a)										
			C8	C10	C12	C14:0	C14:1	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
Hanseniaspora	*uvarum*	CBS 5914	-	0,2	0,4	1,8	0,6	16,6	63,7	5,7	11,0	-	-
Schizosacch.	*liquefaciens*	CBS 1042	-	-	0,3	1,6	0,4	18,4	51,7	6,1	16,3	5,2	-
Zygosacch.	*bailii*	CBS 680	-	0,1	0,1	0,5	-	14,0	17,6	6,0	42,1	19,2	-
Zygosacch.	*rouxii*	CBS 4021	-	0,3	0,9	1,8	-	17,6	15,4	8,3	28,1	27,6	-
Nadsonia	*elongata*	P 26	-	0,3	0,2	1,3	0,4	11,5	67,6	2,4	15,8	0,5	-
Dekkera	*intermedia*	Rmwt	0,3	1,5	4,8	3,1	1,3	19,0	51,3	4,5	12,0	2,2	-
Debaromyces	*hansenii*	LC 21	-	-	0,2	1,4	-	24,2	6,4	7,1	36,3	20,5	3,9
Hansenula	*anomala*	CBS 256	-	-	0,2	1,0	-	19,2	7,3	4,0	38,5	21,4	8,4
Hansenula	*saturnus*	CBS 5761	-	-	0,7	2,5	-	29,9	14,3	2,6	32,4	13,9	3,7
Metschnikowia	*pulcherrima*	33C	-	-	0,2	0,8	-	16,4	10,3	1,5	44,4	29,6	1,8
Rhodotorula		2L1	-	-	0,1	1,1	-	20,3	6,2	2,8	40,2	24,1	5,2
Sporobolomyces	*odorus*	CBS 483	-	-	0,2	0,8	-	20,3	5,2	3,4	37,5	27,4	5,2
Kluyveromyces	*lactis*	CBS 2359	-	-	0,3	1,8	0,2	20,5	34,5	5,0	18,0	16,8	2,9
Saccharomycodes	*ludwigii*	CBS 821	-	-	0,3	1,3	0,3	19,6	22,0	3,7	29,2	20,4	3,2
Brettanomyces	*intermedius*	CX 2	-	0,4	0,2	0,8	-	14,2	22,6	5,2	26,6	24,0	6,0
Torulopsis	*candida*	1t 2	-	0,3	0,2	1,1	-	18,8	12,2	4,6	37,8	22,8	2,2
Torulopsis	*stellata*	CBS 2649	-	0,3	0,6	1,6	-	21,6	32,3	8,0	27,9	6,2	1,5
Pichia	*fermentans*	CBS 4807	-	0,2	0,3	1,1	0,1	15,4	29,5	4,2	25,0	21,0	3,2
Pichia	*membranefaciens*	CBS 243	0,2	0,5	0,9	0,6	-	15,6	10,0	4,6	25,1	35,3	7,2
Pichia	*pseudopolymorpha*	CBS 2008	-	0,1	0,2	1,1	-	20,3	7,6	9,0	46,6	11,6	3,5

(a) Pourcentage calculé par rapport à la totalité des aires. Moyenne de 4 extraits.

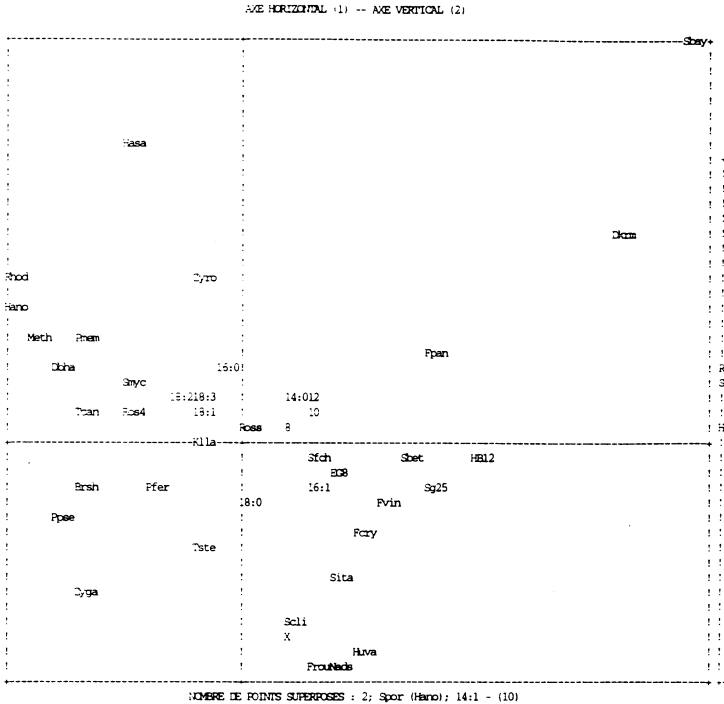


Fig. 2. : Analyse en composantes principales des levures. Axes 1 et 2

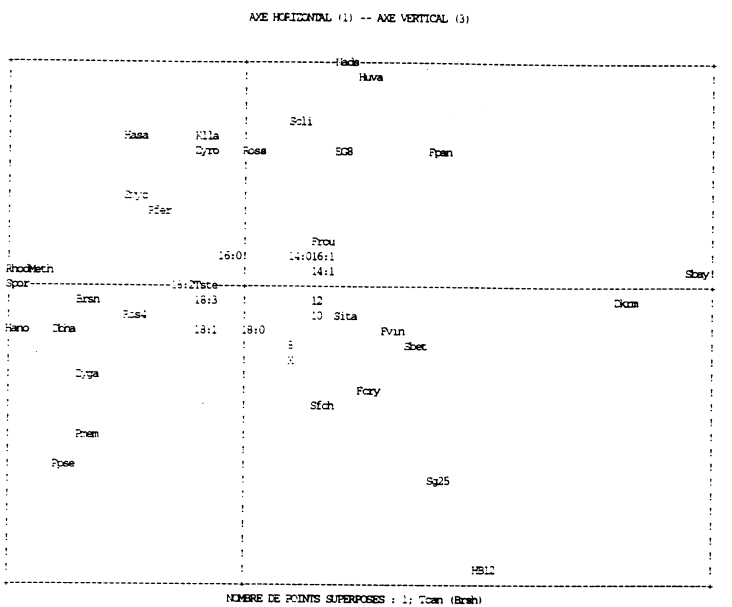


Fig. 3. : Analyse en composantes principales des levures. Axes 1 et 3

Hasa : *Hansenula saturnus* - Huva : *Hanseniaspora uvarum* - Scli : *Schizosacch. liquefaciens* - Nads : *Nadsonia elongata* - Klla Kluyveromyces *lactis* - Zyro : *Zygosacc. rouxii* - Smyc : *Saccharomycodes ludwigii* - Tste : *Torulopsis stellata* - Tcan : *Torulopsis candida* - Rhod : *Rhodotorula* - Dbha : *Debaromyces Hansenii* - Brsh : *Brettanomyces intermedius* - Hano : *Hansenula anomala* - Meth : *Metchnikowia pulcherrima* - Dkrm : *Dekkera intermedia* - Zyga : *Zygosacch. bailii* - Pmem : *Pichia membranefaciens* - Ppse : *P. pseudopolymorpha* - Pfer : *P. fermentans* -

Groupe des *Saccharomyces cerevisiæ* : Fpan : Fermipan - EG 8, X, Sg 25, HB 12 - Fvin : Fermivin - Frou : Fermirouge - Fcyo: Fermicryo - Schp : Fermichamp - Sbay : BO 213 Sita : *S. italicus* - Sbet : *S. beticus* - Ros4 : *S. rosei* (SC 44) - Ross : *S. rosei* (SETRIC).

Par soucis de simplification, les graphiques des observations (levures) avec ceux des variables (acides gras) ont été superposés.

Les autres genres de levures se distinguent entre eux par la présence concomitante ou non de C18:2 et de C18:3. Dans le groupe produisant seulement du C18:2, il apparaît que certaines levures *Nadsonia elongata et Dekkera intermedia* par exemple, ont un rapport C16:1/C18:1 de 4,28 et diffèrent en celà du genre *Zygosaccharomyces* (rapport moyen de 0,49).

Schizosaccharomyces liquefaciens a un rapport de 3,17.

Les levures qui forment du C18:2 et du C18:3 se caractérisent aussi par une absence quasi totale en acides gras volatils (C8 et C10) et peuvent être rassemblées arbitrairement dans trois groupes selon la valeur du rapport C16:1/C18:1 :

- il est inférieur à 0,5 chez *Hansenula anomala*, *H. saturnus*, *Sporobolomyces odorus*, *Rhodotorula*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Debaromyces hansenii*, *Torulopsis candida*, *P. pseudopolymorpha*, *P. membranefaciens*;

- compris entre 0,5 et 1 chez *Saccharomycodes ludwigii*, *Brettanomyces intermedius*;

- enfin, supérieur à 1 chez *Torulopsis stellata (Candida stellata)* et surtout *Kluyveromyces lactis*, désignée maintenant comme *K. marxiamus* variété lactis et *P. fermentans*.

Dekkera intermedia se distingue de sa forme imparfaite (*Brettanomyces intermedius*) par l'absence de C18:3 et par un rapport C16:1/C18:1 très élevé de l'ordre de 4,28. D'un autre côté, les profils en acides gras de *Debaromyces hansenii* (forme parfaite) et de *Torulopsis candida* sa forme imparfaite, sont semblables.

III — ANALYSE MULTIDIMENSIONNELLE

Les tableaux I et II ont été soumis à une analyse en composantes principales pour tenter de mettre en évidence des groupes de levures et de les relier à leur composition en acides gras. L'analyse s'effectue sur 34 des 39 individus étudiés et sur toutes les variables (11).

Les trois premières composantes principales ou axes principaux des A.C.P. sont retenus. Les figures 2 et 3 permettent de localiser l'ensemble des individus et des variables suivant les axes (1,2) et (1,3), respectivement.

Les deux premiers axes cumulent 67,4 p. cent de l'information tandis que les axes 1 et 3 rassemblent 62,2 p. cent de la variance. Au total, si les observations et les variables étaient matérialisées en trois dimensions, 77,4 p. cent de l'information seraient cumulés.

D'après les données numériques issues de l'A.C.P., les variables qui contribuent le plus fortement à la construction des axes 1,2 et 3 sont les suivantes :

- axe 1 : C14:1, C12, C10, C16:1, C14:0, C18:2 et C18:13;
- axe 2 : C18:0, C16:0, C16:1, C14:0 et C12;
- axe 3 : C8, C18:1, C18:0 et C10.

Le premier plan 1,2 (figure 2) oppose nettement les levures qui produisent des acides gras de chaîne moyenne et du C16:1 à celles qui forment des acides gras polyinsaturés. Il permet de faire ressortir globalement deux groupes de levures :

- toutes les *Saccharomyces*, exceptées les *S. rosei* et quelques genres comme *Hanseniaspora*, *Schizosaccharomyces*, *Nadsonia*. Ces dernières sont étroitement associées au C16:1 et au C18:0 (axe 2). *Dekkera* bien qu'elle ait une composition en acides gras voisine, se localise différemment sur le graphique, ceci est dû au fait que son pourcentage en acides gras de chaîne moyenne est plus important et que ces mêmes acides contribuent fortement à la construction de l'axe 1. D'autre part, les deux souches de race *bayanus* sont bien différenciées sur le graphique;

- les levures qui se caractérisent par la synthèse d'acides gras polyinsaturés. Il apparaît quelques relations entre certains genres. Ainsi, nous trouvons dans la même région, des levures qui s'associent plutôt au C16:0 et C18:2, *Hansenula saturnus*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Saccharomycodes ludwigii,* et celles qui se corrèlent mieux avec le C18:1 et le C18:3: *Hansenula anomala*, *Debaromyces hansenii*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces odorus*, *Pichia membranefaciens* et *Torulopsis candida*.

D'un autre côté, *Pichia fermentans* et *Kluyveromyces lactis* se regroupent à cause de leur pourcentage élevé en C16:1. Enfin, il existe un petit groupe d'individus dont les relations s'établissent par le biais du C18:0 et du C18:1, *Pichia pseudopolymorpha*, *Zygosaccharomyces bailii* et *Torulopsis stellata*.

A l'aide du plan 1,3 (figure 3), nous retrouvons des appariements à peu près identiques à ceux du premier plan. Néanmoins, des oppositions significatives entre certaines espèces se confirment, notamment entre les deux souches *Zygosaccharomyces* , entre *Dekkera* et *Brettanomyces*, entre les deux souches race *bayanus* et entre Fermipan et HB12 (*S. cerevisiæ*).

DISCUSSION

Il est bien établi que certains facteurs physico-chimiques comme la température et l'oxygène jouent un rôle important dans le métabolisme des acides gras (HUNTER et ROSE,1972; ANDREASEN et STIER, 1954). Le glucose intervient aussi de façon prépondérante sur la composition en acides gras de la cellule par l'effet qu'il induit sur l'activité de certaines enzymes (effet Crabtree (DE DEKEN, 1966)). Lorsque sa concentration augmente dans le milieu, la teneur en acides gras des levures Crabtree-positive diminue tandis que celle des levures Crabtree-négative s'élève (JOHNSON et *al.*,1972).

Les résultats de notre étude sont globalement en accord avec ceux rencontrés dans la littérature (ROSE et HARRISON, 1989). *Saccharomyces cerevisiæ* ne produit pas d'acides gras polyinsaturés supérieurs au C18:1. Toutefois, si l'analyse d'un profil en acides gras de *S. cerevisiæ* révèle la présence d'un acide gras polyinsaturé, l'origine de celui-ci peut être

imputée au milieu de culture dans lequel s'est développée la levure (MALKHAS'YAN et *al.*, 1983). En effet, d'après SCHWEIZER (1984), aucune enzyme « polydésaturase » comme la Δ^{12} ou la Δ^{15} désaturase n'existent chez *S. cerevisiæ*. De plus, cette particularité de « limiter » la désaturation de ces acides gras à longue chaîne semble liée à une réponse Crabtree-positive et à la formation de mutant « petite », c'est-à-dire à des cellules, qui placées dans des conditions de cultures telles, sont incapables d'utiliser le glycérol comme source de carbone (JOHNSON et BROWN, 1972).

Dans la nomenclature actuelle de KREGER-VAN RIJ (1984), *S. rosei* est classée comme *Torulaspora delbrueckii*. Une certaine hétérogénéité existe dans cette espèce puisque JOHNSON et BROWN (1972) notamment, trouvent pour deux souches de *T. delbrueckii* une composition en acides gras différente : l'une ne produit pas d'acides gras polyinsaturés et son profil varie peu de celui d'une *Saccharomyces*, l'autre synthétise du C18:2 et était répertoriée comme une *S. rosei*.

La désaturation plus complète du C18:1 en C18:2 et en C18:3 entraîne un changement dans les rapports entre acides gras insaturés et donc des modifications au niveau des membranes. Ceci n'est pas sans conséquences sur le plan physiologique. En effet, *S. rosei* a la particularité de faire fermenter le glucose très lentement en formant moins d'acidité volatile (CASTELLI, 1954) que *S. cerevisiæ*. D'autre part, selon divers auteurs, la désaturation ou du moins l'augmentation de la teneur cellulaire en C18:1 accentue la résistance à l'alcool de la levure (EATON et *al.*, 1982). Il est donc intéressant de remarquer qu'*Hanseniaspora uvarum* très peu résistante à l'alcool, synthétise beaucoup plus de C16:1 que de C18:1 et pas d'acides gras polyinsaturés.

Schizosaccharomyces liquefaciens présentée comme une *Schizo. pombe* (KREGER-VAN RIJ, 1984) semble différer par sa composition en acides gras des autres *Schizo. pombe* recensées dans la littérature; suivant les auteurs, elle ne contient pas d'acides gras polyinsaturés (JOHNSON et BROWN, 1972; TREDOUX et *al.*, 1987) ou bien du C18:2 et du C18:3, en très faible proportion (VILJOEN et *al.*, 1986a).

La composition en acides gras libres de la souche de *Saccharo. ludwigii* ne coïncide pas avec les profils généralement obtenus par KANEKO et *al.*, (1976) qui ne détectent pas d'acides gras polyinsaturés. Cette différence ne peut s'expliquer que par une hétérogénéité variétale de *Saccharo. ludwigii*, car outre la méthode analytique employée, les tests biochimiques nous assurent de l'appartenance de la souche étudiée à cette espèce.

Les levures à caractère oxydatif forment des acides gras polyinsaturés et sont de plus, Crabtree-négative. Certaines sont résistantes à l'alcool et à des antiseptiques.

L'analyse en composantes principales permet d'illustrer et de mettre en évidence quelques relations entre les différentes levures. La comparaison des groupes que nous avons constitués montre des divergences avec les résultats obtenus par TREDOUX (1987). Il est certain que si nous avions établi un groupage à partir des seules données analytiques, des levures qui s'associent fortement par l'A.C.P comme *Schizosacch. liquefaciens* et *Hanseniasp. uvarum*, auraient été placées dans deux groupes distincts parce que l'une produit du C18:2

et l'autre pas. Il est vrai aussi que les souches étudiées par TREDOUX et ses collaborateurs ne sont pas les mêmes bien qu'elles appartiennent conventionnellement à la même classification. Il faudrait donc examiner les profils en acides gras de ces souches pour expliquer cette différence.

D'autre part, l'analyse statistique souligne parfaitement les corrélations positives et négatives qui existent entre les acides gras. Ainsi, les acides gras de chaîne moyenne se regroupent entre eux (C8 au C14:1) et s'opposent nettement aux acides gras polyinsaturés (C18:2 et C18:3). Il pourrait en résulter des modifications sur le plan physiologique lorsque les levures sont placées dans des conditions de culture défavorables; cela explique peut-être pourquoi *S. cerevisiæ* connait des difficultés dans certaines conditions, pour achever la fermentation alcoolique (GENEIX, 1984). De même, les corrélations négatives entre le C16:0 et le C16:1, et entre le C18:0 et le C18:1, reflètent bien l'origine de l'acide gras insaturé à partir de l'acide gras correspondant (SCHWEIZER et *al.* 1978).

CONCLUSION

Cette étude quoique partielle souligne les difficultés d'établir une classification rigoureuse des levures. Si l 'examen des profils en acides gras libres totaux des levures permet une discrimination entre certains genres, voire espèces, il parait délicat d'identifier des souches d'une même espèce.

En revanche, ce travail montre l'intérêt de connaître et de comprendre les phénomènes adaptatifs d'un microorganisme face à son environnement, surtout dans les conditions qui prévalent en œnologie : variation de la température de la fermentation, résistance à l'alcool et aux pesticides, production faible d'acidité volatile, etc....

L'utilisation de l'A.C.P. nous permet de relier plus « intimement » les levures avec leur synthèse en acides gras; une étude plus exhaustive du métabolisme des lipides en relation avec les conditions de culture nous renseignerait davantage.

Manuscrit reçu le 8 juillet 1991; accepté pour publication le 25 juillet 1991.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ABEL K., de SCHMERTZING H. et PETERSON J.I., 1963. Classification of microorganisms by analysis of chemical composition. - I. Feasibillty of utilizing gas chromatography. *J. Bact.*, **85,** 1039-1044.

ADDAD, 1985. Association pour le développement et la diffusion de l'analyse des données. Laboratoire de Statistique, 4 place Jussieu, 75005 Paris.

AIGLE M., ERBS D. and MOLL M., 1984. Some molecular structures in the genome of layer

brewing yeast. *Am. Soc. of Brewing Chemists.*, **43**, 1-7.

ANDREASEN A.A. et STIER T.J.B., 1954. Anaerobic nutrition of *S. cerevisiæ* - II Unsaturated fatty acid requirement for growth in a defined medium. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **43**, 271-284.

BARNETT J.A., PAYNE R.W and YARROW D., 1983. *Yeasts : Characteristics and identification* (1st ed.), Cambridge, University Press, New-York.

BLONDIN B. et VEZINHET F., 1988. Identification de souches de levures œnologiques par leurs caryotypes obtenus en électrophorèse en champ pulsé. *Rev. Fr. Œnologie*, **115**, 7-11.

CASTELLI T., 1954. Les agents de la fermentation vinaire. *Arch. für Mikrobiologie*, IV, **20**, 323-342.

COTTREL M., KOCK J.L.F., LATEGAN P.M., BOTES P.J. and BRITZ T.J., 1985. The long -chain fatty acid compositions of species representing the genus *Kluyveromyces. FEMS Microbiol. Lett.*, **30**, 373-376.

DE DEKEN R.H., 1966. The Crabtree effect : a regulatory system in yeast. *J. Gen. Microbiol.*, **44**, 149-156.

EATON L.C., TEDDER T.F. and INGRAM L.O, 1982. Effects of fatty acid composition on the sensitivity of membrane functions to ethanol in *Escherichia coli. Substances and alcohol actions/misuse*, **3**, 77-87.

GENEIX C., 1984. Recherches sur la stimulation et l'inhibition de la fermentation alcoolique du moût de raisin. *Thèse Docteur-Ingénieur*, Université de Bordeaux II.

GUNASEKARAN M. and HUGUES W.T., 1980. Gas liquid chromatography : a rapid method for identification of different species of Candida. *Mycologia*, **72**, 505-511.

HUNTER K et ROSE A.H., 1972. Lipid composition of *S. cerevisiæ* influenced by growth temperature. *Biochem. Biophys. Acta*, **260**, 639-653.

JOHNSON B. NELSON S.J. and BROWN C.M., 1972. Influence of glucose concentration on the physiology and lipid composition of some yeasts. *Ant. Van. Leeuwen.*, **38**, 129-136.

JONHSON B. and BROWN C.M., 1972. A possible relationship between the fatty acid composition of yeasts and the « petite » mutation. *Ant. van Leeuwen.*, **38**, 137-144.

KANEKO H., HOSOHARA M., TANAKA M. and ITOH T., 1976. Lipid composition of 30 species of yeast, *Lipids*, **11**, **12**, 837-844.

KOCK J.L.F., LATEGAN P.M., BOTES P.J . AND VILJOEN B.C., 1985. Developing a rapid statistical identification process of different yeast species. *J. Microbiol. Methods*, **4**, 147-154.

KOCK J.L.F., COTTRELL M. and LATEGAN P.M., 1986. A rapid method to differenciate between five species of the genus *Saccharomyces*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 499- 501.

KREGER-VAN RIJ N.J.W., 1984. *The yeasts, a taxonomic study*, 3rd ed., Elsevier, Amsterdam.

MALKHAS'YAN S.S., NECHAEV A.P., GAVRILOVA N.N., ZOTOVA E.E. and DORONINA O.V., 1983. *Mikrobiologiya*, URSS, **19**, 193.

MOSS C.W., LAMBERT M.A. and MERWIN W.H., 1974. Comparison for rapid methods for analysis of bacterial fatty acids. *Appl. Microbiol.*, **28**, 80-85.

MOSS C.W., SHINODA T. and SAMUELS J.W., 1982. Determination of cellular fatty acid compositions of various strains yeasts by gas-liquid chromatography. *J. Clin. Microbiol.*, 16, **6**, 1073-1079.

ŒNO-89, DURCOS S., SAMYN L. SOENEN , J.M. et MEDINA B., 1989. Logiciel d'analyse de données sur Macintosh. Maîtrise d'Informatique. Université de Bordeaux I.

OOSTHUIZEN A., KOCK J.L.F. , BOTES P.J. and LATEGAN P.M., 1987. The long-chain fatty acid composition of yeasts used in the brewery industry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **26**, 55-60.

ROSE A.H. and HARRISON J.S., 1989. *The yeasts - Metabolism and physiology of yeasts.* Vol. 3, 2nd, Academic Press, London.

SANDRA P. and VERZELE M., 1975. Analysis of long-chain fattay acids in beer. *J. Inst. Brew.*, **81**, 302-306.

SCHWEIZER E., WERKMEISTER K and JAIN M.K., 1978. Fatty acid biosynthesis in yeast. *Mol. Cell. Biochem.*, **21**, 95-107.

SCHWEIZER E., 1984. In « *Fatty acid metabolism and its regulation* », (S. NUMA, ed.), 59-83, Elsevier, Amsterdam.

TREDOUX H.G., KOCK J.LKF and LATEGAN P.M., 1987. The use of cellular long-chain fatty acid composition in the identification of some yeasts association with the wine industry. *System. Appl. Microbiol.*, **9**, 299-306.

VILJOEN B.C., KOCK J.L.F. and LATEGAN P.M., 1986. The influence of culture age on the cellular fatty acid composition of four selected yeasts. *J. Gen. Microbiol.*, **132**, 1895-1898.