Connaissance Vigne Vin, 1985, **19**, N° 4, 215-228.

OBSERVATIONS SUR L'EVOLUTION DES ACIDES GRAS CELLULAIRES PENDANT LA FERMENTATION ET LA REFERMENTATION

A. CAVAZZA, P. GIUDICI, L. CONTE* et M. ELISABETTA GUERZONI

Dipartimento di Protezione e Valorizzazione Agro-Alimentare,
Sezione di Microbiologia - Università degli Studi di Bologna,
Via S. Giacomo 7, 40126 Bologna (Italie).
* Servizio Vigilanza e Repressione Frodi, Ministero Agricoltura e Foreste,
Istituto di Chimica Agraria, Via S. Giacomo 7, 40126 Bologna (Italie)

INTRODUCTION

Les membranes cytoplasmiques de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* contiennent de 30 à 50 p. 100 de lipides constitués principalement de phospholipides, stérols libres, stérols estérifiés et, en quantité moins importante, de tryglycérides (RATTRAY et *al.*, 1975 ; BRENNAN et LOSEL, 1978). Ces constituants jouent un rôle très important dans l'activité des enzymes associés aux membranes, dans la morphogénèse, dans les mécanismes de perméation des substances nutritives et dans le maintien de la vitalité cellulaire (PROUDLOCK et *al.*, 1969, 1971 ; HASLAM et *al.*, 1973 ; ELETR et *al.*, 1974 ; ELLIOTT, 1977 ; LAFON-LAFOURCADE et *al.*, 1979 ; LARUE et *al.*, 1980 ; THOMPSON et *al.*, 1974 ; KEENAN et *al.*, 1982).

Du fait de la multiplicité de ces fonctions, la composition lipidique des membranes subit d'importantes modifications en réponse aux conditions physicochimiques du milieu (RATTRAY et *al.*, 1975 ; GUERZONI et *al.*, 1985) et tout particulièrement aux variations de la température (KATES et *al.*, 1961), de la quantité d'oxygène présent (ANDREASEN et STIER, 1954), de la concentration des sources d'azote, de sucres et d'éthanol (BOTHAM et RATLEDGE, 1975 ; RATLEDGE, 1982 ; BEAVEN et *al.*, 1982).

La modification de ces variables pendant la fermentation des moûts de raisin rend difficile la séparation de leur influence individuelle sur la composition lipidique cellulaire, de l'incidence que cette dernière peut avoir sur les processus de fermentation.

Les variables, dont les effets ont été l'objet des études les plus approfondies dans le domaine de l'œnologie, ont été, outre l'aération, la concentration en éthanol ; en particulier, on a étudié l'influence de l'alcool extra-cellulaire sur la composition en acides gras des cellules de levure. En effet, l'éthanol est le facteur auquel on a attribué une action prépondérante sur le bon fonctionnement des membranes, même si, sou-

vent, les différents auteurs ne distinguent pas entre les effets de l'éthanol extracellulaire et ceux de l'éthanol intracellulaire. Il est admis que, pendant la phase exponentielle de la fermentation, la concentration de l'alcool intracellulaire est plus élevée que la concentration extracellulaire. Quand les cellules atteignent la phase stationnaire, il continue à sortir par diffusion facilitée ou par gradient de concentration (BEAVEN et *al.*, 1982). Toutefois, la plus grande partie des connaissances sur l'action de l'éthanol à l'égard des mécanismes de l'inhibition des diverses activités cellulaires, découlent de l'étude des effets de l'éthanol ajouté au milieu en systèmes relativement simples (NAGODAWITHANA et STEINKRAUS, 1975 ; NAVARRO et DURAND, 1978 ; NOVAK et *al.*, 1981 ; BROWN et *al.*, 1981).

Dans les divers groupes microbiens étudiés on a observé, en relation avec l'augmentation de la concentration en éthanol, une élévation du niveau d'insaturation des acides gras et, en particulier, une formation accrue d'acide oléique.

Dans un travail précédent, conduit sur un nombre assez important de souches, on n'a relevé aucune corrélation entre l'activité fermentaire et le niveau d'insaturation des acides gras ; il existait, par contre, une corrélation positive et significative avec le pourcentage relatif d'acide oléique dans les cellules au moment de l'inoculation (GIUDICI et *al.*, 1983). On a retenu qu'une étude sur l'évolution des acides gras pendant un processus de fermentation ou de refermentation, conduit par des souches de capacité fermentaire différente, pourrait apporter des informations utiles sur les variations de certains constituants cellulaires en réponse aux diverses conditions de fermentation et en relation avec la production d'éthanol des diverses souches.

MATERIEL ET METHODES

I — SOUCHES.

Les souches de *Saccharomyces cerevisiae* utilisées appartiennent à la collection du Département (Section microbiologique).

II — MILIEU.

On a employé un milieu synthétique (GIUDICI et *al.*, 1983) avec une concentration en glucose de 5 et 25 p. 100.

III — CONDITION DE CULTURE.

Le milieu de culture de l'inoculum contenait 5 p. 100 de glucose ; les souches ont été inoculées en double sur 300 ml de milieu maintenu en agitation horizontale pendant 36 heures. Les cellules ont été recueillies par centrifugation : une moitié a été utilisée pour les déterminations analytiques, l'autre moitié employée comme inoculum.

Les expérimentations de fermentation ont été conduites avec 100 et 400 ml de milieu synthétique à 25 p. 100 en glucose sous une couche d'huile de paraffine. Dans certaines conditions on a ajouté : éthanol 1 M ; Tween 20 ou Tween 80 (Merck) : 7 g par litre.

IV — DETERMINATION DES LIPIDES.

L'extraction des lipides a été effectuée à l'aide d'un mélange chloroforme-méthanol (1 : 1). L'extrait, séparé des cellules par filtration et lavé avec 0,2 volume de KC1 0,1 M a été évaporé sous vide ; le résidu a été transféré avec le même mélange de solvants dans un ballon jaugé de 10 ml. La quantité totale de lipides a été déterminée en poids sec, après élimination totale du solvant sous vide.

V — ANALYSES EN CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE (GLC).

Les esters méthyliques des acides gras ont été obtenus selon METCALFE (1961). Les conditions d'analyses sont : appareil Fractovap Carlo Erba 4200, colonne en verre (longueur : 2 m ; diamètre intérieur : 2,5 mm) remplie LAC 728 à 15 p. 100 sur gas Chrom P. 80-100 mesh ; Gaz vecteur : N_2 ; flux 30 ml par minute ; température de la chambre : 200°C ; températures de l'injecteur et du détecteur : 210°C.

RESULTATS

I — MODIFICATION DE LA MASSE CELLULAIRE PENDANT LA FERMENTATION ET LA REFERMENTATION.

L'évolution de la masse cellulaire, relative à la souche 9109, dans un processus de fermentation et de refermentation en présence d'éthanol 1 M, est représentée figure 1.

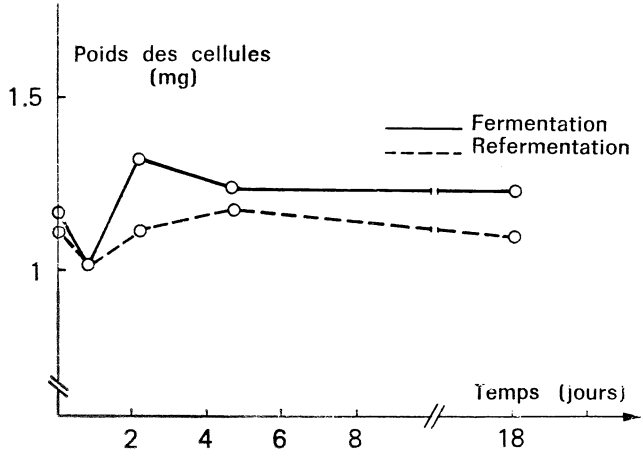


Fig. 1. — Evolution de la masse cellulaire exprimée en poids sec (g par 400 ml) pendant la fermentation et la refermentation.

Les expériences ont été répétées quatre fois, chaque mesure étant faite en double. La quantité de cellules inoculées, constante dans tous les échantillons, était de 1,10 g (en poids sec). Cette quantité correspondait à une valeur excédant largement le niveau de population normalement atteint en phase stationnaire dans un processus de fermentation des moûts. Cette précaution a été adoptée pour limiter l'interférence de la variable « multiplication cellulaire ». Dans la figure 1, on peut observer un déclin rapide de la masse cellulaire inoculée pendant les 18 premières heures, dans les deux conditions considérées. Dans le cas d'une fermentation, 48 heures après l'inoculation, la masse cellulaire a récupéré sa valeur initiale et se maintient à cette valeur ; pendant tout le processus, la récupération est plus lente en présence d'éthanol 1 M et la valeur initiale n'est atteinte qu'après 5 jours.

II — EVOLUTION DE LA COMPOSITION EN ACIDES GRAS.

A intervalles divers, on a déterminé les lipides totaux et le pourcentage de chaque acide gras dans les cellules. La figure 2 montre l'évolution du contenu lipidique exprimé soit en valeur absolue soit en pourcentage relatif au poids sec cellulaire. Les deux variables ont une évolution analogue à celle de la masse ; une récupération rapide fait suite à une diminution dans les premières heures après l'inoculation. les figures 3 et 4 montrent l'évolution des pourcentages relatifs et celle des quantités absolues de chaque acide gras.

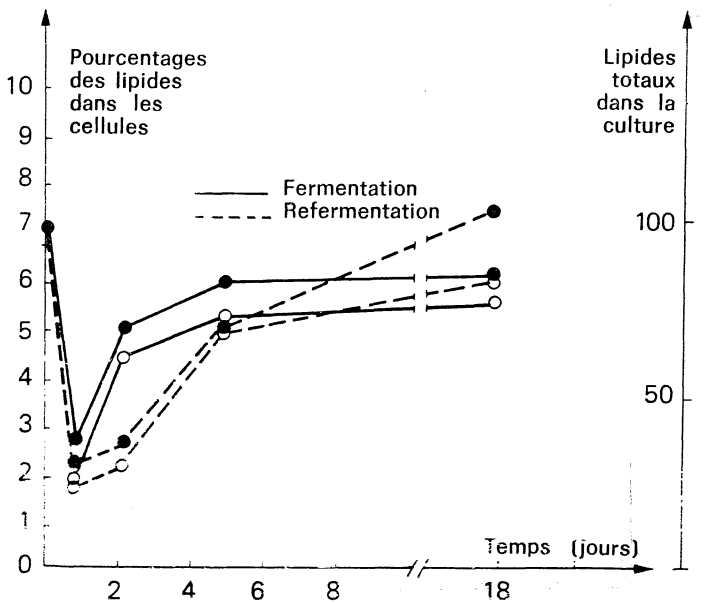


Fig. 2. — Evolution du contenu lipidique en valeur absolue (0) et du pourcentage (w/w) des lipides totaux dans la masse cellulaire pendant la fermentation et la refermentation.

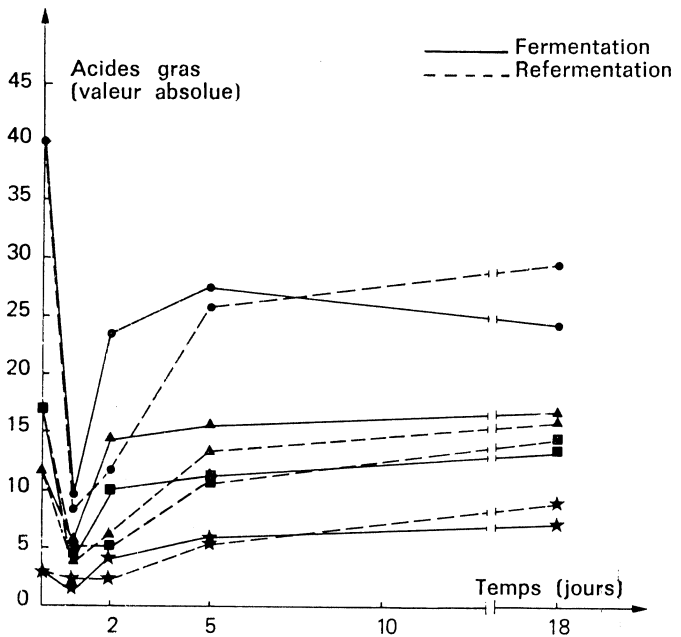


Fig. 3 – Evolution du contenu en acides gras totaux dans 400 ml de culture pendant la fermentation et la refermentation.
▲ = C16 : 0 ; ● = C16 : 1 ; ★ = C18 : 0 ; ■ = C18 : 1

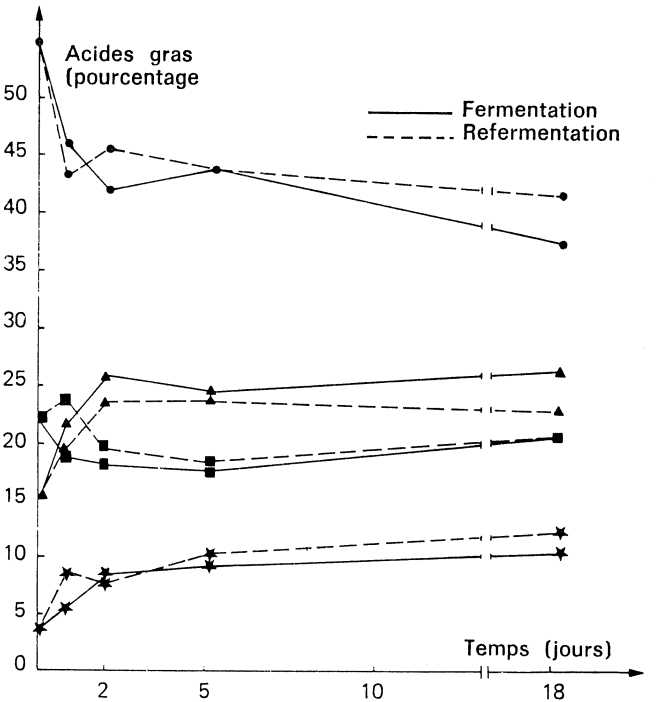


Fig. 4 – Evolution du pourcentage des acides gras (sur les acides gras totaux des cellules) pendant la fermentation et la refermentation.
▲ = C16 : 0 ; ● = C16 : 1 ; ★ = C18 : 0 ; ■ = C18 : 1

On a considéré principalement les acides gras présents en quantités les plus importantes : acides palmitique, palmitoléique, stéarique et oléique. Comme on peut l'observer, les pourcentages des acides gras saturés (C 16 : 0 et C 18 : 0) augmentent déjà dans les premières heures de la fermentation, dans les deux processus, tandis que diminuent les pourcentages d'acides gras non saturés, à l'exception du C 18 : 1, dans la première phase de la refermentation. De la comparaison avec l'évolution des valeurs absolues reportées sur la figure 3, on peut formuler l'interprétation suivante :

1) Au cours des premières 18 heures suivant l'inoculation, on observe une lyse cellulaire avec une diminution conséquente du contenu lipidique qui passe probablement dans le milieu par effet de la désagrégation cellulaire.

2) Les pourcentages relatifs diminuent en raison d'une reconversion ou d'une lyse sélective des cellules plus vieilles notoirement caractérisées par un contenu lipidique plus élevé.

3) Dans les phases suivantes les pourcentages relatifs des acides gras non saturés n'atteignent pas les valeurs initiales par effet de la désactivation, en anaérobiose des désaturases oxygène-dépendantes (ERWIN, 1973 ; BROWN et ROSE, 1969 ; ANDREASEN et STIER, 1953). La récupération partielle, en valeur absolue, de C 18 : 1 et de C 16 :1, observée, peut être justifiée par réabsorption, dans les cellules nouvelles, des acides gras excrétés dans les premières heures de l'inoculation.

4) Les acides gras saturés, dont la synthèse n'est pas inhibée en en anaérobiose, augmentent en relation avec la reprise de la multiplication cellulaire, tant en valeur relative qu'en valeur absolue.

L'évolution des paramètres considérés est semblable pendant les processus de fermentation et de refermentation, exception faite pour le C 18 : 1 qui augmente, en valeur relative, dans les cellules prélevées 18 heures après l'inoculation dans le milieu en présence d'éthanol 1 M. Ce comportement est en accord avec ce qui a été mis en évidence par BEAVEN et ROSE (1982).

On a voulu vérifier si le comportement de la souche 9109 peut être généralisée, dans ces conditions, à l'espèce *Saccharomyces cerevisiae,* en considérant 15 souches productrices de degrés divers d'alcool. Sur le tableau I sont rapportées les valeurs initiales et finales des acides C 16 : 0, C 16 : 1, C 18 : 0, C 18 : 1, exprimées en pourcentages relatifs. Exception faite des souches 7027 et 868, toutes les autres présentent le niveau de saturation le plus élevé à la fin du développement.

TABLEAU I

Composition en acides gras cellulaires pour différentes souches de *S. cerevisiae* au moment de l'inoculation (I) et à la fin de la fermentation (F)

Souches	C 16 : 0		C 16 : 1		C 18 : 0		C 18 : 1	
N°	I	F	I	F	I	F	I	F
6842	13,0	23,8	52,6	45,7	5,5	10,6	28,9	19,7
7027	16,3	14,9	55,2	40,9	3,6	7,8	29,9	36,1
868	21,7	17,2	41,8	47,5	8,3	7,1	28,2	27,7
5215	10,9	15,5	54,3	47,8	4,6	7,1	30,7	29,5
964	18,6	24,0	49,8	48,7	6,3	5,1	25,4	22,1
10181	11,6	18,4	47,3	45,3	6,4	7,9	34,3	28,3
872	14,3	21,4	51,4	44,1	5,3	10,5	29,0	23,8
626	4,0	21,0	42,3	45,6	6,6	9,5	47,1	23,7
855	9,8	22,4	58,2	44,7	2,9	8,9	29,1	23,8
345	8,8	19,7	52,4	45,8	5,7	9,1	33,2	25,2
867	12,7	15,0	58,3	51,3	3,8	6,8	25,2	26,6
820	9,8	14,7	57,2	49,9	2,9	5,6	30,1	29,6
4074	10,4	12,4	58,2	51,2	3,0	6,5	28,4	29,7
889	13,8	14,0	53,3	51,4	5,7	5,6	27,3	28,8
822	8,0	15,3	66,8	51,5	4,5	6,7	20,7	26,3

Dans des conditions anaérobies la réponse immédiate des cellules en contact avec de l'éthanol extracellulaire consiste en une augmentation du pourcentage des acides gras non saturés et en particulier de l'acide oléique. Les conditions adoptées dans cette série d'expériences (semi-anaérobie) sont à même d'empêcher une reprise de la multiplication cellulaire, accompagnée d'une synthèse d'acides gras saturés.

III — RELATION ENTRE LA COMPOSITION CELLULAIRE EN ACIDES GRAS ET L'ALCOOL PRODUIT SELON LA SUPPLEMENTATION DU MILIEU EN SOURCES D'ACIDES GRAS.

La souche 9109 précultivée en fermenteur, recueillie par centrifugation, a été inoculée, à raison de 1,11 g (en poids sec) dans 400 ml de milieu synthétique contenant 25 p. 100 de glucose et addtionné de tween 80 ou tween 20.

Sur le tableau II sont reportés les pourcentages des lipides totaux de chaque acide gras, le contenu total des lipides, la variation de masse à la fin du processus et la production d'éthanol. On peut observer que la masse des cellules subit des variations peu importantes si ce n'est en présence de tween 20 et d'éthanol 1 M qui provoquent une diminution de 24 p. 100. On peut observer surtout que les concentrations en alcool sont plus élevées au total en présence d'éthanol ajouté, même si la quantité produite est plus basse. Ceci montre que l'arrêt de la fermen-

TABLEAU II

Influence de l'addition de deux sources d'acides gras au milieu en fermentation et refermentation sur la composition en acides gras cellulaires pour une souche de *S. cerevisiae*

Ethanol / Sources d'acides gras	Témoin	0 Tween 80	0 Tween 20	1 M 0	1 M Tween 80	1 M Tween 20	Cellules initiales
Acides gras cellulaires (%, a) :							
C12 : 0	1,9	1,5	18,1	1,5	1,2	16,3	2,1
C14 : 0	1,0	1,1	7,4	1,0	1,3	6,9	2,2
C16 : 0	26,1	19,2	22,3	22,3	17,8	16,9	15,5
C16 : 1	36,2	31,6	24,4	40,6	33,9	33,0	52,7
C18 : 0	10,7	8.6	8,0	12,1	8,8	6,4	3,6
C18 : 1	25,0	35,0	17,0	20,4	34,9	17,9	22,2
Lipides totaux (%, b)	6,32	11,7	12,3	7,2	7,3	9,3	7,72
Variation du poids sec cellulaire (c)	+ 70	+ 70	+ 20	— 60	+ 20	— 25	
Ethanol produit (d)	9,99	9,01	8,28	6,54	6,96	6,29	
Ethanol total (e)	"	"	"	11,14	11,56	10,89	

a : calculés sur les acides gras totaux ; b : calculés sur 100 g de cellules (poids sec) ; c : en mg de poids sec sur 400 ml de culture ; d : pourcentage (V/V) ; e: éthanol produit plus éthanol ajouté.

tation n'est pas imputable, au moins dans ce cas, à l'éthanol extracellulaire. En refermentation les cellules ont continué à fermenter en présence de teneurs extracellulaires en éthanol supérieures à 11 p. 100, tandis que dans le processus primaire la fermentation n'a pas dépassé 10 p. 100. Dans les cultures additionnées de tween 80, la production d'éthanol n'est favorisée que dans le processus de refermentation ; au contraire, le processus de fermentation primaire est partiellement inhibé.

Comme cela était prévisible (LAFON-LAFOURCADE et *al.*, 1984), le tween 20, qui contient des pourcentages élevés de C 12, détermine une diminution de la production d'éthanol ; elle est particulièrement évidente dans le cas des fermentations primaires.

La composition cellulaire se ressent évidemment de la nature de la source exogène ; quand cette source est constituée par du tween 80 le niveau d'acide oléique, atteint à la fin de la fermentation, est de l'ordre de 35 p. 100 dans les deux processus. L'addition du tween 20 détermine la présence de pourcentages plus élevés d'acides laurique et myristique normalement présents en quantité de 1 à 2 p. 100.

L'élément le plus important mis en évidence ici est le rôle différent exercé par le tween 80 dans le processus de fermentation et de refermentation : dans les milieux non supplémentés en éthanol, la vitesse de fermentation est plus grande en l'absence de cette source d'acides gras ; en présence d'éthanol 1 M elle permet de maintenir une vitesse de fermentation égale à celle du témoin.

On a cherché à mettre en évidence une relation entre le pourcentage en acides gras et la production d'éthanol sur 15 souches.

Pour l'élaboration statistique on a employé les données relatives aux fermentations primaires des souches précédemment citées inoculées à deux taux différents : 5×10^2 cellules par millilitre et 5×10^8 cellules par millilitre.

On a trouvé une régression linéaire significative et positive entre l'éthanol produit en fin de fermentation et le pourcentage d'acide oléique au moment de l'inoculum ; cette corrélation n'est significative qu'à bas niveau d'inoculation initial ; même en anaérobiose cet acide gras n'est pas un facteur limitant avec un inoculum massif.

L'équation de la ligne de régression est :

$$y = 15{,}463 + 1.057x$$

où y = éthanol produit et x = % d'acide oléique ; le cœfficient de corrélation (r) étant 0,531 et le niveau de confiance $> 95 < 99$ p. 100.

CONCLUSIONS

Des problèmes complexes, tels que la tolérance à l'alcool, ont été trop souvent interprétés uniquement comme un simple phénomène de réponse adaptative de la membrane au facteur toxique ; on a identifié l'éthanol extracellulaire ou/et intracellulaire comme l'unique responsable de l'arrêt de fermentation.

Nos expériences ont mis en évidence pour divers acides gras, et en particulier pour l'acide oléique, un rôle différent selon les conditions et les phases de développement.

En particulier on a trouvé une relation significative et positive entre l'éthanol total produit en fin de fermentation et le pourcentage d'acide oléique, limité toutefois aux cellules au début du processus anaérobie, pour des taux d'inoculation faibles.

Ce comportement est à relier probablement à la désactivation des désaturases en anaérobiose et, par conséquent, à la nécessité d'une redistribution, dans les cellules nouvellement formées, de l'acide oléique présent au début.

L'acide oléique est donc un facteur susceptible de conditionner le succès de la fermentation seulement quand il est présent en quantité limitée. En effet, l'addition d'acide oléique, sous forme de tween 80, se traduit par une inhibition de la fermentation primaire quand elle est conduite par un apport massif de cellules ; au contraire, elle entraîne toujours une stimulation dans le processus de refermentation. Le rôle de cet acide gras dans la physiologie de la levure se modifie donc pendant le processus. L'augmentation d'acides gras saturés rencontrée au cours de la fermentation par la plus grande partie des souches considérées peut suggérer que les arrêts de fermentation proviennent non seulement de l'inhibition par l'éthanol extracellulaire, mais aussi par une pénétration ralentie des sucres dans la cellule (LARUE et *al.*, 1982). Cette difficulté de transport des sucres en phase stationnaire peut être en effet reliée à une altération du bon fonctionnement des perméases associées aux membranes par effet de l'augmentation de saturation des acides gras, en accord avec les résultats de THOMAS et ROSE (1979). Du reste déjà LARUE et *al.* (1982) ont observé que l'addition d'acide oléanoïque augmente la pénétration des sucres et conséquemment leur fermentation en phase stationnaire.

Les résultats préliminaires de cette expérimentation suggèrent l'intérêt d'autres recherches plus spécifiques sur les rapports entre l'évolution des acides gras et la dynamique de la perméation des sucres au cours d'une fermentation alcoolique des moûts.

Manuscrit reçu le 6 août 1985 ; accepté pour publication le 14 octobre 1985.

RÉSUMÉ

On a suivi, pendant un processus de fermentation et de refermentation, l'évolution des acides gras cellulaires les plus importants pour 16 souches caractérisées par des capacités fermentaires différentes. Exception faite pour deux d'entre elles, on a observé une augmentation du niveau des acides gras.

On a mis en évidence le rôle différent joué par l'acide oléique, selon qu'il s'agit d'un processus de fermentation ou de refermentation et selon l'importance de l'inoculum.

SUMMARY

During the process of a first and a second fermentation, the course of the main cellular fatty acids has been studied for 16 strains distinguished by their fermentation ability. Except for two of them, an increase of the fatty acids and level was noticed.

The role of oleic acid was clearly different dependind on whether it was a first or a second fermentation process, and according to the level of inoculation.

ZUSAMMENFASSUNG

Waehrend eines Gaehrungs -und Rueckgaerungs prozesses hat man die Entwicklung der wichtigsten Zellfettsaeuren in 16 verschiedenen. Kontrollabschnitten untersucht, die sich durch unterschiedliche Gaerfaehigkeiten auszeichnen.

Eine Ausnahme wurde fuer zwei von ihnen gemacht. Man hat eine Erhoehung des Niveaus der Fettsaeuren festgestellt.

Man hat die unterschidliche Rolle der Oelsaeure herausgestellt, je nachdem, ob es sich um einen Gaerungs- oder Rueck- gaerungs prozess handelt oder um die Bedeutung einer Einimpfung.

RESUMEN

Se estudia aquí la cantidad en varios ácidos grases contenidos en las levaduras durante une fermentación alcohólica normal o en casos de fermentaciones sucediendo despues de paradas. La experiencia se ha hecho con dieciséis levaduras diferentes.

De modo general se observa un incremento de la cantitad en acidos grases. El acido oléico desempeña papeles difedentes según la cantidad de levaduras activas.

RIASSUNTO

Gli autori hanno seguito durante un processo di fermentazione, l'evoluzione degli acidi grassi cellulari più importanti per 16 specie caratterizzate da capacità fermentari differenti. Fatta eccezione per 2 tra loro, hanno oservato un aumento del livello degli acidi grassi.

Hanno messo in evidenza l'influenza differente dell'acido oleico secondo che fosse un processo di fermentazione o di rifermentazione e secondo l'importanza dell'inoculo.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANDREASEN A.A. and STIER T.J.B., 1953. Anaerobic nutrition of *Saccharomyces cerevisiae*. I. Ergosterol requirements for growth in a defined medium. *J. Cell. Com. Physiol.*, **41**, 23-26.

ANDREASEN A.A. and STRIER T.J.B., 1954. Anaerobic nutrition for *Saccharomyces cerevisiae*. II. Unsaturated fatty acid requirement for growth in a defined medium. *J. Cell. Com. Physiol.*, **43**, 271-281.

BEAVEN M.J., CHARPENTIER C. and ROSE A.H., 1982. Production and tolerance of ethanol in relation to phospholipid fatty-acyl composition in *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 431. *J. of Gen. Microbiol.*, **128**, 1447-1455.

BOTHAM P.A. and RATLEDGE C., 1978. A biochemical explanation for lipid accumulation in *Candida* 107 and other oleaginous microorganisms. *J. of Gen. Microbiol.*, **114**, 361-375.

BRENNAN P.J. and LOSEL D.M., 1978. Physiology of fungal lipids ; selected topics. Adv. Microb. Phys., **17**, 47-69.

BRAWN C.M. and ROSE A.H., 1969. Fatty acid composition of *Candida* utilis as affected by growth temperature and dissolved oxygen tension. *J. Biochemical*, **99**, 371-378.

BROWN S.W., OLIVER S.G., HARRISON D.E.F. and RIGHELATO R.C., 1981. Ethanol inhibition of yeast growth and fermentation ; differences in the magnitude and complexity of the effect. European *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **11**, 151-155.

ELETR S., WILLIAMS M.A., WATKINS T. and KEITH A.O., 1974. Perturbations of the dynamics of lipid alkyl chains in membrane systems : effect on the activity of membrane bound enzyms. *Biochim. Biophys. Acta*, **339**, 190-201.

ELLIOTT G.C., 1977. Sterols in fungi : their function in growth and reproduction. *Adv. Microb Phys.*, 121-163.

ERWIN J., 1973. Comparative biochemistry of fatty acids in eukariotic microorganisms 41-143. In lipids and Biomembranes of Eukariotic Microorganisms. *J.A. ERWIN (éd.), Academic Press Inc.*, New York.

GIUDICI P. GUERZONI and CONTE L., 1983. Relationship of cellular fatty acid composition to the ethanol productivity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Vini Italia*, **145**, 147-152.

GUERZONI M.E., LAMBERTINI P., CAVAZZA A. et MARCHETTI R., 1985. Observations préliminaires sur l'accumulation d'hydrocarbures chez *Candida steatolitica* : relation avec la synthèse des lipides, **31**, 202-210.

HASLAM J.M., SPITHIL T.W., LINNANE A.W. and CHAPPEL J.B., 1973. Biogenesis of mitochondria. The effect of altered membrane lipid composition on cation transport by mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae. Biochem. J.*, **134**, 949-957.

KATES M. and BAXTER R.M., 1962. Lipid composition of mesophilic and psychrophilic yeast (*Candida* species) as influenced by environmental temperatures. *Can. J. Bioch. Physiol.*, **40**, 1213-1227.

KEENAN M.J.H., ROSE A.H. and SILVERMAN B.W. 1982. Effect of plasma-membrane phospholipid unsaturation on solute transport into *Saccharomyces cerevisiae*, NCYC 366. *J. of Gen. Microbiol*, **128**, 2547-2557.

LAFON-LAFOURCADE S., LARUE F. and RIBÉREAU-GAYON P. ,1979. Evidence for the existence of survival factors as an explanation for some peculiarities of yeast growth especially in grape must of high sugar concentration. *Appl. Env. Microb*, **38**, 1069-107.3

LAFON-LAFOURCADE S., GENEIX C. and RIBÉREAU-GAYON P., 1984. Inhibition of alcoholic fermentation of grape must by fatty acids produced by yeasts and their elimination by yeast ghosts. *Appl. Environmen. Microbio.*, **47**, 1247-1249.

LARUE F., LAFON-LAFOURCADE S. et RIBÉREAU-GAYON P., 1982. Inhibition de *S. cerevisiae* dans le moût de raisin. *C.R. Acad. Sc.*, **294**, 587-590.

LARUE F., LAFON-LAFOURCADE S. and RIBÉREAU-GAYON P., 1980. Relationship between the sterol content of yeast cells and their fermentation activity in grape must. *Appl. Environ. Microbiol.*, **39**, 808-811.

METCALFE L.D. and SCHMITZ A.A., 1961. The rapid preparation of fatty acid esters for gas chromatographyc analisis. *Anal. Chem.*, **33**, 363-364.

NAGODAWITANA T.W. and STEINKRAUS K.H., 1975. Influence of the rate of ethanol production and accumulation on the viability of *Saccharomyces cerevisiae* in « rapid fermentation ». *Appl. and Environ. Microbiol.*, **31**, 158-162.

NAVARRO J.M. et DURAND C., 1978. Fermentation alcoolique. Influence de la température sur l'accumulation d'alcool dans les cellules de levures. *Ann. Microbiol.*, **129**, 215-221.

NOVAK M., STREHAIANO P., MORENO M. and GOMA G., 1981. Alcoholic fermentation : on the inhibitory effect of ethanol. *Biotechnol. and Bioeng.*, **23**, 201-211.

PROUDLOCK J.W., HASLAM J.M. and LINNANE A.W., 1969. Specific effect of unsaturated fatty acid depletion on mitochondrial oxidative phosphorylation in *Saccharomyces cerevisiae. Biochem. Biophys. Res. Commun,* **37**, 848-852.

PROUDLOCK J.W, HASLAM J.M. and LINNANE A.W., 1971. Biogenesis of mitochondria. 19. The effects of unsaturated fatty acid depletion on the lipid composition and energy metabolism of a fatty acid desaturase mutant of *Saccharomyces cerevisiae. J. Bioenerg.,* **2**, 327-349.

RATLEDGE C., 1982. Microbial oil and fats ; an assessment of their commercial potential. *Prog. Ind. Microbiol.,* **16**, 125-206.

RATTRAY J.B.M., SCHIBECI A. and KIBBY D., 1975. Lipid of yeast. *Bacteriological Reviews,* **39**, 197-231.

THOMPSPN E.D. and PARKS L.W., 1974. Effect of altered sterol composition on growth characteristics of *Saccharomyces cerevisiae. J. Bacteriol.,* **120**, 779-784.

THOMAS D.S. and ROSE A.H., 1979. Inhibitory effect of ethanol on growth and solute accumulation by *Saccharomyces cerevisiae* as affected by plasma-membrane lipid composition. *Arch. Microbiol.,* **122**, 49-55.