

Sélection de levure en vue de la culture sur lactosérum

par

G. MOULIN, R. RATOMAHENINA et P. GALZY

Chaire de Génétique et Microbiologie
Ecole Nationale Supérieure Agronomique - 34060 Montpellier cedex

Avec la collaboration technique de Mademoiselle BOZE

La production de levures aliments sur lactosérum déprotéiné a pris de l'extension depuis le dépôt d'un brevet Bel (brevet n° 1128063 des fromageries Bel). Cette production est une opération extrêmement rentable, susceptible de donner des quantités importantes de protéines d'excellentes qualités. La valeur diététique de ces levures est reconnue en alimentation humaine comme en alimentation animale. C'est le cas notamment des levures appartenant à l'espèce *Kluyveromyces fragilis* dont la composition est bien connue (Cedibel, 1968). Ces levures constituent un important apport nutritionnel par leur richesse protidique (45-50 p. 100) et vitaminique (thiamine, riboflavine) ainsi que par leur teneur en oligo-éléments, en phosphore et en acides gras insaturés. En effet, pour l'espèce *Kluyveromyces fragilis* les acides linoléique et linoléinique représentent respectivement 38 p. 100 et 10 p. 100 des acides gras totaux (Moulin et al., 1973). Les acides gras polyinsaturés rendent plus difficile la conservation du produit, même si certains d'entre eux sont d'un grand intérêt diététique.

Nous avons montré dans une étude précédente (Moulin et al., 1973) qu'il est possible de réduire la quantité de lipides dans les cellules de levure en intervenant au niveau des conditions de culture. Nous avons observé aussi des variations importantes entre souches. Dans le présent travail nous avons étudié la composition en acides gras de souches de levure métabolisant le lactose.

I. — MATERIEL ET METHODES

A) Matériel biologique

Toutes les souches étudiées proviennent du Centraalbureau voor Schimmelcultures Baarn (C.B.S.) à l'exception de *Kluyveromyces marxianus* STV 1043 qui provient du laboratoire de Technologie de Dijon et de *Candida pseudotropicalis* IP 513 de l'Institut Pasteur.

B) Technique de culture

Toutes les cultures sont conduites en aérobiose dans des erlenmeyers remplis au 1/10 de leur volume (80 oscillations par mn ; amplitude 8 cm).

Le milieu de culture est le suivant :

Yeast nitrogen base Difco, contenant du lactose à la concentration 0,2 p. 100.

Toutes les analyses sont effectuées sur des cellules prélevées en début de phase stationnaire.

C) Techniques analytiques

La matière sèche est déterminée par pesée après dessiccation à 108° C jusqu'à poids constant.

Les lipides totaux sont extraits par la méthode décrite par A. Chassang (1972). La composition en acides gras a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse des esters butyliques selon Clément et Bézard (1961) après addition d'un standard interne, l'acide margarique (heptadécanoïque) selon Bézard et Bugaut (1972) afin de déterminer graphiquement le poids des acides gras des lipides extraits.

Toutes les expériences ont été effectuées au moins deux fois. Les résultats obtenus sont suffisamment voisins pour que nous ne présentions dans les tableaux que la moyenne.

II. — RESULTATS EXPERIMENTAUX

A) Etude des lipides

Nous avons rassemblé les résultats obtenus pour les souches à métabolisme fermentaire dans les tableaux 1 et 1 bis et ceux relatifs aux souches à métabolisme exclusivement oxydatif dans le tableau 2. Les deux premières colonnes indiquent les teneurs en lipides totaux et acide gras totaux exprimées en pourcentage de la matière sèche. Les colonnes suivantes expriment, de la même façon, les teneurs pour les divers acides gras. Les trois dernières colonnes indiquent les teneurs en acide gras saturé, insaturé, et polyinsaturé, exprimées également, en pourcentage de la matière sèche.

Les teneurs en lipides totaux varient considérablement selon la souche. Il en est de même pour la teneur en acides gras. Il n'apparaît pas de relation entre les teneurs en lipides et les groupes taxonomiques (genre) ou physiologiques (absence ou présence d'un métabolisme fermentaire).

Le spectre d'acide gras est voisin pour toutes les levures ; dominance des C 18 ; exclusivité des C 18 parmi les polyinsaturés, teneur

TABLEAU 1

Teneur en lipides totaux et en acides gras de la matière sèche pour les souches à métabolisme oxydatif et fermentaire

Souches	LT	AG	C ₁₄ :0	C ₁₅ :0	C ₁₆ :0	C ₁₆ :1	C ₁₈ :0	C ₁₈ :1	C ₁₈ :2	C ₁₈ :3	AG sat.	AG insat.	AG polyinsat.
	% $\frac{\text{MS}}$	% $\frac{\text{MS}}$									% $\frac{\text{MS}}$	% $\frac{\text{MS}}$	% $\frac{\text{MS}}$
<i>Candida Kefyr</i> CBS 834	8,7	4,03	0,02	—	0,60	0,48	0,07	0,75	1,50	0,61	0,69	3,34	2,11
<i>C. pseudotropicalis</i> IP 513	7,1	2,86	0,01	0,01	0,34	0,47	0,03	0,54	0,98	0,48	0,39	2,47	1,45
<i>C. macedoniensis</i> CBS 2079	6,7	2,58	0,01	0,01	0,46	0,48	0,02	0,62	0,79	0,19	0,50	2,08	0,98
<i>C. shehatae</i> CBS 5813	11,8	4,13	0,02	0,01	0,37	0,22	0,07	2,00	1,07	0,37	0,47	3,66	1,45
<i>C. pseudotropicalis</i> CBS 19384	5,6	2,54	0,01	0,01	0,33	0,30	0,03	0,61	0,88	0,37	0,38	2,16	1,25
<i>C. intermedia</i> CBS 572	17,6	1,29	0,02	0,01	0,26	0,05	0,05	0,34	0,47	0,09	0,34	0,95	0,56
<i>C. salmenticensis</i> CBS 5121	9,1	2,88	0,01	0,03	0,36	0,19	0,04	1,30	0,84	0,11	0,44	2,44	0,95
<i>Pichia scolyti</i> CBS 4802	8,2	2,84	0,01	0,01	0,47	0,20	0,03	0,58	1,25	0,29	0,52	2,32	1,54
<i>P. polymorpha</i> CBS 186	11,6	2,43	0,01	0,01	0,35	0,09	0,04	1,18	0,54	0,21	0,41	2,02	0,75
<i>P. pseudopolymorpha</i> CBS 2008	5	2,20	0,01	—	0,35	0,04	0,03	1,20	0,36	0,21	0,39	1,81	0,57
<i>P. stipitis</i> CBS 5773	6,8	3,19	0,02	—	0,37	0,16	0,07	1,01	1,32	0,24	0,46	2,73	0,57

TABLEAU 1 bis

Teneur en lipides totaux et en acides gras de la matière sèche pour les souches à métabolisme oxydatif et fermentaire

Souches	LT	AG	C ₁₄ :0	C ₁₅ :0	C ₁₆ :0	C ₁₆ :1	C ₁₈ :0	C ₁₈ :1	C ₁₈ :2	C ₁₈ :3	AG sat.	AG insat.	AG polyinsat.
	% MS	% MS									% MS	% MS	% MS
<i>Brettanomyces anomalus</i> CBS 77	9,6	2,89	0,03	0,01	0,47	0,67	0,07	0,62	1,02	0,00	0,58	2,31	1,02
<i>B. claussenii</i> CBS 76	9,6	3,57	0,02	—	0,43	1,01	0,07	1,26	0,78	0,00	0,52	3,05	0,77
<i>Debaryomyces hansenii</i> STV 8	7,2	2,52	—	—	0,34	0,07	0,04	1,01	0,60	0,46	0,38	2,14	1,06
<i>D. cantarellii</i> CBS 4349	11,6	3,66	0,02	—	0,35	0,20	0,03	1,86	1,00	0,20	0,40	3,26	1,20
<i>D. castellii</i> CBS 2923	6,0	3,20	0,01	—	0,43	0,12	0,06	1,47	0,72	0,39	0,50	2,70	1,14
<i>Torulopsis candida</i> CBS 940	7,4	3,52	0,01	—	0,36	0,17	0,08	1,38	1,40	0,11	0,46	3,06	1,51
<i>Schwanniomyces castellii</i> CBS 2863	6,3	2,48	—	0,01	0,31	0,30	0,02	0,97	0,43	0,44	0,34	2,14	0,95
<i>Kluyveromyces fragilis</i> CBS 1555	8,5	3,90	0,01	0,01	0,57	0,41	0,07	1,03	1,33	0,47	0,66	3,24	1,80
<i>K. fragilis</i> CBS 397	8,6	3,45	0,01	0,01	0,50	0,41	0,06	0,70	1,21	0,55	0,58	2,87	1,86
<i>K. fragilis</i> CBS 5795	10	6,89	—	—	0,79	1,31	0,06	1,97	2,35	0,41	0,85	6,04	2,76
<i>K. lactis</i>	8,7	3,24	0,02	0,03	0,43	1,15	0,06	0,46	0,73	0,35	0,54	2,70	1,07
<i>K. marxianus</i> STV 1043	6,3	2,34	0,01	0,01	0,31	0,34	0,04	0,58	0,72	0,33	0,37	1,97	1,05

TABLEAU 2

Teneur en lipides totaux et acides gras de la matière sèche pour les souches à métabolisme exclusivement oxydatif

Souches	LT	AG	C ₁₄ :0	C ₁₅ :0	C ₁₆ :0	C ₁₆ :1	C ₁₈ :0	C ₁₈ :1	C ₁₈ :2	C ₁₈ :3	AG sat.	AG insat.	AG polyinsat.
	% MS	% MS									MS	MS	MS
<i>Cryptococcus ater</i> CBS 4685	8,6	2,61	0,02	0,01	0,43	0,02	0,05	0,52	1,30	0,26	0,51	2,10	1,56
<i>C. melibosium</i> CBS 2102	5,9	2,63	0,02	0,02	0,48	0,40	0,03	0,49	1,17	0,02	0,55	2,08	1,19
<i>Torulopsis ingeniosa</i> CBS 4240	11,8	5,87	0,07	0,01	1,22	0,06	0,23	1,93	1,71	0,64	1,53	4,34	2,34
<i>Candida curvata</i> CBS 570	12,5	7,53	0,02	0,06	1,24	—	0,92	2,59	2,11	0,59	2,24	5,29	2,50
<i>C. blankii</i> CBS 1898	11,1	3,06	0,01	0,02	0,40	0,03	0,01	1,49	1,06	0,04	0,44	2,62	1,09

faible en C 14 et C 15, présence de C 16 et C 16:1. Des différences apparaissent cependant. Certaines souches ne possèdent pas d'acides gras à chaîne impaire C 15. Il est curieux de constater que c'est le cas des trois espèces testées appartenant au genre *Debaryomyces* et, pratiquement aussi, des *Brettanomyces*. On retrouve cette situation dans une souche de *Torulopsis* et dans une souche de *Candida*. Il est difficile de dire si l'absence ou la présence d'acide gras C 15 est une caractéristique taxonomique. Les *Brettanomyces* sont les seuls à ne pas avoir d'acide linoléique 18-3 parmi les groupes étudiés. Il est probable, dans ce cas, que l'on se trouve en présence d'une caractéristique taxonomique. D'ailleurs, il semble que l'absence d'acide linoléique soit en relation avec d'autres caractéristiques physiologiques (Ratomahenina, 1975).

Au point de vue qui nous intéresse ici, c'est la présence d'acide linoléique qui est le facteur le plus important pour les risques de rancissement. Les deux souches les plus intéressantes sont *Brettanomyces anomalus* CBS 77 et *Brettanomyces claussenii* CBS 76. Il est probable que l'on se trouve en présence d'une caractéristique générale des *Brettanomyces*. *Candida intermedia* CBS 572, *Candida blankii* CBS 1898, *Cryptococcus melibionum* CBS 2102, possèdent l'acide linoléique mais sont relativement plus pauvres que les autres souches.

La teneur des cellules en polyinsaturés totaux est également importante. Les souches les plus intéressantes à ce point de vue sont :

- *Candida intermedia* CBS 572,
- *Pichia pseudopolymorpha* CBS 2008,
- *Pichia stipitis* CBS 5773,
- *Pichia polymorpha* CBS 186.

B) Etude du rendement de croissance

Nous n'avons étudié ici que des souches présentant, à la fois, des caractéristiques intéressantes pour la teneur en lipide et des vitesses de croissance compatibles avec une application industrielle.

Dans le tableau 3, nous indiquons, pour chaque souche, le rendement de croissance sur lactose lorsque ce substrat est le seul facteur limitant la croissance. La méthode utilisée pour cette mesure a été décrite précédemment (Ladet et al., 1972). Nous indiquons également la composition des cellules en exprimant les données en pourcentage du poids sec. Les protéines vraies sont calculées en fonction de la réaction du biuret selon Strickland après étalonnage de l'appareil de mesure avec la sérum albumine du bœuf. L'azote total est dosé par la méthode de Kjeldahl. Nous rappelons dans ce tableau la teneur en lipides totaux.

Le rendement de croissance sur lactose est mauvais (inférieur à 30 p. 100) avec quatre souches : *Candida intermedia* CBS 572, *Pichia*

TABLEAU 3

Caractéristiques culturales et composition de quelques souches

Souches	Rendement mg matière sèche par mg lactose consommé	Composition des cellules en pourcentage du poids sec		
		Protéine	N × 6,25	Lipides
<i>Pichia polymorpha</i> CBS 186	0,47	27	36	11
<i>P. pseudopolymorpha</i> CBS 2008	0,40	32	38	5
<i>P. stipitis</i> CBS 5773	0,19	37	43	7
<i>Candida blankii</i> CBS 1898	0,52	32	43	11
<i>C. intermedia</i> CBS 572	0,30	36	45	17
<i>Brettanomyces</i> <i>clausenii</i> CBS 76	0,35	30	40	10
<i>B. anomalus</i> CBS 77	0,44	37	49	10
<i>Debaryomyces</i> <i>cantarellii</i> CBS 4349	0,28	31	34	12
<i>Schwannyomyces</i> <i>castellii</i> CBS 2863	0,29	33	40	6

stipitis CBS 5773, *Schwannyomyces castellii* CBS 2863, *Debaryomyces cantarellii* CBS 4349.

Il est particulièrement bon avec *Candida blankii* CBS 1898 et avec *Pichia polymorpha* CBS 186. Il est un peu faible pour *Pichia pseudopolymorpha* CBS 2008, *Brettanomyces clausenii* CBS 76, *Brettanomyces anomalus* CBS 77. Cependant, dans le cas des *Brettanomyces* il est connu que ces souches accumulent de l'acide acétique en cours de croissance. Il devrait donc être possible d'améliorer le rendement au niveau industriel en cultivant en association une levure capable de métaboliser l'acide acétique. Il serait possible d'utiliser par exemple une souche de *Saccharomyces cerevisiae*.

La teneur en protéines vraies de la matière sèche varie peu en fonction de la souche (27 à 37 p. 100). La teneur en azote nucléique (cf. différence entre : N × 6,25 et protéine vraie) est plus variable : elle est très faible pour *Debaryomyces cantarellii* CBS 4349 et au

contraire très forte pour *Brettanomyces anomalus* CBS 77. Au point de vue de la composition de la matière sèche, la souche la plus intéressante est *Brettanomyces anomalus* CBS 77 qui est à la fois, la plus riche en protéine vraie, la plus riche en azote total, la plus pauvre en acide gras polyinsaturé et qui ne possède pas d'acide linoléique. *Pichia stipitis* CBS 5773 est également intéressante par sa richesse en protéine vraie, sa pauvreté relative en acides nucléiques et en lipides.

CONCLUSION

Le but de ce travail était de trouver des souches métabolisant le lactose et ne possédant que peu d'acides gras polyinsaturés et, en particulier, pas d'acide linoléique. Ces souches existent : les *Brettanomyces* sont particulièrement intéressantes à cet égard.

Au point de vue industriel, les deux facteurs essentiels sont le rendement de la croissance et la richesse en azote exprimée traditionnellement par le produit $N \times 6,25$. En considérant tous les facteurs, les deux souches les plus intéressantes semblent être *Brettanomyces anomalus* CBS 77 qui produit, pour 1 mg de lactose consommé, 0,22 mg de protéines ($N \times 6,25$) en culture pure et *Candida blankii* qui en produit 0,25 mg ($N \times 6,25$).

Summary

Composition in fatty acid, amount of protein and yields on lactose are presented for twenty seven yeasts able to grow on lactose.

Reçu pour publication en septembre 1975.

Bibliographie

- BEZARD (J.) and BUGAUT (M.) (1972). — The component tryglycerides of rat adipose tissue. I. As studied after fractionation into classes by silver ion-thin layer chromatography. *J. Chrom. Sci.*, 10, 451-462.
- CHASSANG (A.), ROGER (M.), VEZINHET (F.) and GALZY (P.) (1972). — Variation of the lipid content of yeast cells during sporulation. *Folia Microbiologica*, 17, 241-247.
- CLÉMENT (G.) et BEZARD (J.) (1961). — Technique de dosage par chromatographie gaz liquide d'un mélange d'acide gras du butanoïque au docosanoïque. *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, 255, 564-566.
- LADET (J.), MOULIN (G.), JOUX (J.L.) et BIJU-DUVAL (F.) (1972). — Comparaison des rendements de croissance sur lactose de quelques *Kluyveromyces* Van der Walt. *Le Lait*, 519-520, 613-621.
- MOULIN (G.), GALZY (P.) et BEZARD (J.) (1973). — Observation sur la composition des lipides de quelques levures. *Le Lait*, 528, 530-536.
- RATOMAHENINA (R.) (1975). — Sélection de souches de levures en vue de la culture sur lactosérum. Thèse de 3^e cycle. Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier.
- STRICKLAND (L. H.) (1951). — The determination of small quantities of bacteria by means of the biuret reaction. *J. Gen. Microbiol.*, 5, 698.