www.demptos.fr
LA BIBLIOTHEQUE R&D DEMPTOS
Publications scientifiques et techniques

Ann. Fals. Exp. Chim. – 1er Semestre 2003 – 96 – N° 962 – pp. 31-38

ARTICLE ORIGINAL

Note sur l'estimation des acides gras, des stérols et du squalène de quelques préparations commerciales de levures mortes

Marie-Françoise NONIER[1], Alain BERTRAND[2], Nathalie VIVAS DE GAULEJAC[1] et Nicolas VIVAS[1,*]

[1] Tonnellerie Demptos détachée au CESAMO (Centre d'Etudes Structurales et d'Analyses des Molécules Organiques) - Université Bordeaux I, 351 Cours de la Libération, F-33405 Talence, France. Tél. : 05 40 00 25 78. Fax : 05 40 00 26 23. E-mail : n.vivas@cesamo.u- bordeaux.fr.

[2] Faculté d'œnologie- Université Bordeaux II, 351 Cours de la Libération, F-33405 Talence, France.

SUMMARY **Note about the quantification of fatty acids, sterols ans squalene in some commercial preparations of inert yeasts.**

Because of the very important part of fatty acids, sterols and squalene during alcoholic fermentation, we wanted to evaluate the content of these three elements in some commercial preparations of inert yeasts. This evaluation has been achieved by GC/M/S and GC after extraction and preparation of the extract. Thus, we compared the different samples between them and with previous results.

Key-words : *yeast, fatty acid, sterol, squalene, GC/MS*

RÉSUMÉ Notre objectif était d'évaluer la teneur en acides gras, stérols et squalène de quelques préparations commerciales de levures mortes connaissant le rôle très important de ces trois éléments lors de la fermentation alcoolique. Cette évaluation a été réalisée par GC/MS et GC après extraction et préparation de l'extrait. Nous avons pu ainsi établir des comparaisons entre les différents échantillons et avec les résultats de travaux antérieurs.

Mots clés : *levure, acide gras, stérol, squalène, GC/MS.*

* Correspondance.

1. INTRODUCTION

Nous savons que l'addition d'enveloppes cellulaires ou « écorces » de levure au moût de raisins favorise la fermentation alcoolique [1], [2]. Le traitement est fréquemment employé pour favoriser la refermentation de cuves stoppée avant l'épuisement complet des sucres réducteurs. Différents travaux [3], [4] ont montré qu'en plus de leurs propriétés d'adsorption des acides gras toxiques à chaîne moyenne [5], les enveloppes cellulaires apportent des stérols et des acides gras insaturés à longue chaîne qui sont considérés comme des substituts de l'oxygène ou facteurs de survie pour les levures. Cette notion de facteur de survie définie par Larue [6] correspond à des substances agissant sur des populations levuriennes non proliférantes. Les systèmes enzymatiques fonctionnent toujours, mais les sucres ne peuvent plus pénétrer dans la cellule pour être métabolisés, d'où un arrêt de croissance mais un maintien de viabilité. Ces composés permettent alors un achèvement complet de la fermentation alcoolique en agissant sur la fluidité membranaire. Pour prévenir des éventuels risques d'arrêt de la fermentation alcoolique, il est parfois utile de rajouter au moût des produits renfermant des quantités suffisantes à la fois d'acides gras insaturés et de stérols.

Ce travail se propose d'étudier la teneur en acides gras, en stérols et en squalène de quatre préparations commerciales de levures mortes.

2. PARTIE EXPÉRIMENTALE

Les échantillons analysés (nommés par la suite 1, 2, 3, 4) sont fournis par SPINDAL. Il s'agit d'une biomasse levurienne de *Saccharomyces cerevisiae*, autolysée par la chaleur et par voie enzymatique puis lyophilisée. La plus grande part du produit sec est majoritairement représentée par des écorces de levure. La méthode proposée découle du travail effectuée par Bernath et Bertrand [7].

2.1. Extraction des acides gras et des stérols

On introduit dans un tube : 360 mg d'échantillon et 15 ml du mélange dichlorométhane/méthanol (2:1 ; v:v). L'extraction se fait alors par broyage des enveloppes cellulaires des écorces avec des billes de verre de 0,4 mm de diamètre, à l'aide d'un appareil VORTEX™, en deux heures. Cette opération est répétée deux fois et E est l'extrait total ainsi obtenu.

2.2. Préparation de l'extrait pour le dosage des acides gras estérifiés

L'extrait E précédent est collecté et évaporé à sec à température ambiante et sous vide. La transestérification est réalisée par ajout de 3 ml de méthylate de sodium à 1% en solution dans le méthanol. La réaction s'effectue à 60 °C pendant 35 minutes. Après avoir laissé refroidir le mélange, on lui ajoute 2 ml d'eau ; les esters méthyliques d'acides gras sont extraits à trois reprises par 5 ml d'hexane. On évapore à sec et le résidu est dissous dans 2 ml d'hexane. 22 µl d'une solution d'heptadecanoate de méthyle à 1% (étalon interne) sont introduits dans le résidu final obtenu.

2.3. Préparation de l'extrait pour le dosage des stérols totaux et du squalène

L'extrait E est évaporé à sec à température ambiante et sous vide. La saponification est réalisée à 90 °C pendant 60 minutes, à l'aide de 8 ml de 2 M KOH en solution dans le méthanol. Les stérols totaux sont extraits par 6 ml d'hexane à trois reprises. La phase organique est évaporée à sec sous vide à 35 °C.

La formation de dérivés volatilisables des stérols est réalisée par l'addition au résidu sec (dans lequel nous avons introduit 2,4 µl d'une solution de cholestérol à 1%) de 500 µl de [BSTFA+1% TMCS] et quelques gouttes de pyridine ; la réaction s'effectue à 70 °C pendant 50 minutes. Après ajout de 1 ml d'eau au mélange, les stérols silylés sont extraits par 2 ml d'hexane.

2.4. Identification et évaluation des acides gras, stérols et squalène totaux

Les analyses sont effectuées, dans un premier temps, par couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse pour l'identification des divers composés, à l'aide d'un appareil HP™ 5890 couplé à un spectromètre de masse HP™ 5972 fonctionnant en impact électronique avec une énergie d'ionisation de 70 eV. Et dans un second temps, par chromatographie gazeuse avec détecteur à ionisation de flamme pour l'évaluation de la teneur de chacun des composés.

Pour les esters méthyliques d'acides gras, l'analyse chromatographique est effectuée à l'aide d'une colonne CARBOWAX™ 20 M (50 m x 0,25 mm; épaisseur de la phase: 0,25 µm). La température du four est programmée de 40 °C pendant 1 minute à 220 °C à raison de 4 °C/min pendant 50 minutes. La température de l'injecteur est de 250 °C, le volume d'injection est de 2 µl.
L'évaluation approximative de la teneur en acides gras a été effectuée de manière relative à l'étalon interne, l'heptadécanoate de méthyle.

Pour les stérols triméthylsilylés, la colonne utilisée est une HP1™ (30 m x 0,32 mm ; épaisseur de la phase: 0,25 µm). L'injection de 1 µl se fait « on column » à 60 °C. La température du four est programmée de 60 °C à 250 °C à raison de 10 °C/min et de 250 °C à 290 °C à raison de 3 °C/min pendant 30 minutes.
L'évaluation approximative des teneurs en squalène et stérols a été faite de manière relative à l'étalon interne, le cholestérol.

3. RÉSULTATS ET DISCUSSION

L'interprétation des spectres de masse et leur comparaison avec ceux trouvés dans les banques de données (Nist, Willey) nous a permis d'identifier les stérols, le squalène et les acides gras présents dans nos échantillons de levures mortes.

Nous avons caractérisé quatre stérols : le zymostérol, l'ergostérol, le lanostérol, le ß-sitostérol et le squalène. La nature des stérols présents est légèrement différente de celle trouvée par Bernath et Bertrand [7] dans le cadre d'une étude similaire sur des échantillons d'écorces de levure commerciales: ces derniers ont identifié le zymostérol, l'ergostérol, le lanostérol et le stigmastérol. La présence du stigmastérol n'est pas effective dans notre cas, mais à l'inverse nous avons noté l'existence d'un stérol très intéressant: le ß-sitostérol et probablement celle d'un cinquième stérol (non identifié) de masse molaire 484 $g.mol^{-1}$.

Selon les résultats regroupés dans le **Tableau I**, nous pouvons classer ces quatre échantillons en deux groupes : ceux qui sont riches en stérols : échantillons 3 et 4 [20-30 $mg.g^{-1}$ de matière sèche] et ceux dont la teneur en stérols est plus faible : échantillons 1 et 2 [4-5 $mg.g^{-1}$ de matière sèche]. Dans chacun des cas, la présence d'ergostérol est notable et la plus importante, ce résultat est en parfait accord avec les connaissances actuelles sur les stérols des levures à savoir: l'ergostérol et le zymostérol ont pour précurseur direct le lanostérol qui dérive du squalène. Le squalène s'accumule dans les levures cultivées en anaérobiose, mais dans les cellules non proliférantes, la plus grande partie de celui-ci est transformée en ergostérol, d'où l'intérêt du squalène.

L'échantillon 2 a néanmoins une composition différente par rapport aux trois autres. La teneur en squalène est particulièrement élevée (90% des stérols totaux) et le seul stérol présent est l'ergostérol. La teneur en stérols varie en fonction du genre, de l'espèce et même de la souche. Dulaney *et al.* [8] rapportent des variations en ergostérol de 0,1% à 8,5% du poids sec, pour 21 souches de *Saccharomyces cerevisiae*.

Les quatre produits sont riches également en acides gras insaturés à longue chaîne : **Tableau II**. Les concentrations totales en acides gras sont plus importantes que celles signalées dans le travail de Bernath et Bertrand [7]. L'échantillon 3 est celui qui présente la plus forte concentration en acides gras totaux [269 $mg.g^{-1}$ de matière sèche]. Dans chaque échantillon, nous retrouvons les six principaux acides gras: l'acide palmitique (C16:0), l'acide palmitoléique (C16:1), l'acide stéarique (C18:0), l'acide oléique (C18:1), l'acide linoléique (C18:2) et l'acide linolénique (C18:3). Dans chacun des échantillons, nous retrouvons une répartition en % identique pour chaque acide gras présent, à savoir: autour de 20% pour C16, 10% pour C16:1, 3% pour C18, 25% pour C18:1, 36% pour C18:2 et 5% pour C18:3.

Les deux acides gras estérifiés majoritairement présents dans chacun des cas sont les acides oléique et linoléique alors que, Bernath et Bertrand [7] ont identifié les acides oléique et palmitoléique comme étant les acides gras les plus fortement présents dans les écorces de levures qu'ils ont analysées. Il est à noter la présence importante de l'acide linolénique qui selon ces auteurs pourrait être une sorte de marqueur de l'utilisation des levures. En effet, selon Bertrand et Miele [3], cet acide est quasiment absent dans le vin n'ayant pas reçu d'écorces de levures, il peut atteindre 0,2 $mg.l^{-1}$ dans le cas d'utilisation de levures. Ces résultats montrent que les écorces de levure apportent au milieu des acides gras et des stérols, composés essentiels pour assurer la viabilité des microorganismes du vin.

4. CONCLUSION

Les produits étudiés contiennent des acides gras insaturés à longue chaîne, des stérols et du squalène en quantités appréciables. Les concentrations de ces différents composés varient selon les produits ; conclusions convergeant vers celles de Dulaney *et al.* [8]. L'échantillon 3 est celui qui présente les meilleurs taux d'acides gras et de stérols. Néanmoins, l'ensemble des quatre échantillons présente la même diversité et répartition en acides gras ; la richesse en stérols est plus disparate.

On peut supposer que ces échantillons vont libérer dans le milieu squalène, stérols et acides gras permettant le maintien des populations levuriennes en état de survie sur une plus longue période, limitant les risques d'arrêt prématuré de la fermentation alcoolique.

REMERCIEMENTS

Nous remercions la société Spindal pour la fourniture des échantillons de levures mortes