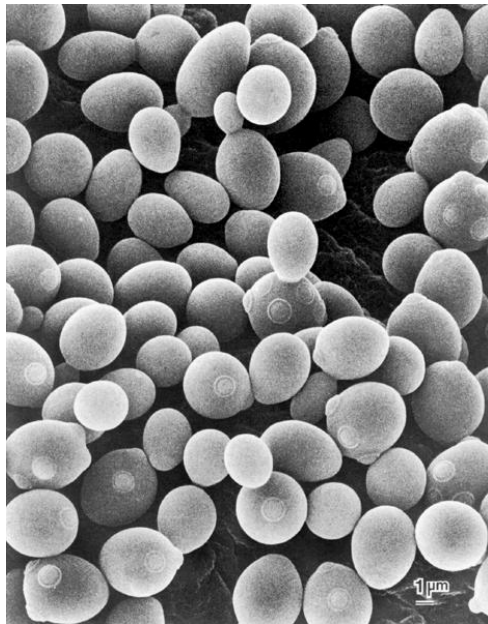


# BIOLOGIE 101-FYA

---

## La fermentation

---



*Saccharomyces cerevisiae*

## TRAVAUX PRATIQUES

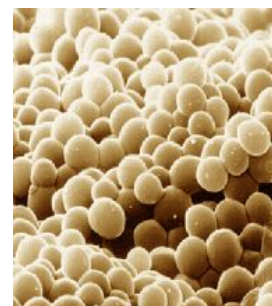
Gilles Bourbonnais  
Département de biologie et TBE  
Cégep de Sainte-Foy

## LES LEVURES

Les levures sont des champignons (mycètes) **unicellulaires**.

Elles peuvent obtenir l'énergie nécessaire à leur survie par **respiration** ou par **fermentation**. Au cours de ce laboratoire, nous utiliserons la levure de bière *Saccharomyces cerevisiae*. Celle-ci est couramment utilisée en industrie alimentaire pour produire des boissons fermentées (vin, bière) ou pour faire lever la pâte (pain).

En présence d'oxygène, *Saccharomyces cerevisiae* fait surtout de la respiration. Par contre, si l'oxygène vient à manquer, elle passe à la **fermentation alcoolique**. La fermentation ne nécessite pas d'oxygène, mais elle libère environ 15 fois moins d'énergie que la respiration.

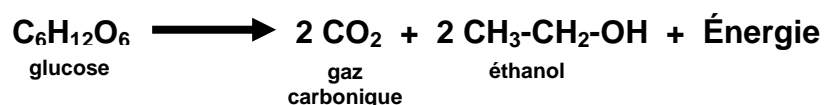


*Saccharomyces cerevisiae*

*Saccharo* : saccharose  
*myces* : mycètes  
*cerevisiae* : de *cerevisia*,  
cervoise (bière)

### Fermentation alcoolique

Au cours de la fermentation alcoolique, le glucose est converti en gaz carbonique et en éthanol (alcool éthylique).

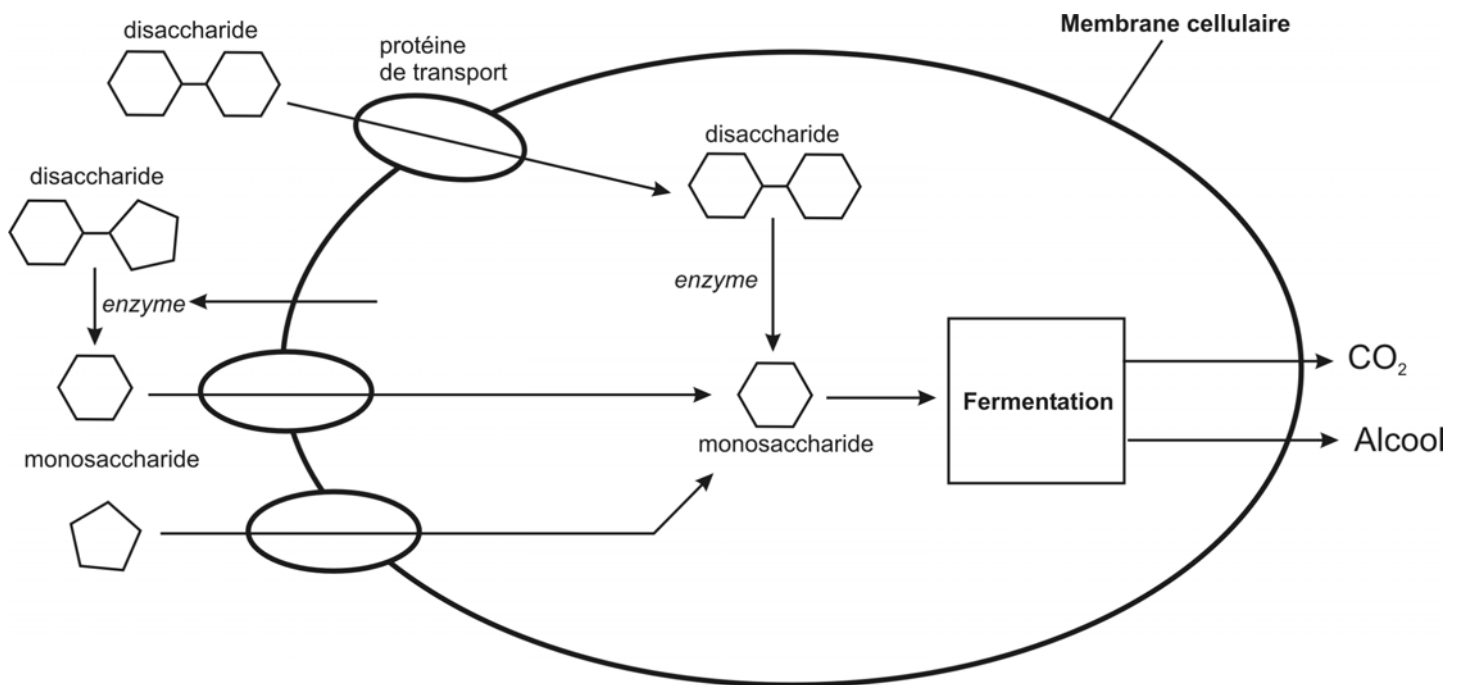


D'autres monosaccharides que le glucose peuvent aussi être utilisés. Certains monosaccharides peuvent directement entrer dans la chaîne de réactions de la fermentation (c'est le cas du fructose). D'autres peuvent être transformés en glucose par des enzymes de la cellule.

Dans le cas des disaccharides, ceux-ci doivent d'abord être digérés en monosaccharides. Cette digestion peut se faire à l'extérieur de la cellule ou à l'intérieur de celle-ci. Dans les deux cas, la digestion se fait sous l'action d'enzymes spécifiques synthétisées par la levure.

Au cours de ce laboratoire, nous vérifierons la **capacité à fermenter différents glucides** de *Saccharomyces cerevisiae*. Nous étudierons également l'**effet de la concentration en glucose** sur le taux de fermentation.

## Métabolisme des glucides : schéma intégrateur



Tous les glucides qui pénètrent dans la levure doivent le faire en passant par des **transporteurs protéiques spécifiques** (chaque transporteur est spécifique à un glucide particulier). Certains de ces transporteurs sont **constitutifs** (c'est à dire toujours présents dans la membrane), d'autres sont **inductifs**, c'est à dire qu'ils sont produits par la levure seulement en présence du glucide qu'ils doivent transporter.

**Voyez-vous comment ces transporteurs peuvent faire varier le taux de fermentation d'un sucre ?**

Les disaccharides doivent être digérés par des enzymes spécifiques (une enzyme donnée ne peut digérer qu'un disaccharide bien précis). Certaines enzymes agissent sur leur substrat à l'extérieur de la cellule alors que d'autres agissent dans la cellule même. Certaines sont constitutives alors que d'autres sont inductives.

**Voyez-vous comment ces enzymes peuvent faire varier le taux de fermentation d'un sucre ?**

## MATÉRIEL

- Suspension de levure actives (levures dans une solution minéralisée, pH 5, 40°C)
- Solutions de différents sucres
- Pipettes graduées de 2 ml
- Pipettes Pasteur
- Gomme
- Eau distillée

## MONTAGE

- Numérotez cinq tubes : **1 à 5** si votre équipe fait partie du groupe A et **6 à 10** si elle fait partie du groupe B.
- Placez **5 ml de suspension de levure** dans chacun des tubes
- **Ajoutez** à chacun des tubes :

### Groupe A

Tube	CONTENU
1	5 ml d'eau distillée (témoin)
2	5 ml glucose à 10%
3	5 ml glucose à 5%
4	5 ml glucose à 2,5%
5	5 ml glucose à 1,25% (2,5 ml de glucose à 2,5% et 2,5 ml d'eau distillée)

### Groupe B

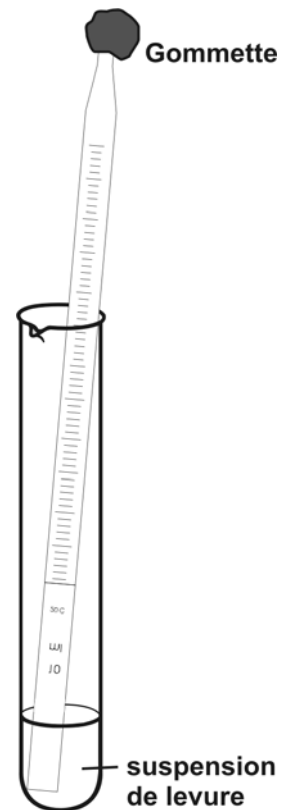
Tube	CONTENU
6	5 ml fructose à 5%
7	5 ml lactose à 5%
8	5 ml maltose à 5%
9	5 ml saccharose à 5%
10	2,5 ml de glucose à 5% et 2,5 ml de fructose à 5%

**LAISSEZ REPOSER 10 MINUTES AVANT DE POURSUIVRE**

**Avez-vous bien laissé reposer vos solutions pendant 10 minutes ? Si oui, poursuivez :**

**Pour chacun de vos cinq tubes :**

- Mélangez bien le contenu en brassant avec la pipette graduée.
- En aspirant avec la bouche, faites monter le plus haut possible la solution dans la pipette graduée (aucun danger si la solution entre en contact avec votre bouche; des levures, vous en mangez tous les jours !). Placez votre doigt sur l'extrémité de la pipette par laquelle vous avez aspiré la solution.
- Asséchez soigneusement l'autre extrémité de la pipette avec un papier ou un chiffon absorbant. Placez une petite boulette de gomme sur l'extrémité pour la boucher hermétiquement.
- Avec la petite pipette Pasteur jetable, ajoutez de la solution jusqu'à ce que la pipette graduée soit pleine à ras bord. Jetez la pipette Pasteur (vous devez prendre une pipette différente pour chacun des tubes).
- Retournez la pipette graduée à l'envers et placez-la dans le tube contenant le reste de la solution.

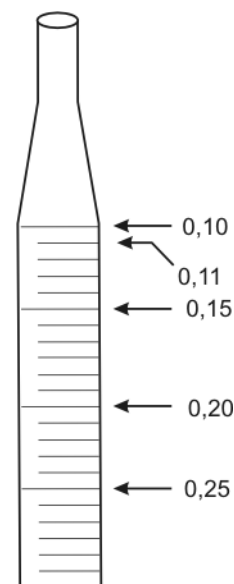


Le gaz carbonique libéré par les levures contenues dans la pipette graduée s'accumule à son extrémité. Puisque la pipette est graduée, on peut facilement mesurer le volume de gaz dégagé.

**Lorsque tous vos montages sont terminés, notez le volume de gaz carbonique dégagé dans chacun (c'est le volume à T0). Notez ensuite le volume à toutes les cinq minutes et ce pendant 40 minutes.**

La pipette est graduée au 0,01 ml. Vous ne pouvez donc pas avoir une précision supérieure à deux chiffres après le point.

Puisque le premier 0,1 ml de la pipette n'est pas gradué, vous devrez estimer "à l'œil" le volume accumulé si celui-ci ne dépasse pas 0,1 ml. L'erreur n'est pas très importante puisque, tout probablement, dès la prochaine lecture le niveau devrait dépasser 0,1 ml.



## LES ASPECTS BIOCHIMIQUES DE L'UTILISATION DE DIFFÉRENTS GLUCIDES PAR LES LEVURES\*

p. 461

### Introduction

Les microorganismes qui, en absence d'oxygène, métabolisent le glucose ou des composés qui peuvent donner du glucose comme source d'énergie, utilisent différentes voies métaboliques pour régénérer le NAD<sup>+</sup>. Toutes ces voies conduisent à la formation de produits dits de *fermentation* ; ce sont, par exemple, des acides tels les acides lactique, acétique et propionique de même que des composés comme l'acétone, le butanol, l'isopropanol, l'acétylméthylcarbinol et l'éthanol. Même si de nombreux microorganismes produisent de l'éthanol comme produit de leur métabolisme énergétique, ils ne constituent toutefois qu'une minorité parmi l'ensemble de la population microbienne. Cependant, les principaux microorganismes de ce groupe minoritaire sont des levures appartenant au genre *Saccharomyces*. Depuis des milliers d'années, ces levures sont utilisées pour produire de l'éthanol, sous une forme potable ou non potable, à partir de glucides. Ces levures présentent toutefois des déficiences, les principales étant leur incapacité de fermenter les pentoses — qui résultent de l'hydrolyse du bois — et l'absence d'enzymes de dépolymérisation capables de donner des mono- et des disaccharides à partir de cellulose. *Saccharomyces cerevisiae* est également incapable d'hydrolyser l'amidon et la dextrine. Toutefois, il existe une espèce très apparentée, *S. diastolicus*, qui peut dégrader l'amidon grâce à une enzyme, la glucoamylase, qui hydrolyse les liaisons  $\alpha$ -1,4 de l'amidon et de la dextrine pour donner du glucose.

Il n'est pas facile de définir adéquatement ces organismes appelés communément *levures*. Celles-ci sont des microorganismes eucaryotes unicellulaires qui appartiennent au règne des mycètes. La majorité des levures se reproduisent typiquement par bourgeonnement, mais il y a des exceptions : en effet, certaines espèces forment des mycéliums alors que d'autres présentent un type de division cellulaire par fission. En outre, d'autres élaborent

p. 462

des fructifications productrices de spores ; cette propriété est habituellement propre aux moisissures et aux champignons. On connaît de nos jours plus de 400 espèces de levures. Selon LODDER (1970), les levures seraient en réalité un groupe hétérogène de microorganismes. PHAFF *et al.* (1978) ont fait une revue de l'étymologie du terme *levure* et des termes équivalents en d'autres langues ; ils ont constaté un rapport constant avec la capacité de fermenter et de métaboliser une grande variété de glucides. De surcroît, il y a également des moisissures ayant des propriétés de levures durant une partie de leur cycle biologique. Pour compliquer le tout, des biochimistes utilisent incorrectement le terme *levure* comme synonyme de *Saccharomyces cerevisiae*. Même si un grand nombre d'études biochimiques et génétiques ont été effectuées sur cette espèce, il y a une grande variété de genres et d'espèces de levures qui n'ont pas encore été l'objet de recherches. Dans le présent chapitre, les auteurs ont utilisé principalement des données à partir de recherches sur *S. cerevisiae* et des espèces apparentées.

---

\* Traduit et adapté de STEWART G.G. et RUSSELL I. (1983), *Aspects of the Biochemistry and Genetics of Sugar and Carbohydrate Uptake by Yeasts*, p. 461–472, tiré de SPENCER J.F.T. *et al.* éditeurs, (1983), *Yeast Genetics — Fundamental and Applied Aspects*, New York, Springer-Verlag.

Aucun autre groupe de microorganismes n'a été plus intimement associé au progrès et à la santé de la race humaine que les levures. Leur contribution au progrès de l'humanité s'appuie très largement sur la capacité de certaines levures d'effectuer une conversion rapide et efficace de liquides sucrés, tels le jus de raisin, des extraits de céréales et du lait. On a souvent dit que les levures sont les plantes cultivées les plus anciennes. Du point de vue économique, les levures sont les microorganismes les plus importants exploités sur la planète. Certains biotechnologistes pensent que, dans le futur, l'importance industrielle de ce groupe de microorganismes diminuera, car ils produisent peu de métabolites secondaires d'intérêt commercial (par exemple, ils ne produisent pas d'antibiotiques biologiquement actifs). Cependant, de nombreuses espèces de levures produisent un métabolite primaire très important, à savoir l'éthanol, utilisé à la fois comme breuvage, carburant ou à d'autres fins industrielles. Une deuxième contribution majeure des levures dans les progrès de l'humanité a été leur utilité dans l'élucidation des processus biochimiques, métaboliques et génétiques fondamentaux chez les cellules (ROSE, 1977). Leur troisième contribution importante est, si l'on peut dire, leur capacité de causer des maladies chez les végétaux et les animaux. Par exemple, chez l'être humain, *Candida albicans* est un important organisme pathogène, même s'il est souvent présent sur la peau et les muqueuses sans causer de maladie. Beaucoup d'autres levures sont, comme *C. albicans*, opportunistes, c'est-à-dire capables de causer des maladies chez des hôtes affaiblis ou dépourvus d'une immunité normale. Citons, par exemple, des conditions comme le diabète, la leucémie, le cancer, de nombreuses maladies pulmonaires chroniques, l'obésité, la grossesse, des surfaces cutanées constamment humides et de nombreux désordres associés avec l'âge avancé (ODDS, 1979).

p. 463

À l'heure actuelle, seule *Saccharomyces cerevisiae* et des espèces apparentées ont une importance industrielle majeure. Cependant, on s'attend à ce que d'autres espèces de levures puissent à coup sûr jouer un jour un rôle considérable dans l'industrie comme source de protéines, d'éthanol ou dans d'autres types de transformations chimiques, comme celles impliquées dans la synthèse de précurseurs de produits naturels importants.

*Saccharomyces cerevisiae* a la capacité d'utiliser et de fermenter une grande variété de glucides tels le saccharose, le fructose, le galactose, le maltose et le maltotriose. En outre, des espèces très apparentées comme *S. diastaticus* et *S. uvarum* (*carlsbergensis*) peuvent respectivement fermenter des dextrines et le méliobiose. Lorsqu'une levure utilise un glucide, la première étape est généralement l'une ou l'autre des suivantes :

1. le passage intact à travers la membrane cellulaire ;
2. une hydrolyse extracellulaire préalable, suivie par l'entrée dans la cellule de certains ou de tous les produits d'hydrolyse.

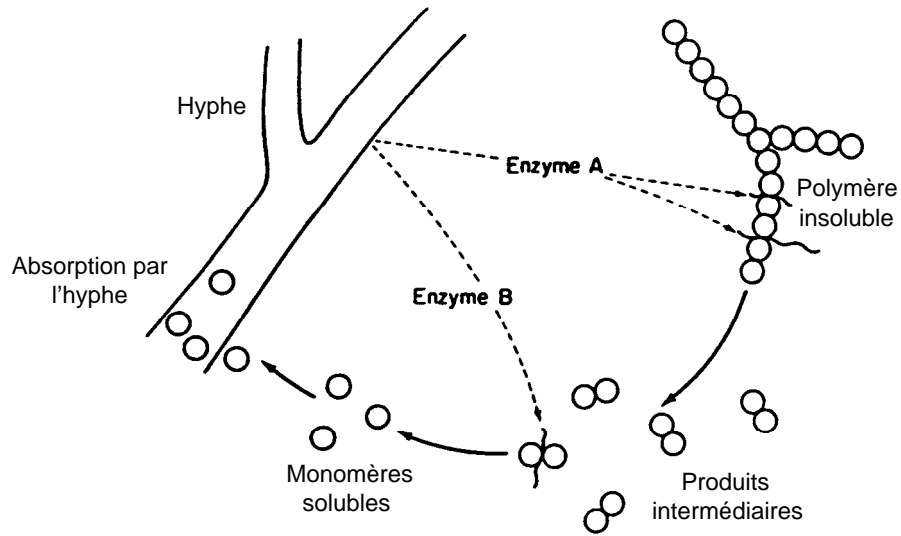


Figure 7-6 Digestion et absorption d'un polymère par un mycète\*

### Les systèmes de transport chez les levures

*Saccharomyces cerevisiae* possède des enzymes constitutives capables de métaboliser le glucose, le mannose et le fructose. À l'exception de certaines souches mutantes, toutes les levures peuvent également utiliser ces glucides. On a décrit chez *S. cerevisiae* un certain nombre de systèmes de transport pour les glucides : un système constitutif commun pour le glucose, le fructose et le mannose ; des systèmes inductibles différents pour le galactose, le maltose et le maltotriose. Le transport des hexoses par les voies constitutives d'une part et, d'autre part, par la voie inductible pour le galactose, est une réaction d'équilibre qui ne nécessite pas d'énergie. D'un autre côté, les systèmes de transport du maltose et du maltotriose nécessitent de l'énergie. Par exemple, le transport de maltose est couplé au gradient électrochimique de protons (SERRANO, 1977). Le saccharose est hydrolysé par l'invertase, une enzyme extracellulaire, en glucose et en fructose. Le maltose et le maltotriose ont des mécanismes de transport indépendants (une maltose perméase ou une maltotriose perméase) qui transportent ces deux sucres à travers la membrane cellulaire. Une fois à l'intérieur, ceux-ci sont hydrolysés en glucose par le système d' $\alpha$ -glycosidase (HAUTERA *et al.*, 1975 ; STEWART *et al.*, 1979).

p. 464

### Le lactose

Le disaccharide lactose est composé de glucose et de galactose. On le retrouve dans le lait et en forte concentration dans le petit-lait (ou lactosérum), un sous-produit de la fabrication de fromage. On connaît deux espèces de levures capables d'hydrolyser le lactose, à savoir *Kluyveromyces fragilis* et *K. lactis*. Le transport du lactose est très semblable à celui du maltose : le lactose est transporté à travers la membrane cellulaire grâce à un système dit lactose perméase. Une fois à l'intérieur de la cellule, le lactose est hydrolysé en glucose et en galactose. Ces deux sucres sont ensuite utilisés au cours de la glycolyse.

\* \* Source : MOORE-LANDECKER Elizabeth (1982), *Fundamentals of the Fungi*, Englewood-Cliffs, Prentice-Hall, 2nd ed., p. 281-286.

p. 465

### **Le maltose et maltotriose**

Le disaccharide maltose et le trisaccharide maltotriose traversent intacts la membrane cellulaire des levures. Ces deux sucres sont transportés grâce à un système inductible de perméases et sont ensuite hydrolysés par une  $\alpha$ -glycosidase, qui est également inductible. Le transport, l'hydrolyse et la fermentation du maltose sont particulièrement importants chez les souches de levures de bière et de boulangerie, étant donné que le maltose est le principal composant glucidique du moût de bière et de la pâte à pain.

p.467

### **Les pentoses**

En raison de la préoccupation au sujet des coûts à long terme et de la disponibilité des réserves de pétrole et de gaz naturel, il y a de plus en plus d'intérêt pour les processus permettant d'utiliser les ressources renouvelables, comme la biomasse végétale, pour produire des carburants liquides et des matières premières chimiques. Le contenu énergétique de la biomasse peut être utilisé très simplement en la brûlant. Grâce à des moyens thermochimiques et biologiques, il est également possible de convertir la biomasse en des carburants gazeux et liquides de même qu'en des produits chimiques de haute valeur. Les principaux composants organiques de la biomasse végétale terrestre sont la cellulose, l'hémicellulose et la lignine. Selon SCIAMANNA *et al.* (1977), tous ces composants organiques comprennent environ un tiers de pentoses et deux tiers d'hexoses. La cellulose est un polymère de D-glucose reliés par des liaisons linéaires  $\beta$ -1,4 ; cette molécule de haut poids moléculaire est insoluble. La lignine se compose de polymères de différents alcools et est aussi une très grosse molécule insoluble. Les hémicelluloses sont de gros polymères linéaires et ramifiés formés de sous-unités de D-xylose, de L-arabinose, de D-mannose, de D-glucose, de D-galactose et d'acide D-glucuronique. Bien qu'il existe un certain nombre de procédés permettant la transformation de cellulose, d'amidon et d'hexoses en carburants et en produits chimiques (SHUSTER, 1978), les chercheurs ont démontré un moins grand intérêt pour la biotransformation des pentoses, malgré leur abondance dans la biomasse.

Les espèces du genre *Saccharomyces* sont incapables de fermenter le D-xylose. Cependant, des souches de *S. cerevisiae* peuvent très bien croître en présence de D-xylulose, un intermédiaire du métabolisme du D-xylose. Le catabolisme du D-xylose, chez les levures qui peuvent l'utiliser, se déroule par la transformation intracellulaire en xylitol, puis en D-xylulose. Les recherches dans cette voie visent donc à transformer, par fermentation, le D-xylose en D-xylulose ; ce produit pourra ensuite être fermenté par *S. cerevisiae*.

p. 472

### **Le saccharose**

Ce disaccharide est d'abord hydrolysé par l'invertase, une enzyme extracellulaire, en glucose et en fructose qui sont ensuite transportés à l'intérieur de la cellule. D'autres sucres, tels le raffinose, le stachyose et le verbascose, sont également hydrolysés par cette enzyme. Cependant, c'est le saccharose qui se révèle le meilleur substrat de l'invertase.

### Petit glossaire

**bourgeonnement**, m.

mode de reproduction asexuée propre à la majorité des levures, entre autres : un nouvel individu se forme à partir d'une excroissance, en forme de bourgeon, d'un parent. Cet individu peut se détacher et devenir indépendant, ou demeurer attaché et former une colonie.

**constitutif**, adj.

se dit entre autres pour des protéines produites régulièrement (en continu) par la cellule.

**hyphes**, f. ou m.

nom donné à chacun des filaments chez les mycètes.

**inductible**, adj.

se dit entre autres pour des protéines dont la synthèse est déclenchée à la suite d'un stimulus.

**métabolite**, m.

produit d'une réaction métabolique.

**mycélium**, m.

l'ensemble des hyphes d'un mycète. Par exemple, on peut parler d'une moisissure ou d'un champignon comme étant un mycélium.

**mycètes**, m. pl.

c'est-à-dire les levures, les moisissures et les champignons.

**souche**, m.

variété au sein d'une même espèce. Une souche se caractérise par des propriétés (d'origines génétiques) différentes des autres souches. Par exemple, telle souche a la capacité de fermenter le lactose, une autre souche ne peut le faire.

NOMS : \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Temps (min)	1 Eau distillée	2 Glucose 10%	3 Glucose 5%	4 Glucose 2,5%	5 Glucose 1,25%
0					
5					
10					
15					
20					
25					
30					
35					
40					

Temps (min)	6 Fructose	7 Lactose	8 Maltose	9 Saccharose	10 Glu. et fruct.
0					
5					
10					
15					
20					
25					
30					
35					
40					