MÉTABOLISME DE L'ÉTHANOL PAR LES LEVURES DE "FLEUR"

Mª J. FERNANDEZ, V. GARCIA, C. LLAGUNO et J. GARRIDO
Institut des Fermentations Industrielles
Section d'Œnologie
Conseil Supérieur de la Recherche Scientifique
MADRID (Espagne)

INTRODUCTION

Parmi les travaux bibliographiques existants sur le métabolisme de l'éthanol par les levures, on peut noter les études de LEMOIGNE et **al.** (1954) confirmées par POLAKIS et **al.** (1964) et de DEKEN (1966) qui mettent en évidence une accumulation d'éthanol et d'acide acétique dans les cultures aérobies, sur glucose, de levure de boulangerie. Ces produits sont métabolisés quand il n'y a plus de glucose et quand l'anaérobiose, provenant de la dégradation du glucose, a elle-même disparu. Ces faits confirment que l'utilisation de l'éthanol se fait seulement par voie oxydative.

VANDERWINKEL (1959), MAITA et ESTABROCK (1962) étudient l'influence de l'éthanol sur les systèmes oxydatifs et sur la consommation en oxygène de cellules de levure de boulangerie. Ces auteurs constatent une élévation du quotient respiratoire ainsi qu'une diminution de la teneur en NAD.

Parmi tous les travaux réalisés sur la levure et portant sur l'étude du métabolisme de l'éthanol — particulièrement du point de vue physiologique — il faut citer ceux de BIZEAU et **al.** (1965) sur des cellules de **Saccharomyces cerevisiae** cultivées en milieu synthétique à partir de diverses sources de carbone ; ces auteurs constatent que l'utilisation de l'éthanol se fait, au moins en partie, sans dégagement de CO_2 et avec formation d'un composé plus oxydé à deux atomes de carbone. D'autre part, de faibles concentrations en éthanol (0,19 M) stimulent l'oxydation des substrats endogènes des cellules cultivées préalablement sur glucose. Le mécanisme respiratoire est partiellement inhibé par des concentrations en éthanol supérieures à 0,2 M. Sur les cellules cultivées préalablement sur éthanol, le quotient respiratoire, sur éthanol, est plus élevé que sur

glucose. Les précédents auteurs supposent que cette augmentation pourrait être reliée à une induction de la synthèse des enzymes du cycle glyoxylique, du TCA et de l'acétate coenzyme A kinase. Des teneurs en éthanol encore plus élevées (1,75 M) ont été signalées comme tout à fait toxiques pour les levures (WOON KI, 1965).

Au cours de tous les précédents travaux on a souvent utilisé **Saccharomyces cerevisiae** sous forme de levure pressée de boulangerie et non pas sous forme de souche pure ; on a également employé d'autres espèces analogues mais on n'a jamais utilisé d'espèces de « fleur » capables d'utiliser l'éthanol à de fortes concentrations et donc plus intéressantes pour l'étude du métabolisme de ce substrat.

Depuis plusieurs années, dans notre Institut, on poursuit des études sur les divers aspects microbiologiques et technologiques de ces espèces de « fleur » (SAAVEDRA, 1959 ; INIGO et **al,** 1960 et 1961, CABEZUDO et **al,** 1968 ; LLAGUNO, 1971). Les concentrations en éthanol (de 14 à 15 p. 100 soit 3 à 3,5 M) susceptibles d'être utilisées par ces espèces sont toxiques pour les autres levures même pour certains **Saccharomyces.** Ces espèces de « fleur » doivent donc posséder un système enzymatique obligatoirement différent, à la fois par la nature des enzymes, leur taux d'activité et leurs possibilités de régulation, pour être en mesure de survivre et de se développer en présence de si fortes teneurs d'éthanol.

Cette étude est susceptible d'apporter des résultats scientifiquement intéressants dans la connaissance des divers systèmes enzymatiques pouvant exister chez quelques espèces de levures ; cela a été constaté chez d'autres espèces par RUIZ-AMIL et **al.** (1965 et 1966), par FERNANDEZ et **al.** (1967) et, comme le signale OPARINE (1963), au sujet de quelques systèmes enzymatiques de levures intervenant dans le moût au cours de l'élaboration des vins. Ces résultats apportent aussi une plus grande connaissance de la physiologie des levures de « fleur » et sont susceptibles d'être utilisés d'un point de vue taxonomique.

Dans le cadre général de l'étude du métabolisme de l'éthanol chez les levures de « fleur », nous étudierons dans ce travail l'alcool-déshydrogénase en tant qu'enzyme responsable du premier stade de l'utilisation de l'éthanol.

PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Matériel biologique.

Les expériences sont réalisées avec les espèces de « fleur » suivantes : **Saccharomyces cheresiensis** (souches V-24, 480 et 486), **Saccharomyces beticus** (souches 1639, 1652 et 1659), **Saccharomyces montuliensis** (souches 1682, 1685 et 1690), **Saccharomyces rouxii** (souches 660, 666 et 674), **Saccharomyces oviformis** (souche 458) et l'espèce filmogène **Candida mycoderma** (souche 1260).

Les levures sont conservées sur milieu gélosé à 2 p. 100 d'extrait de malt et à 6 degrés Baumé.

Milieux de culture.

Le milieu synthétique utilisé est celui indiqué par HERTZ (1943) auquel on ajoute pour 100 ml 2,4 microgrammes de biotine et 5 milligrammes d'extrait de levure. Au moment de l'utilisation, on ajoute à ce milieu 14 p. 100 d'éthanol ou 20 p. 100 de glucose selon le cas ; ce milieu est appelé H 1. Pur la culture des cellules choisies pour ensemencer les milieux enrichis en éthanol, on utilise le milieu A (0,1 p. 100 de KH_2PO_4, 0,1 p. 100 de SO_4 $(NH_4)_2$, 0,05 p. 100 de $MgSO_4$, 7 H_2O et 0,5 p. 100 d'extrait de levure) avec une teneur en éthanol de 7 p. 100.

Technique de culture.

On réalise une culture immergée avec agitation, dans des récipients spéciaux (décrits par CABEZUDO et **al.**, 1968), à une température de 18° C. Au cours de la culture stationnaire en semi-anaérobiose, la température est maintenue à 28° C.

Etudes de la croissance.

Le moment de l'ensemencement ainsi que le développement des cellules sont déterminés approximativement par mesure de la densité optique de la suspension de levures à 660 nm ; l'appareil utilisé est un Spectronic 20 Bausch et Lomb. Les cellules sont récoltées aux temps indiqués dans chaque essai et lavées avec une solution de KCl à 9 p. 100.

Alcool-déshydrogénase.

La teneur en alcool-déshydrogénase est mesurée par la réduction du NAD d'après RACKER (1955). Les activités enzymatiques sont mesurées

en unités par milligramme de protéine (U par mg), c'est-à-dire en micromoles d'éthanol métabolisé par minute et par milligramme de protéine.

Ethanal.

Il est dosé par la méthode de JAULMES, modifiée par CASAS (1954).

Extraits bruts.

Les extraits sont obtenus à 4° C par broyage des cellules avec de l'alumine (2 g d'alumine par gramme de cellules humides) ; l'extraction est réalisée en présence d'un tampon 0,05 M Tris HCl à pH 7,6 (2 volumes de tampon par gramme de cellules humides). Après 20 minutes de centrifugation à 20.000 g, on utilise le surnageant pour doser l'activité enzymatique.

Protéines.

Elles sont dosées d'après la méthode de LOWRY et **al.** (1951).

RESULTATS ET DISCUSSIONS.

Développement de Saccharomyces cheresiensis **en milieu synthétique.**

On a choisi l'espèce de levure de « fleur » **Saccharomyces cheresiensis** (souche V-24) à la suite des résultats que nous avons préalablement obtenus avec cette espèce dans les travaux sur le vieillissement accéléré des vins.

On recherche les conditions de culture en milieu synthétique qui reproduisent l'utilisation de l'éthanol et l'accumulation d'éthanal. Ces caractéristiques sont celles du développement de cette espèce dans son milieu spontané, (vins d'Andalousie occidentale).

Sur le milieu synthétique déjà cité, en présence de 14 p. 100 d'éthanol comme source de carbone, on obtient un développement cellulaire moins important et une plus grande accumulation d'éthanal dans le milieu de culture de même rang que dans le vin. Ce développement cellulaire est, en valeur absolue, très faible et dépend de la température de culture (le développement est maximum à 18° C et nul à 28° C). L'addition de faibles quantités de glucose (0,05 p. 100) dans ce milieu n'améliore pas sensiblement la multiplication cellulaire.

Afin d'obtenir une quantité suffisante de levures pour préparer des extraits enzymatiques, on cultive préalablement les cellules sur le milieu A contenant 7 p. 100 d'éthanol, à 18° C, pendant 5 jours. Dans ces conditions, la vitesse de multiplication de **Saccharomyces cheresiensis** est plus grande bien qu'elle soit environ la moitié de celle obtenue sur glucose. On place les cellules ainsi obtenues dans le milieu H 1 contenant 14 p. 100 d'éthanol avec agitation, pendant 48 heures à 18° C ; on obtient ainsi une quantité appréciable de cellules cultivées en milieu synthétique avec l'éthanol comme seule source carbonée ; ces cellules accumulent l'éthanal dans le milieu comme celles cultivées sur vin.

Respiration en présence d'éthanol.

Dans un appareil de Warburg on mesure la consommation d'oxygène lors de l'utilisation de l'éthanol par les cellules non proliférantes de **Saccharomyces cheresiensis,** cultivées sur éthanol ou sur glucose.

La quantité d'oxygène consommée est sensiblement plus faible dans le cas de cellules cultivées sur éthanol que dans le cas de celles cultivées sur glucose. Les valeurs obtenues dans le premier cas représentent 70 p. 100 de celles obtenues à partir de cellules cultivées sur glucose. Cette diminution de la consommation d'oxygène est encore plus importante quand on utilise des cellules provenant de deux cultures successives sur des milieux dont l'éthanol constitue la seule source carbonée.

Ces résultats, qui sont en contradiction avec ceux obtenus par BIZEAU et **al.** (1965), semblent indiquer que la présence d'une forte concentration en éthanol dans un milieu de culture détériore le système enzymatique de la cellule, en affectant le processus de synthèse (inhibition de la croissance par de fortes teneurs d'éthanol) ainsi que les processus respiratoires.

Teneur en alcool-déshydrogénase.

A partir de cellules de **Saccharomyces cheresiensis** sur milieu synthétique H 1 avec, comme sources de carbone, différentes concentrations d'éthanol, on détermine le taux d'activité spécifique d'ADH dans les extraits bruts correspondants.

Le tableau I rassemble les résultats obtenus. En présence de 14 p. 100 d'éthanol les activités spécifiques trouvées sont comprises entre 2,2 et 3,2 U par milligramme de protéine ; à ces résultats, correspond

une accumulation d'éthanal qui varie de 350 à 550 mg par l. Si la concentration en éthanol du milieu est de 7 p. 100, les valeurs des activités diminuent jusqu'à 1 à 1,3 U par milligramme de protéine, avec 100 à 200 mg par l d'éthanal. Des teneurs semblables ont été obtenues dans des extraits de cellules cultivées sur vin à 14 ou 17 p. 100 d'éthanol. (LLAGUNO et **al.**, 1970). Ces résultats montrent que la teneur en ADH est d'autant plus élevée que le milieu est plus concentré en éthanol. La quantité d'éthanal accumulée est également plus élevée. Il est donc indispensable de vérifier si les teneurs en ADH des cellules cultivées sur éthanol reproduisent une oxydation de l'éthanol en éthanal ou une transformation inverse, caractéristique de la fermentation anaérobie du glucose.

TABLEAU I

Activité spécifique d'ADH dans les extraits bruts de cellules de S. cheresiensis, **s'étant développé en présence de différentes concentrations d'éthanol, et accumulation d'éthanal.**

Alcool désydrogénase (U. par milligramme de protéine)		Ethanal (mg par l)	
14 p. 100 d'éthanol	7 p. 100 d'éthanol	14 p. 100 d'éthanol	7 p. 100 d'éthanol
3,2	1,3	550	200
2,3	1,2	400	150
2,2	1,0	350	100

Afin de vérifier cette hypothèse, on utilise des cellules de **Saccharomyces cheresiensis** cultivées à 28° C en culture stationnaire anaérobie, sur milieu synthétique à 24 p. 100 de glucose comme source de carbone. Cette teneur en glucose correspond à la quantité théorique nécessaire pour obtenir, après fermentation, une teneur en éthanol de 14 p. 100.

Les extraits bruts correspondants aux cellules récoltées en pleine fermentation, après 10 jours de culture, ont un taux d'activité spécifique d'ADH de 2,7 U par milligramme de protéines. Le taux d'ADH dans les cellules correspondant à cette phase, après 20 jours, diminue jusqu'à 1,2 U par milligramme de protéines. Après disparition totale du glucose on obtient 14 p. 100 d'éthanol et 80 mg par litre d'éthanal. Cette diminution du taux d'ADH provient peut-être de l'instabilité de l'ADH fermentative ou — ce qui semble plus plausible — d'une plus grande quantité de vieilles cellules. Par la suite, on place la culture dans des conditions d'aérobiose avec agitation, à 18° C. Dans les 48 heures, le taux d'ADH

dans les extraits enzymatiques correspondants s'élève à 2,9 U par milligramme de protéines ; la teneur en éthanal augmente jusqu'à 450 mg par litre.

Cette augmentation du taux d'ADH provient du changement des conditions de milieu pour les cellules : culture aérobie, agitation, 14 p. 100 d'éthanol. Ceci semble indiquer que, dans de telles conditions, il existe une ADH oxydative transformant l'éthanol en éthanal.

Taux d'ADH chez diverses espèces de levures filmogènes.

Certaines levures filmogènes se trouvent classées parmi les levures de « fleur » étant donné qu'elles forment un voile sur les vins de 14 à 15 p. 100 d'éthanol ainsi que de l'éthanal. D'autres levures, bien que filmogènes, ne sont pas considérées comme levures de « fleur », car elles ne possèdent pas ces propriétés.

Afin de vérifier si le taux élevé d'ADH qui apparaît chez **Sacch. cheresiensis** est caractéristique de toutes les levures de « fleur », on détermine le taux d'ADH dans les extraits bruts de diverses levures filmogènes cultivées sur éthanol.

TABLEAU II

Activité spécifique d'ADH chez quelques levures filmogènes

Levures de « fleur »										Candida mycoderma	
S. cheresiensis		**S. montuliensis**		**S. beticus**		**S. rouxii**		**S. oviformis**			
Souche		Souche		Souche		Souche		Souche		Souche	
V- 24	2,5	1682	2,0	1639	1,5	660	1,5				
480	2,2	1685	2,3	1652	2,2	666	1,2	458	2,6	1260	0,3
486	2,6	1690	2,5	1659	1,3	674	1,3				

Les résultats correspondent aux valeurs moyennes du taux d'activité obtenu au cours de trois essais successifs et sont exprimés en U par milligramme de protéine.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau II ; comme on peut le constater, les taux d'ADH sont toujours élevés chez les espèces de « fleur » et diminuent légèrement et progressivement selon les souches suivantes chez : **Sacch. cheresiensis, Sacch. montuliensis, Sacch. beticus** et **Sacch. rouxii**. Ces différences du taux d'ADH entre ces diverses espèces correspondent aux différences des vitesses de développement des souches (c'est-à-dire à la rapidité de formation du voile sur le vin) ; ces vitesses sont sensiblement différentes entre **Sacch. cheresiensis** et **Sacch. rouxii.**

Le taux d'ADH est élevé (de 2,4 à 2,8 U par milligramme de protéine) même chez **Sacch. oviformis,** espèce de « fleur » qui forme difficilement un voile en présence de concentrations élevées en éthanol (14 à 15 p. 100). Au contraire, chez **Candida mycoderma,** espèce filmogène mais non de « fleur », le taux d'ADH est moins élevé. Les extraits bruts de cette dernière espèce, filmogène en présence d'éthanol à 7 p. 100, présentent une activité spécifique de 0,3 - 0,4 U par milligramme de protéine, valeur qui est le huitième des valeurs trouvées avec les levures de « fleur » (**Sacch. cheresiensis**).

Les résultats obtenus indiquent que la teneur élevée en ADH oxydative est une qualité spécifique les levures de « fleur » leur permettant d'utiliser de fortes concentrations d'éthanol qu'elles transforment en éthanal. Cet éthanal, partiellement rejeté dans le milieu de culture, s'y accumule.

D'autre part, il serait intéressant de savoir s'il existe une possibilité de régulation de l'ADH chez ces espèces de levures et des autres enzymes intervenant dans l'utilisation de l'éthanol. Actuellement, nous étudions la régulation de la synthèse de l'ADH. Ces résultats seront publiés prochainement.

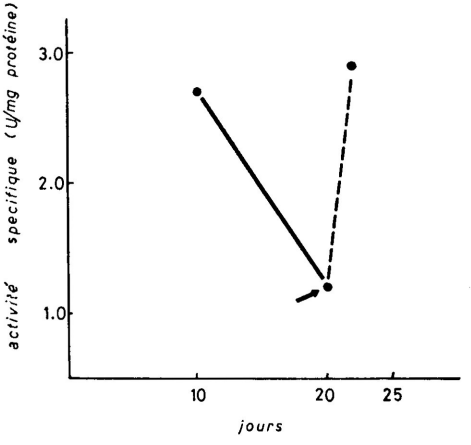


Fig. 1. — Taux d'activité de l'alcool déshydrogénase chez **Saccharomyces cheresiensis** lors des différentes phases de la fermentation sur glucose (24 p. 100).
Au point marqué (——→) le glucose a disparu du milieu de culture et les cellules poursuivent leur développement aérobie en présence d'éthanol (14 p. 100 produit par ces cellules).
(————) Culture stationnaire sur glucose (24 p. 100)
(— — —) Culture aérobie (Ethanol à 14 p. 100 produit pendant la fermentation du glucose).

CONCLUSIONS

Les levures de « fleur » sont capables de se développer, de produire de l'éthanal en milieu de culture synthétique contenant 14 p. 100 d'éthanol, comme source de carbone. Cette concentration en éthanol est identique à celle des vins d'Andalousie Occidentale dans lesquels ces levures se développent spontanément.

Les échanges gazeux respiratoires qui ont lieu sur l'éthanol ne sont pas les mêmes si les cellules considérées de **Saccharomyces cheresiensis** proviennent d'une culture primaire sur éthanol ou si cette première culture a été faite sur un milieu glucosé. Dans le premier cas, le volume d'oxygène utilisé n'est que les 70 p. 100 de ce qu'il est dans le second cas.

La richesse en ADH chez **Sacch. cheresiensis** est d'autant plus élevée qu'il y a plus d'éthanol dans le milieu (2,2 à 3,2 U par milligramme de protéine pour 14 p. 100 d'éthanol et 1,0 à 1,3 U par milligramme de protéine pour 7 p. 100 d'éthanol). La quantité d'éthanal accumulée dans le milieu de culture est alors également plus élevée : la teneur en éthanal étant respectivement de 350 à 550 milligrammes par litre et 100 à 200 milligrammes par litre.

On observe une augmentation de la teneur en ADH à la suite du passage des cellules (fermentant sur glucose) à des conditions de culture **aérobies** sur l'éthanol produit (14 p. 100). Ceci paraît indiquer que, dans de telles conditions, une ADH oxydative agit pour transformer l'éthanol en éthanal.

Cette teneur élevée en ADH oxydative semble être une qualité spécifique des levures de « fleur » ; ceci leur permet d'utiliser des concentrations en éthanol élevées et de le transformer en éthanal, partiellement accumulé dans le milieu.

Nous remercions M. le Professeur RUIZ-AMIL pour l'orientation et les conseils qu'il nous a donnés au cours de la réalisation de ce travail. Nous voulons aussi manifester notre reconnaissance à M. le Dr INIGO pour son assistance scientifique et pour l'isolement de souches de levures employées. Nous remercions également Mlle MARTIN pour son aide technique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BIZEAU C. et GALZY P., 1965. Etude de la respiration de quelques substrats non fermentescibles par **Saccharomyces cerevisiae** hansen. **Ann. Tech. Agric. 14,** 275-289.

BIZEAU C., CHANAL J.L. et GALZY P., 1965. Remarques sur le métabolisme de l'éthanol chez **Saccharomyces cerevisiae** hansen. **Rev. Ferm. et Ind. Alim., 20,** 62-66.

CABEZUDO M.D., LLAGUNO C. et GARRIDO J., 1968. Accelerated of fino wines by submerged culture using film-forming yeast. **Amer. J. Enol. Vit. 19,** 63-69.

CASAS J., 1954. La déterminacion de acetaldehido con métodos al bisulfito y su aplicacion al analisis de vinos. **Cienc. Aplic. 8 (37),** 103-111.

DEDEKEN R.H., 1966. The Crabtree effect : A regulatory system in Yeast. **J. Microbiol. 44,** 149-156.

FERNANDEZ M.J., MEDRANO L., RUIZ-AMIL M. et LOSADA M., 1967. Regulation and function of pyruvate kinase and malate enzyme in yeast. **European J. Biochem. 3,** 11-18.

HERTZ R., 1943. Modificaciones al método de SNELL y col. de valoracion de biotina. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 52,** 15.

INIGO B et ARROYO V., 1960. Los agentes de la fermentacion vinica en la zona de Moriles-Montilla. **Rev. Cienc. Aplic. 72,** 18-29.

INIGO B., VAZQUEZ D. et ARROYO V., 1963. Los agentes de la fermentacion vinica en la zona de Jerez. **Rev. Cienc. Aplic. 93.** 296-300.

LEMOIGNE M., AUBERT J.P. et MILLET J., 1954. La production d'alcool et le rendement de croissance de la levure de boulangerie cultivée en aérobiose. **Ann. Inst. Pasteur 87,** 427-439.

LLAGUNO C., FERNANDEZ M.J., GARRIDO M.D. et GARRIDO J., 1970. Influence du taux d'activité de l'alcool déshydrogénase des levures de « fleur » sur le vieillissement des vins. **Conn. Vigne Vin, 4,** 123-132.

LLAGUNO C., FERNANDEZ M.J., GARRIDO M.D. et GARRIDO J., 1971. Désacidification biologique des vins par levures de « fleur ». **Conn. Vigne Vin. 5, 2,** 175-184.

LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. et RANDALL R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem. 193,** 265-275.

MAITRA P.K. et ESTABROOK R.W., 1962. The ADP and phosphate control of ethanol oxidation in baker's yeast. **Biochem. Biophys. Res. Conm., 9,** 1-6.

OPARINE A.I., 1963. Biochimie du Vin. **Bull. O.I.V. 36,** 1301-1310.

POLAKIS E.S., BARTLEY W. et MEEK G.A., 1964. Changes in the structure and enzyme activity of **Saccharomyces cerevisiae** in response to changes in the environment. **Biochem. J., 90,** 369-374.

RACKER E., 1955. Alcohol dehydrogenase from bakers yeast. In **methods in Enzymology** S.P. Colowick et N.O. Kaplan éditeur Academic Press New-York, Vol. I, 500-501.

RUIZ-AMIL M., de TORRONTEGUI G., PALANCIAN E., CATALINA et LOSADA M., 1965. Properties and function of yeast pyruvate carboxylase. **J. Biol. Chem. 240,** 3485-3492.

RUIZ-AMIL M., FERNANDEZ M.J., MEDRANO L. et LOSADA M., 1966. Cellular distribution of yeast pyruvate decarboxylase and its induction by glucose. **Arch. Mikrobiol. 55,** 46-53.

SAAVEDRA I.J., 1959. La levadura de « flor » en la crianza del vino. **Tesis doctoral,** Madrid, Espana.

VANDERWINKEL E., 1959. Contribution à l'étude du mécanisme oxydatif chez la levure au niveau subcellulaire. **Rev. Ferm. et Ind. Alim., XIV,** 251-267.

WOON KI P., 1965. The effect of chemical and physical agents on the intracellular enzymes of yeast. **Thèse Université,** Dalhousie, Canada. (cité par BIZEAU et **al.** 1965).