

Saccharomyces cerevisiae et fermentation alcoolique. Étude en fermenteur de laboratoire.

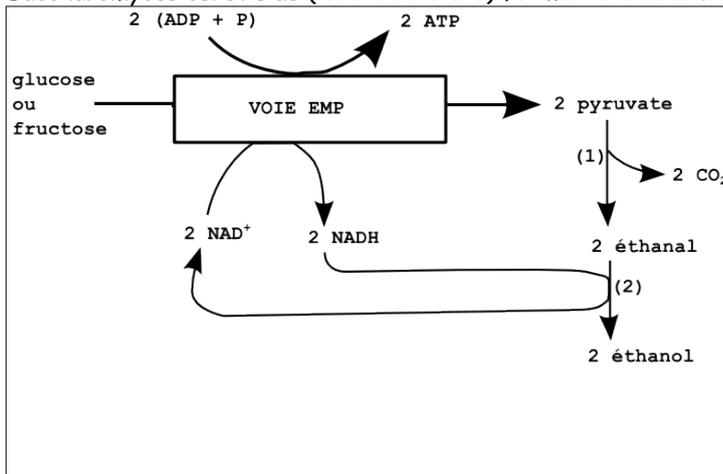
1. Données préalables concernant le métabolisme énergétique de Saccharomyces cerevisiae

Le métabolisme énergétique de *Saccharomyces cerevisiae* peut être de type respiration aérobie (chaînes respiratoires mitochondriales ...) ou fermentatif (fermentation alcoolique).

En présence de fortes concentrations en sucres comme le glucose, le fructose ou le saccharose (par exemple supérieures à 1,5 à 2 g/L), **en conditions aérées**, *S. cerevisiae* adopte un métabolisme énergétique essentiellement fermentatif (à 80%) et très peu de glucose est respiré. Un métabolisme respiratoire « total » ne sera installé qu'à l'épuisement des sucres (ceci se traduit d'ailleurs par une augmentation de la quantité de mitochondries intracellulaires). Et la levure catabolisera finalement l'éthanol produit lors de la phase de fermentation par respiration aérobie.

La phase de transition entre le métabolisme essentiellement fermentatif des sucres et le métabolisme respiratoire de l'éthanol est une transition auxique (auxic shift).

Saccharomyces cerevisiae (levure de bière) fermente le saccharose, le glucose, le fructose. Principalement selon :



(1) : pyruvate décarboxylase ; (2) : éthanol déshydrogénase.

Le saccharose, hydrolysé en glucose et fructose par l'activité bêta-fructosidase des levures est un très bon substrat.

L'éthanol (alcool) formé est un produit terminal de fermentation (PTF). C'est un produit issu directement du métabolisme énergétique. Il en est de même pour CO₂. On dit que ce sont des produits simples.

Figures de droite : Culture de *Saccharomyces cerevisiae* de type sauvage (WT) en milieu non renouvelé agité, aéré, 30°C

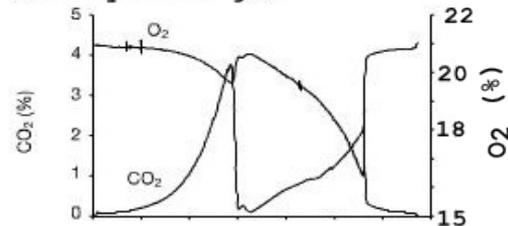
Milieu minimum glucosé à 20 g/L, pH 5.

Annoncés en phase de consommation du glucose :

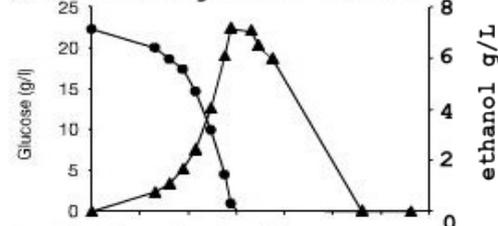
- glucose consumption rate (mmol/(g.h)) = 16±2
- ethanol production rate (mmol/(g.h)) = 20±3
- respiratory quotient = RQ = 3,4
- temps de génération vers 2 h

D'après *Switching the mode of metabolism in the yeast Saccharomyces cerevisiae*; Karin Otterstedt, Christer Larsson, Roslyn M. Bill, Anders Sta hlberg, Eckhard Boles, Stefan Hohmann & Lena Gustafsson; *EMBO reports* (2004) 5, 532-537.

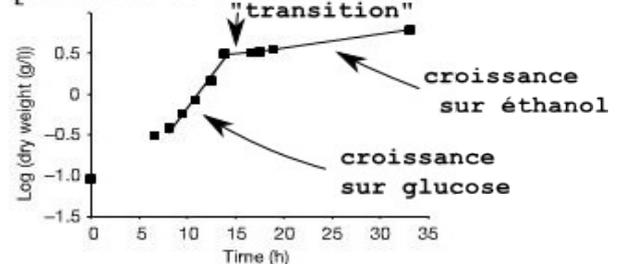
A Analyse des gaz



Evolution du glucose et de l'éthanol



Evolution de la biomasse



L'éthanol est un solvant qui possède des effets toxiques à forte concentration et les levures elles mêmes seront touchées. Les données de la littérature sont les suivantes : avec les levures de vinification on peut atteindre 15-16% (v/v) d'éthanol au maximum.

Compte-rendu

A l'aide du schéma ci-dessus, calculer le rendement stœchiométrique de conversion du glucose en éthanol lors de la fermentation alcoolique ($Y'_{eth/gluc}$ en g d'éthanol par g de glucose).

2. Travail pratique à réaliser

2.1 Organisation générale de l'étude proposée

On se propose de cultiver *Saccharomyces cerevisiae* en milieu non renouvelé, parfaitement agité, à 30°C, en aération.

Les paramètres suivis : [biomasse], [glucose], [éthanol], pH, pO_2 , température.

Les milieux de culture choisis = milieux synthétiques glucosés ou jus de raisin blanc.

Préculture pour les inoculums : Culture de 18 heures d'une *S. cerevisiae* haploïde, mata, prototrophe sur milieu YNB à 25g/L en glucose (400 mL).

Remarques :

- Composition des 3 milieux synthétiques glucosés utilisés. Milieu dit YNBg25 : base YNB (YNB = yeast nitrogen base DIFCO) avec ajout de glucose à 25g/L. Milieu dit YNBg50 : base YNB (YNB = yeast nitrogen base DIFCO) avec ajout de glucose à 50g/L. Milieu dit YNB2xg150 : base YNB 2 fois concentrée avec ajout de glucose à 150g/L. (Voir composition de la base YNB en annexe en fin de polycopié)
- Le jus de raisin étant un excellent substrat de culture pour *S. cerevisiae*, on utilisera aussi un jus commercial « blanc » (« blanc » pour faciliter les mesures de biomasse pour évaluation de trouble). On peut considérer que les 3 sucres du jus de raisin sont le saccharose, le fructose et le glucose.

On propose 4 manipulations :

- **Manips 1, 2 et 3, en fermenteur agité, aéré, 30°C, sur milieu YNBg25 ou YNBg50 ou YNB2xg150**

1,5 litre de milieu thermostaté à 30°C. Aération à 0,4 volume d'air par volume de milieu et par minute (vvm), soit 0,28 L/min. Agitation constante à 350 rotations par minute (rpm), turbine Rushton ou régulation de $%O_2$ à consigne 15 % par le seul actionneur rotation de turbine entre 200 et 800 rpm. Volume de milieu maintenu constant grâce à la condensation des gaz de sortie et l'apport éventuel d'eau stérile.

Connaissant la concentration en biomasse de la préculture - elle a été mesurée en préalable - calculer le volume (vinoc) de préculture à inoculer de façon à obtenir une concentration en biomasse au départ correspondant à 0,1 à 620 nm (voir aussi le paragraphe 2.2). Introduire les vinoc mL d'inoculum : c'est le temps zéro de chaque manipulation.

- **Manip. 4, en fermenteur agité, aéré, 30°C, sur milieu jus de raisin blanc dopé en saccharose**

Idem ci-dessus mais avec 1L de jus de raisin blanc auquel on a ajouté 80g de saccharose par litre.

Le milieu « jus de raisin » contient les 3 sucres glucose, fructose, saccharose, ils ne seront pas suivis au cours de cette manipulation. Seules la biomasse et la concentration en éthanol seront suivies.

Les prélèvements :

Prélever au temps 0, puis à des temps exactement connus aux environs de 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 7h, 22h, 24h, 26h, 28h, 30h, 32h, 46h, 48h, 50h, 52h.

Prélever 1 mL de milieu de fermentation et transférer dans un tube microfuge puis centrifuger immédiatement le tube microfuge (centrifuger à 0°C pour stopper le métabolisme). Récupérer le surnageant après la centrifugation dans un tube propre et sec et **congeler immédiatement**. Le surnageant congelé, convenablement étiqueté, sera utilisé pour doser le glucose et/ou l'éthanol.

Au même temps, prélever pour la mesure de biomasse.

2.2 Concernant les mesures de concentrations en biomasse

Soit [X] la concentration en biomasse. [X] est évalué aux différents temps grâce au trouble à 620 nm en utilisant un spectrophotomètre en mode absorbance (mesure notée OD). Avec le matériel utilisé la limite de linéarité pour les mesures de [X] est de 0,6. Une absorbance de 1 correspond à une biomasse sèche de 0,7g/L.

Il est conseillé de réaliser toutes les mesures contre de l'eau distillée. Pour les échantillons trop concentrés en biomasse, diluer avec de l'eau distillée. Il convient de soustraire les valeurs de compensation convenables calculées grâce à la mesure des milieux de culture stériles non inoculés.

Attention, les levures sédimentent très vite. Homogénéiser extemporanément avant chaque dilution, chaque lecture au spectrophotomètre.

Travail annexe

Après inoculation des bioréacteurs, récupérer exactement 100 mL de reliquat de préculture dont « l'absorbance de biomasse » est mesurée. Centrifuger, laver 2 fois à l'eau et récupérer quantitativement la biomasse dans un tube à centrifuger en verre préalablement taré. Évaporer à 105°C jusqu'à masse constante. Vérifier alors la relation « absorbance 620 nm »/biomasse sèche.

2.3 Concernant les mesures de concentration en glucose

Voir le document annexe dédié.

2.4 Concernant les mesures de concentrations en éthanol

Voir le document annexe dédié.

3 Compte-rendu

- L'ensemble des résultats bruts obtenus, les résultats de biomasse, de glucose, d'éthanol ...
- Tracés des graphes $\ln([x]) = f(t)$, $[eth] = f(t)$, $[s] = f(t)$. Où t la variable temps, [s] la concentration mesurée en glucose à t, [eth] la concentration mesurée en éthanol à t, et [X] la concentration mesurée en biomasse à t.

- Analyse des résultats. Ci-dessous quelques indications.

Voici quelques indications pour l'analyse des résultats. :

- Analyse des phases mises en évidence par les graphes, en particulier les phases de croissance, la mise en évidence de la transition diauxique ...
- Détermination de μ_{\max} la vitesse spécifique maximale de croissance de la levure dans chaque expérience. Comparaisons.
- Déterminations lorsque c'est possible et que cela permet une analyse physiologique simple et intéressante (par exemple en phase exponentielle ou au contraire en phase plateau ...) de :
 - la valeur approchée de la vitesse de croissance R_x
 - la valeur approchée de la vitesse spécifique de croissance $\mu = R_x / [X]$
 - la valeur approchée de la vitesse de consommation du glucose R_g
 - la valeur approchée de la vitesse spécifique de consommation du glucose $G_{sp} = R_g / [X]$
 - la valeur approchée de la vitesse de production ou de consommation de l'éthanol R_{eth}
 - la valeur approchée de la vitesse spéc. de production ou de consommation de l'éthanol $E_{sp} = R_{eth} / [X]$.
 - le rendement de production de éthanol par rapport au glucose $Y_{eth/gluc}$

Composition de la base YNB DIFCO	Compounds Supplying Trace Elements
Difco™ Yeast Nitrogen Base	Boric Acid 500.0 µg
Approximate Formula* Per Liter	Copper Sulfate 40.0 µg
Nitrogen Source	Potassium Iodide 100.0 µg
Ammonium Sulfate 5.0 g	Ferric Chloride 200.0 µg
Amino Acids	Manganese Sulfate 400.0 µg
L-Histidine Monohydrochloride 10.0 mg	Sodium Molybdate 200.0 µg
LD-Methionine 20.0 mg	Zinc Sulfate 400.0 µg
LD-Tryptophan 20.0 mg	Salts
Vitamins	Monopotassium Phosphate 1.0 g
Biotin 2.0 µg	Magnesium Sulfate 0.5 g
Calcium Pantothenate 400.0 µg	Sodium Chloride 0.1 g
Folic Acid 2.0 µg	Calcium Chloride 0.1 g
Inositol 2,000.0 µg	
Niacin 400.0 µg	
p-Aminobenzoic Acid 200.0 µg	
Pyridoxine Hydrochloride 400.0 µg	
Riboflavin 200.0 µg	
Thiamine Hydrochloride 400.0 µg	

La composition élémentaire moyenne des levures peut s'écrire $CH_{1,6}O_{0,54}N_{0,14}P_{0,01}$ plus 4,5% de la masse sous forme de minéraux.

Bibliographie

- <http://www.eng.umd.edu/~nsw/ench485/lab9.htm>

- Haurie V, Perrot M, Mini T, Jenö P, Sagliocco F, Boucherie H, The transcriptional activator Cat8p provides a major contribution to the reprogramming of carbon metabolism during the diauxic shift in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 2001 Jan 5;276(1):76-85
- *Homeostatic Adjustment and Metabolic Remodeling in Glucose-limited Yeast Cultures* ; Matthew J. Brauer , Alok J. Saldanha , Kara Dolinski , and David Botstein ; *Molecular biology of the cell Vol. 16, Issue 5, 2503-2517, May 2005*
- *Switching the mode of metabolism in the yeast Saccharomyces cerevisiae* ; Karin Otterstedt, Christer Larsson, Roslyn M. Bill, Anders Sta hlberg, Eckhard Boles, Stefan Hohmann & Lena Gustafsson ; *EMBO reports (2004) 5, 532-537.*