

ÉTUDE D'UNE DÉFICIENCE RESPIRATOIRE CHEZ *SACCHAROMYCES CARLSBERGENSIS*

J. HABOUCCHA ET CH. A. MASSCHELEIN

*Service des Fermentations du "Centre d'Enseignement et de
Recherches des Industries Alimentaires", (C.E.R.I.A.), Bruxelles (Belgique)*

(Reçu le 2 Mai, 1959)

SUMMARY

Study of a case of deficient respiration in Saccharomyces carlsbergensis

The aerobic growth of *S. carlsbergensis* on a glucose medium is characterized by a phenomenon of diauxy. Without previous adaptation, the glucose, ethanol and acetate respiration of the yeast is feeble. This deficient respiration is adaptive. A kinetic study of the reduction of cytochrome *c*, as well as of the oxidation of the succinate in the extract reveals the site of the deficiency to be at the level of the succinic dehydrogenase. The functioning of the tricarboxylic cycle in *S. carlsbergensis* is considered to be related to the activities obtained for succinic and isocitric dehydrogenases.

INTRODUCTION

La caractérisation biochimique de *S. carlsbergensis* se base essentiellement sur la fermentation du raffinose¹. Des travaux récents consacrés au métabolisme aérobie des levures de brasserie de fermentation basse, (*S. carlsbergensis*) et des levures de boulangerie (*S. cerevisiae*), semblent indiquer qu'il existe des différences enzymatiques plus profondes entre ces deux races.

SLONIMSKI² signale qu'une levure basse utilisant au départ 80 % du glucose par voie fermentaire, ne fermente plus que 14 % du glucose consommé au bout de quelques repiquages en aérobiose.

ELION³ et EULER⁴, ont attribué à la pression d'oxygène au cours de la croissance les différences observées entre levures de brasserie et de boulangerie en ce qui concerne leur intensité de respiration et la structure du spectre des cytochromes.

FINK ET BERWALD⁵ ont décrit la "transformation" d'une levure basse en levure de boulangerie; les conditions de ces expériences ont été critiquées par SLONIMSKI².

TAVLITZKI ET SLONIMSKI⁶ émettent l'hypothèse que les levures "basses" pourraient être des lignées dérivées de la levure de boulangerie par le même mécanisme qui conduit à la formation de mutants spontanés⁷.

Ces résultats sont en faveur de l'existence d'une déficience enzymatique au niveau de la respiration chez *S. carlsbergensis*.

ALVAREZ ET WIAME⁸ ont mis un comportement métabolique analogue en évidence

chez *Brettanomyces bruxellensis*. Le faible pouvoir respiratoire de ces levures est attribué à une activité déficiente de l'acéto-CoA-kinase.

SLONIMSKI ET EPHRUSSI⁹ après une étude complète des systèmes enzymatiques de la respiration terminale ont montré que, l'incapacité respiratoire des mutants "petites colonies" est principalement due à l'absence de la cytochrome oxydase. SLONIMSKI² montre d'autre part, que ces mutants ne possèdent pas la succinique deshydrogénase.

Guidés par ces travaux, nous avons repris le métabolisme de *S. carlsbergensis* par une étude de la croissance aérobique en utilisant une levure de boulangerie et un mutant à déficience respiratoire comme témoin. Ceci nous a permis de mettre en évidence chez *S. carlsbergensis* une déficience respiratoire de nature adaptative. L'analyse des systèmes enzymatiques intervenant dans la respiration a montré que cette déficience se situe au niveau de la succinique deshydrogénase.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Microorganismes: *S. cerevisiae*: levure Royale (Bruges) isolée en culture pure ainsi que son mutant "petite colonie" isolée d'après EPHRUSSI⁷.

S. carlsbergensis: levure de brasserie de fermentation basse isolée en culture pure.

Cultures: Les milieux de culture sont les suivants: milieu glucosé: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ $2 \cdot 10^{-2}$ M; KH_2PO_4 (4 parties) et Na_2HPO_4 (1 partie) de façon à avoir PO_4 10^{-2} M; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $5 \cdot 10^{-3}$ M; yeast extract Difco 1 g/l; glucose 1.5 g/l. Milieu éthanol: même milieu mais le glucose est substitué par 0.1 % d'éthanol. Milieu acétate: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ $2 \cdot 10^{-2}$ M; KH_2PO_4 $2 \cdot 10^{-2}$ M; MgSO_4 $3 \cdot 10^{-2}$ M; yeast extract Difco 2.5 g/l; acétate de Na $3\text{H}_2\text{O}$ 2.7 g/l.

Le pH est ajusté à 4.5 avant stérilisation. Les croissances aérobiques se font à 30° dans des fioles spéciales décrites par WIAME ET STORCK¹⁰. Les opacités sont exprimées en densité optique (D.O. = $\log I_0/I$) pour une épaisseur de 1 cm. L'aération se fait par agitation des fioles sur un plateau animé d'un mouvement de translation circulaire.

Dosage du glucose: Il a été effectué suivant KEILIN ET HARTREE¹¹. L'oxygène absorbé est mesuré par la méthode manométrique de Warburg à pH 5.6 et à 30°.

Dosage de l'éthanol: Il a été effectué suivant la méthode de WIDMARCK modifiée par WINNICK'S¹² et CONWAY¹³.

Mesures manométriques: Les cellules sont récoltées en phase exponentielle de croissance; ensuite lavées 3 fois par centrifugation dans un tampon KH_2PO_4 M/15. L'oxygène absorbée est mesuré par la méthode manométrique de Warburg (v. UMBREIT et coll.¹⁴). Le volume total de liquide dans les fioles est de 2 ml. Les essais se font à 30° et à pH 4.5.

Préparation des extraits de levure: Après centrifugation et lavage, les levures sont mises en suspension dans un tampon à pH 7.3. Les cellules sont désintégrées dans un oscillateur sonique Raytheon DF/101, 250 W 10 Kc pendant 5 min à — 3°. Après centrifugation ($2,500 \times g$) on recueille le surnageant qui constitue l'extrait brut.

Préparation de l'acéto-CoA-kinase: L'enzyme est préparé suivant JONES ET COLL.¹⁵ en traitant l'extrait total obtenu après désintégration des cellules, par deux précipitations successives au sulfate d'ammonium à 35 %. Le précipité est recueilli par centrifugation à $18,000 \times g$ et remis en suspension dans un tampon phosphate M/10 à pH 7.3 (Fraction E).

Dosage de l'acétyl-CoA: Nous utilisons la méthode de TABOR¹⁶. L'acétyl-CoA formé par l'extrait de levure est transformé en *p*-nitroacétanilide par acétylation enzymatique de la *p*-nitroaniline avec modification du spectre d'absorption à 390 m μ ¹⁷.

L'enzyme d'acétylation est préparé à partir de foie de pigeon suivant TABOR¹⁶. L'unité d'enzyme est défini comme étant la quantité d'enzyme qui cause une chute initiale de la densité optique à 390 m μ de 0.001/min à 25°.

L'activité spécifique est exprimée comme étant le nombre d'unités par mg de protéines.

Analyse des cytochromes: La localisation des bandes d'absorption dues aux cytochromes est déterminée à l'aide d'un spectromètre à déviation constante (Hilger D 186) avec une lampe 30 W. On utilise des suspensions de levures à 25 % (poids humide) dans des cuvettes Unicam (1 cm). Après la mise au point visuelle on photographie les bandes sur plaques Ilford R 40 (rapid process panchromatic). Après révélation on détermine quantitativement les bandes d'absorption à l'aide d'un microphotomètre enregistreur. L'oxydation des cytochromes se fait par barbotage d'oxygène pendant 5 min. Ceci permet la disparition complète de la bande d'absorption à 550 m μ (cytochrome *c*). Cette bande est quantitativement la plus importante et nous servira de repère dans l'étude du système hémoprotéique.

Préparation et dosage de la TPN isocitrique deshydrogénase: L'enzyme est préparé suivant KORNBERG¹⁸. La fraction contenant la DPN isocitrique deshydrogénase a été éliminée par précipitation au (NH₄)₂SO₄. Ensuite à la deuxième précipitation on recueille le précipité dans un tampon phosphate 3·10⁻² M à pH 7 (fraction I).

Le DL-isocitrate est préparé à partir de la forme lactone suivant DEUTSCH ET PHILLIPS¹⁹. L'unité d'enzyme est définie comme étant la quantité d'enzyme qui réduit une μ M de TPN en 20 min en utilisant la valeur de 6.22·10⁶ cm²/mole (ouverture de fente 1.6 m μ , chemin optique 1 cm) pour le coefficient d'extinction moléculaire du TPNH²⁰.

L'activité spécifique est exprimée comme étant le nombre d'unités par mg de protéines.

Dosage des protéines: Il est effectué selon la méthode du biuret. La courbe étalon est établie avec la sérum albumine.

Produits et firmes: Coenzyme A (CoA) California foundation. Adenosine triphosphate (ATP) California foundation. Isocitrate (forme lactone) California foundation. Triphosphopyridine nucleotide (TPN) Sigma.

RÉSULTATS

Etude de la croissance aérobie

La Fig. 1 représente la croissance aérobie sur milieu glucosé. Le temps de génération "g" de *S. cerevisiae* est de 1 h 20 min. Le palier indiquant la croissance maximum est situé à une D.O. de 0.420. La courbe de croissance de *S. carlsbergensis* est caractérisé par un phénomène de diauxie. En effet, on observe une première phase exponentielle de croissance avec un "g" de 2 h 20 min; ensuite un arrêt de la croissance pendant 2 h à une D.O. de 0.085; suivi d'une seconde phase exponentielle avec un "g" de 8 h pour atteindre une croissance maximum à une D.O. de 0.330. L'arrêt de croissance après la 1ère phase exponentielle coïncide avec la D.O. maximum des mutants.

La Fig. 2 représente la croissance aérobique sur milieu à base d'éthanol ou d'acétate comme substrat carboné. On remarque que *S. carlsbergensis* utilise l'éthanol ou l'acétate avec une phase de latence de 8 h et un "g" de 7 h, alors que *S. cerevisiae* utilise ces mêmes substrats sans adaptation préalable et avec un "g" de 2 h 20 min.

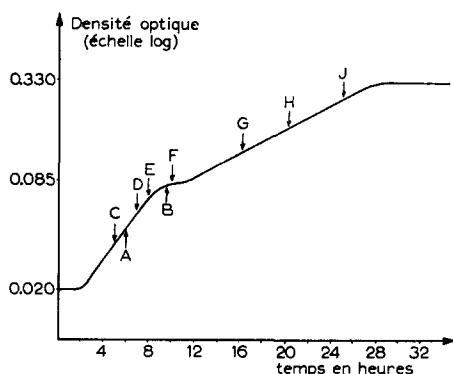
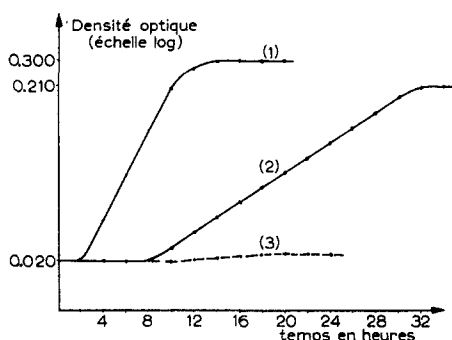
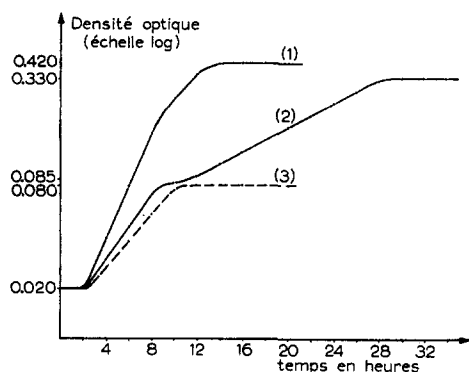


Fig. 1. Croissance aérobique sur 0.15 % de glucose (1) *Saccharomyces cerevisiae*; (2) *Saccharomyces carlsbergensis*; (3) mutant respiratoire.

Fig. 2. Croissance aérobique sur 0.1 % d'éthanol, (1) *Saccharomyces cerevisiae*; (2) *Saccharomyces carlsbergensis*; (3) mutant respiratoire.

Fig. 3. Croissance aérobique de *Saccharomyces carlsbergensis* sur glucose: A et B: dosage du glucose. C, D, E, F, G, H et J: dosage de l'éthanol.

Dans ces mêmes conditions les mutants ne donnent aucune croissance, ce qui confirme les résultats de TAVLITZKI²¹.

Ces résultats nous ont amené à doser le glucose et l'éthanol au cours de la croissance aérobique aux endroits indiqués sur la Fig. 3.

Au départ le milieu de culture contient 8.25 μ moles de glucose/ml; au point A 4.3 μ moles et au point B le glucose est complètement utilisé; au point C nous trouvons 6 μ moles d'éthanol/ml de milieu, en D 10 μ moles; en E 10.7 μ moles; en F 11.5 μ moles; en G 9.2 μ moles; en H 6.2 μ moles et en J l'éthanol est utilisé.

Considérant que 25 % du glucose est utilisé à la synthèse des polysaccharides²², il reste à la levure 6.24 μ moles de glucose à transformer en éthanol. Dans le cas où *S. carlsbergensis* métabolise le glucose exclusivement par glycolyse fermentative, on devrait trouver à la fin de la 1ère phase exponentielle de croissance 12.48 μ moles d'éthanol. Or au point F, nous obtenons 11.5 μ moles, ce qui vérifie l'hypothèse émise.

Etude du pouvoir respiratoire

La composition en sels minéraux des milieux de culture utilisés pour la récolte des cellules de levure qui serviront aux essais manométriques est la même. La con-

centration en Yeast Extract est de 0.5 % et les concentrations en substrats carbonés sont de: glucose 4 %; éthanol 1 %; acétate 0.7 %.

Respiration sur glucose, éthanol et acétate après croissance aérobie sur glucose: Les essais sont effectués avec *S. cerevisiae*, *S. carlsbergensis* et le mutant "petite". Les résultats sont exprimés dans le Tableau I.

TABLEAU I

POUVOIR RESPIRATOIRE DE *S. cerevisiae* ET *S. carlsbergensis* ET D'UN MUTANT "PETITE"

Sur: glucose 4 %, éthanol 60 μ M et acétate 60 μ M après croissance aérobie sur milieu glucosé 4 % et à 30°.

Souche de levure	QO_2 endogène	QO_2 glucose	QO_2 éthanol	QO_2 acétate
<i>S. cerevisiae</i>	7.7	79	103	87
<i>S. carlsbergensis</i>	6.0	16.2	11.1	6.0
Mutant	0.3	0.7	1.2	0.5

TABLEAU II

POUVOIR RESPIRATOIRE DE *S. cerevisiae* ET *S. carlsbergensis*

Sur: glucose 4 %; éthanol 60 μ M et acétate 60 μ M après croissance aérobie à 30° sur milieu éthanol 1 %.

Souche de levure	QO_2 endogène	QO_2 glucose	QO_2 éthanol	QO_2 acétate
<i>S. cerevisiae</i>	11	193	239	234
<i>S. carlsbergensis</i>	21.8	136	178	150

TABLEAU III

POUVOIR RESPIRATOIRE DE *S. cerevisiae* ET *S. carlsbergensis*

Sur: glucose 4 %; éthanol 60 μ M et acétate 60 μ M après croissance aérobie à 30° sur milieu acétate 0.7 %.

Souche de levure	QO_2 endogène	QO_2 glucose	QO_2 éthanol	QO_2 acétate
<i>S. cerevisiae</i>	8.8	223	211.4	226
<i>S. carlsbergensis</i>	15.4	118	115	119

Le faible pouvoir respiratoire de *S. carlsbergensis*, quoique nettement plus élevé que celui des mutants, indique que cette levure utilise le glucose principalement par fermentation. La Fig. 4 représente la cinétique de la respiration du glucose, les valeurs étant toutes rapportées au même poids sec.

Respiration sur glucose, éthanol et acétate après croissance aérobie sur éthanol et sur acétate: Les essais sont effectués avec *S. cerevisiae* et *S. carlsbergensis*. Les résultats sont exprimés dans les Tableaux II et III.

Nous remarquons une augmentation sensible du pouvoir respiratoire de *S. carlsbergensis* après croissance sur éthanol ou sur acétate comme le montre la Fig. 5.

Les valeurs de la respiration endogène sont également plus élevées, ce qui peut

s'expliquer par une accumulation de substrats intermédiaires due au fonctionnement limitant d'un des enzymes de la respiration terminale.

Evolution du pouvoir respiratoire de S. carlsbergensis au cours d'une croissance aérobique sur milieu glucosé: Les cellules sont récoltées au cours de la 1^{ère} et de la

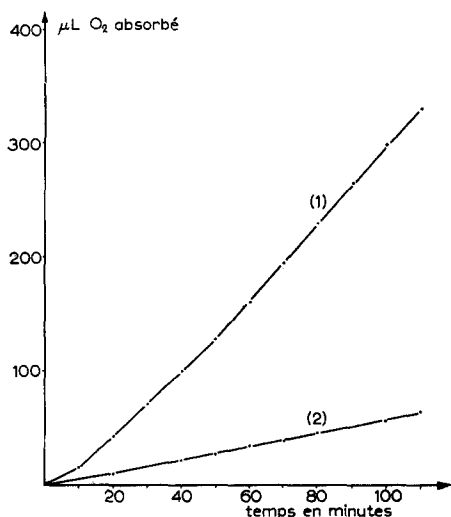


Fig. 4. Respiration sur 4 % de glucose après croissance aérobique sur glucose. Poids sec de levure: 2.5 mg, (1) *Saccharomycès cerevisiae*; (2) *Saccharomycès carlsbergensis*.

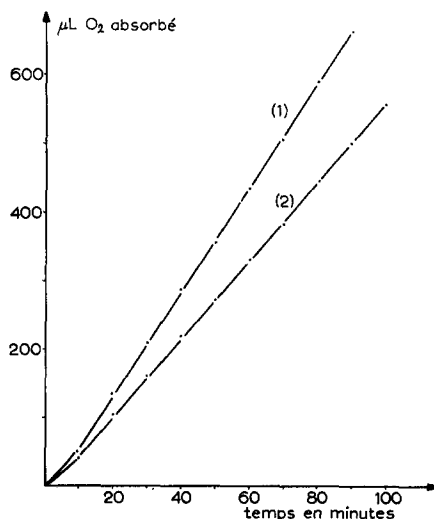


Fig. 5. Respiration sur 4 % de glucose après croissance aérobique sur éthanol. Poids sec de levure: 2.5 mg. (1) *Saccharomycès cerevisiae*; (2) *Saccharomycès carlsbergensis*.

TABLEAU IV

POUVOIR RESPIRATOIRE DE *S. carlsbergensis*

Sur: glucose 4 %; éthanol 60 μ M; acétate 60 μ M après croissance aérobique sur milieu glucosé 0.15 %; les cellules étant récoltées au cours de la 1^{ère} et de la 2^{ème} phase exponentielle de croissance.

Phase exponentielle de croissance	QO_2 endogène	QO_2 glucose	QO_2 éthanol	QO_2 acétate
I	6	16.2	11.1	6
II	14.8	83	90	85

2^{ème} phase exponentielle après croissance aérobique sur milieu glucosé 0.15 %. Les résultats sont exprimés dans le Tableau IV.

Ceci nous permet de considérer la déficience respiratoire de *S. carlsbergensis* comme étant de nature adaptative.

En effet, en récoltant ces levures au cours de la 2^{ème} phase exponentielle, ou après croissance sur éthanol ou acétate on obtient un pouvoir respiratoire se rapprochant des valeurs obtenues pour *S. cerevisiae*.

Localisation de la déficience respiratoire chez S. carlsbergensis

La mise en évidence d'une déficience respiratoire chez *S. carlsbergensis* nous a amené à étudier la nature enzymatique de cette déficience.

Nous avons admis comme hypothèse de travail que *S. cerevisiae* ainsi que *S. carlsbergensis* après adaptation empruntent le chemin du cycle tricarboxylique pour réaliser leurs oxydations cellulaires²³. Dans ces conditions le faible pouvoir respiratoire de *S. carlsbergensis* pourrait s'expliquer soit par le freinage provoqué par l'absence d'un des enzymes du cycle de Krebs soit, par le non fonctionnement du système hémoprotéique.

Activité de l'acéto-CoA-kinase: Le témoin est constitué par le système réactionnel complet à l'exception d'un des constituants suivants: enzyme d'acétylation, fraction E ou acétate de K. La concentration en acéto-CoA-kinase (fraction E) est établie de façon qu'elle soit limitante par rapport aux constituants du système complet. Les essais sont effectués avec *S. cerevisiae* et *S. carlsbergensis*. Les résultats sont exprimés dans le Tableau V.

TABLEAU V

ACTIVITÉ DE L'ACÉTO-CoA-KINASE DE *S. cerevisiae* ET *S. carlsbergensis*

Les mesures sont effectuées en cuvettes de 0.6 ml et de 1 cm de chemin optique au spectrophotomètre Unicam à la longueur d'onde de 390 m μ . Le système complet contient: tampon phosphate pH 7.3, 0.05 ml (100 μ M); *p*-nitroaniline 0.05 ml (0.05 μ M); cystéine 0.05 ml (10 μ M); acétate de K 0.05 ml (10 μ M); MgCl₂ 0.025 ml (5 μ M); ATP 0.05 ml (2.5 μ M); CoA 0.05 ml (0.1 μ M); enzyme d'acétylation 0.075 ml (0.5 mg de protéine); fraction E 0.05 ml (0.09 mg de protéine).

Souche de levure	Activité en Unités/mg de protéine	
	Croissance glucose	Croissance acétate
<i>S. cerevisiae</i>	342	923
<i>S. carlsbergensis</i>	292	638

Après croissance aérobique sur milieu glucosé, l'activité kinasique de *S. carlsbergensis* est proche de celle de *S. cerevisiae*. Cette activité est fortement accrue après croissance sur acétate.

Description et fonctionnement du système hémoprotéique: Nos mesures spectroscopiques sont effectuées avec *S. cerevisiae* et *S. carlsbergensis* avant et après adaptation à la respiration.

Nous observons les bandes d'absorption suivantes, indépendamment de la souche de levure utilisée: cytochrome *c* à 552 m μ ; cytochrome *b* à 560 m μ et cytochrome *a* à 603 m μ .

L'identification des éléments du système hémoprotéique est complétée par l'analyse de la cytochrome oxydase. Cette dernière n'ayant pas de spectre décelable, nous avons utilisé la technique employée par SLONIMSKI⁹, qui consiste à oxyder le cytochrome *c* par barbotage d'oxygène dans la suspension de levures. Le fonctionnement normal de la cytochrome oxydase provoque la disparition de la bande d'absorption à 552 m μ ²⁴.

Nous utilisons comme témoin un mutant à déficience respiratoire ne possédant pas la cytochrome oxydase⁹. Ici encore nous n'observons aucune différence entre les 2 races de levures. En effet, le spectre du cytochrome *c* disparaît complètement dans les deux cas après un barbotage d'oxygène de 5 min, alors que dans le cas du mutant on ne constate aucune modification.

Ceci nous a amené à suivre la cinétique de réduction du cytochrome *c* dès l'arrêt du barbotage d'oxygène en photographiant la bande à 552 m μ toutes les 135 sec et

en déterminant ensuite après révélation les valeurs d'absorption au microphotomètre enregistreur.

Dans ces conditions les deux races de levures se comportent d'une façon essentiellement différente, comme le montre la Fig. 6.

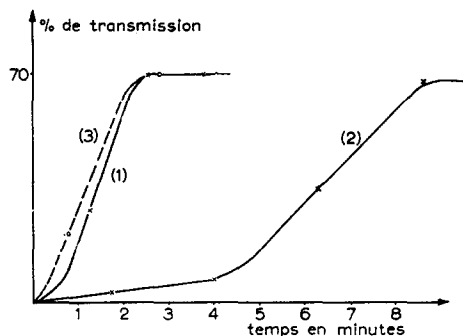


Fig. 6. Cinétique de réduction du cytochrome *c*. 0% de transmission: cytochrome *c* oxydé; 70% de transmission: cytochrome *c* réduit. (1) *Saccharomyces cerevisiae*; (2) *Saccharomyces carlsbergensis*; (3) *Saccharomyces carlsbergensis* adaptée à la respiration.

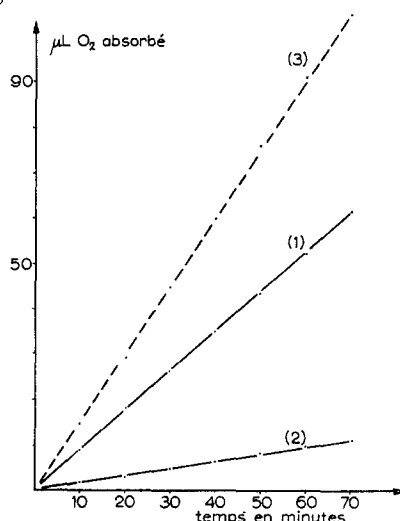


Fig. 7. Oxydation de 10 μ M de succinate en extrait (50 mg de protéine) après 12 h d'inanition des différentes levures. (1) *Saccharomyces cerevisiae*; (2) *Saccharomyces carlsbergensis*; (3) *Saccharomyces carlsbergensis* adaptée à la respiration.

En effet, *S. cerevisiae* réduit complètement le cytochrome *c* 2 min après l'arrêt du barbotage d'oxygène, *S. carlsbergensis* seulement après 8 min. Après croissance sur un substrat respiratoire *S. carlsbergensis* réduit le cytochrome *c* à la même vitesse que *S. cerevisiae*.

Considérant que la réduction du cytochrome *c* dépend principalement de l'activité de la succinique deshydrogénase, nous avons vérifié l'activité de cet enzyme par des essais d'oxydation du succinate 'in vitro'.

Oxydation du succinate en extrait: Les essais sont effectués avec *S. cerevisiae* et *S. carlsbergensis* après croissance aérobique sur milieu glucosé 2%. La respiration endogène est réduite par inanition dans un tampon phosphate *M*/15 pH 4.5 pendant 12 h à 30°.

Après centrifugation et lavage, les levures sont mises en suspension dans un tampon triéthanolamine *M*/15 à pH 7.5 contenant 0.5 *M* lactose²⁵. L'extrait total est obtenu après désintégration des cellules et centrifugation.

L'O₂ absorbé est mesuré à 30° par la méthode manométrique de Warburg. Les résultats sont exprimés dans le Tableau VI.

Ces résultats confirment ceux obtenus lors de l'étude de la cinétique de réduction du cytochrome *c*. L'arrêt de la multiplication cellulaire signalé lors de la croissance aérobique (Fig. 1) correspond par conséquent à l'adaptation à la succinique deshydrogénase qui amorce une augmentation proportionnelle du pouvoir respiratoire comme le montre le Tableau VII.

TABLEAU VI
OXYDATION DU SUCCINATE (10 μ M) EN EXTRAIT PAR *S. cerevisiae* ET *S. carlsbergensis*

Souche de levure	Mg de protéine de l'extrait	Temps d'incubation en minutes	μ l O ₂ absorbé	
			endogène	succinate
<i>S. cerevisiae</i>	61	60	14	68
		120	30	109
<i>S. carlsbergensis</i>	52	60	4	12
		120	8	15
<i>S. carlsbergensis</i> adapté	50	60	11	91
		120	17	148

TABLEAU VII
OXYDATION DU SUCCINATE ET POUVOIR RESPIRATOIRE DE *S. carlsbergensis*
AVANT ET APRÈS ADAPTATION À LA RESPIRATION

Souche de levure	Avant adaptation		Après adaptation	
	μ l O ₂ absorbé succinate	QO ₂	μ l O ₂ absorbé succinate	QO ₂
<i>S. carlsbergensis</i>	15	16	148	136

TABLEAU VIII
ACTIVITÉS DE LA TPN ISOCITRIQUE DESHYDROGÉNASE CHEZ *S. cerevisiae* ET *S. carlsbergensis*

Les mesures sont effectuées en cuvettes de quartz de 4 ml et de 1 cm de chemin optique au spectrophotomètre Zeiss PMQ II à 340 m μ . Le système complet contient: tampon phosphate pH 7 0.2 ml (100 μ M); MgCl₂ 0.1 ml (10 μ M); TPN 0.02 ml (0.5 μ M); isocitrate 0.1 ml (0.5 μ M); fraction I 1.0 ml (0.1 mg de protéine).

Souche de levure	Activité en Unités/mg protéines
<i>S. cerevisiae</i>	0.53
<i>S. carlsbergensis</i> non adapté	0.26
<i>S. carlsbergensis</i> adapté	1.57

Activité de l'isocitrique deshydrogénase: Nous nous sommes demandés si la succinique deshydrogénase était la seule deshydrogénase responsable de la déficience respiratoire de *S. carlsbergensis*.

Les activités de la TPN isocitrique deshydrogénase sont déterminées chez *S. cerevisiae* et *S. carlsbergensis* avant et après adaptation à la respiration. Les levures sont récoltées après croissance aérobie sur milieu glucosé à 2 %.

Le témoin est constitué par le système réactionnel complet sans isocitrate. La concentration en isocitrique deshydrogénase (fraction I) est établie de façon qu'elle soit limitante par rapport à la concentration en TPN et en isocitrate. Les résultats sont exprimés dans le Tableau VIII.

Ces résultats indiquent que la respiration de *S. carlsbergensis* est également freinée par l'activité de l'isocitrique deshydrogénase avant l'adaptation à la respiration. L'activité spécifique augmente environ 6 fois après adaptation.

DISCUSSION

Des résultats décrits dans ce travail, il résulte que le métabolisme aérobique de *S. carlsbergensis* est caractérisé par un phénomène de diauxie. En effet, dans des conditions où la croissance est limitée par la concentration en substrat carboné, cette levure utilise le glucose par fermentation avec accumulation d'éthanol qu'elle utilise ensuite après adaptation.

D'autre part, la vitesse de croissance sur éthanol ou acétate est la même que celle observée lors de la seconde phase exponentielle de croissance. Ces substrats ne sont utilisés qu'après une phase d'adaptation préalable explicitée par une phase de latence de 6 à 8 h.

La détermination des pouvoirs respiratoires dans les différentes conditions de croissance confirme les résultats précédents. *S. carlsbergensis* respire faiblement le glucose, l'éthanol et l'acétate au cours de la 1^{ère} phase exponentielle de croissance. Les valeurs sont cependant supérieures à celles obtenues pour les mutants.

Au cours de la seconde phase exponentielle de croissance ou après croissance sur éthanol ou acétate, le pouvoir respiratoire est rétabli et se rapproche de celui de *S. cerevisiae*.

De ce qui précède, nous pouvons déjà observer que la déficience respiratoire de *S. carlsbergensis* est de nature adaptative.

Les travaux de LINNANE ET STILL²⁶ et de VANDERWINKEL, BOURGEOIS ET WIAME²⁵ ont montré que le cycle des acides tricarboxyliques existe chez la levure et constitue probablement la voie essentielle d'oxydation.

Ceci nous a amené à admettre comme hypothèse de travail que *S. cerevisiae* ainsi que *S. carlsbergensis* après adaptation à la respiration empruntent le cycle tricarboxylique pour réaliser leurs oxydations cellulaires.

Vu l'analogie avec le comportement métabolique de *Brettanomyces bruxellensis*⁸ nous avons vérifié l'activité de l'acéto-CoA-kinase. Nous avons obtenu une activité kinasique normale chez *S. carlsbergensis* avant adaptation à la respiration ou même après croissance anaérobique.

Le fonctionnement de cet enzyme chez *S. carlsbergensis* permet d'envisager la synthèse des acides gras saturés. L'analyse spectroscopique du système hémoprotéique a montré l'existence des cytochromes *a*, *b*, *c* et de la cytochrome oxydase, indépendamment de la souche utilisée.

En suivant la cinétique de réduction du cytochrome *c* nous avons remarqué que la vitesse d'apparition du spectre du cytochrome *c* après oxydation est beaucoup plus rapide dans le cas de *S. cerevisiae*. Cette différence disparaît après croissance sur un substrat respiratoire.

Ceci nous permet de délimiter la déficience respiratoire de *S. carlsbergensis* au niveau du succinate. Ce point de vue a été entièrement confirmé par des essais d'oxydation du succinate *in vitro*.

En effet, l'adaptation à la succinique deshydrogénase se fait proportionnellement à l'adaptation du pouvoir respiratoire des cellules entières.

En examinant les valeurs des potentiels propres à chacune des deshydrogénations, WIAME²³ fait remarquer que la deshydrogénation succinique a le potentiel le plus élevé. ($E_0' = 0,00$) L'absence de la succinique deshydrogénase chez *S. carlsbergensis* n'exclut donc pas nécessairement le fonctionnement des autres deshydrogénases du

cycle. Le rôle énergétique et synthétique du cycle tricarboxylique en anaérobiose ne semble d'ailleurs pas exclu²³. AUBERT ET MILHAUD²⁷ arrivent à la même conclusion en mettant des intermédiaires du cycle de Krebs en évidence après fermentation.

Nous avons essayé de résoudre ce point en déterminant l'activité de l'isocitrique deshydrogénase.

Avant l'adaptation à la respiration nous remarquons une activité nettement supérieure à celle de la succinique deshydrogénase. Ceci semble mettre en évidence un fonctionnement partiel du cycle tricarboxylique chez *S. carlsbergensis* non adapté.

L'inversion des réactions enzymatiques avec accumulation de métabolites intermédiaires jusqu'au succinate, nous paraît justifier la valeur trouvée pour l'activité de l'isocitrique deshydrogénase.

RÉSUMÉ

La croissance aérobique de *S. carlsbergensis* sur milieu glucosé est caractérisée par un phénomène de diauxie. Cette levure respire faiblement le glucose, l'éthanol et l'acétate sans adaptation préalable. La déficience respiratoire est de nature adaptative. L'étude de la cinétique de réduction du cytochrome *c*, ainsi que de l'oxydation du succinate en extrait permet de localiser cette déficience au niveau de la succinique deshydrogénase. Le fonctionnement du cycle tricarboxylique chez *S. carlsbergensis* est considéré en fonction des activités obtenues pour la succinique deshydrogénase et l'isocitrique deshydrogénase.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ C. C. LINDEGREN, *The yeast cell, its genetics and cytology*, Educational Publishers, Saint Louis, 1949.
- ² P. SLONIMSKI, *La formation des enzymes respiratoires chez la levure*, Masson Paris, 1953.
- ³ E. ELION, *Bull. soc. chimie biol.*, 18 (1936) 165.
- ⁴ H. V. EULER, H. HELLSTRÖM ET G. GRÜNTHER, *Z. Physiol. Chem. Hoppe Seyler's*, 258 (1939) 47.
- ⁵ H. FINK ET E. BERWALD, *Biochem. Z.*, 258 (1933) 141.
- ⁶ J. TAVLITZKI ET P. SLONIMSKI, *Ann. inst. Pasteur*, 76 (1949) 510.
- ⁷ B. EPHRUSSI, H. HOTTINGER ET A. M. CHIMENES, *Ann. inst. Pasteur*, 76 (1949) 351.
- ⁸ A. ALVAREZ ET J. M. WIAME, en préparation.
- ⁹ P. SLONIMSKI ET B. EPHRUSSI, *Ann. inst. Pasteur*, 77 (1949) 47.
- ¹⁰ J. M. WIAME ET R. STORCK, *Biochim. Biophys. Acta*, 10 (1953) 268.
- ¹¹ D. KEILIN ET E. F. HARTREE, *Biochim. J.*, 42 (1948) 230.
- ¹² T. H. WINNICK'S, *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, 14 (1942) 523.
- ¹³ E. J. CONWAY, *Microdiffusion analysis and volumetric error*, Crosby Lockwood, 1947.
- ¹⁴ W. UMBREIT, *Manometric Techniques and tissue metabolism*, Burgess Publishing, 1951.
- ¹⁵ M. E. JONES, R. M. BLACK, W. FLYNN ET F. LIPMANN, *Biochim. Biophys. Acta*, 12 (1953) 141.
- ¹⁶ H. TABOR, A. H. MEHLER ET E. R. STADTMAN, *J. Biol. Chem.*, 204 (1953) 127.
- ¹⁷ A. ALVAREZ, E. VANDERWINKEL ET J. M. WIAME, *Biochim. Biophys. Acta*, 28 (1958) 333.
- ¹⁸ A. KORNBERG ET E. W. PRICER JR., *J. Biol. Chem.*, 189 (1951) 123.
- ¹⁹ D. H. DEUTSH ET R. E. PHILLIPS, *Methods in Enzymol.*, 3 (1957) 421.
- ²⁰ B. L. HORECKER ET A. KORNBERG, *J. Biol. Chem.*, 175 (1948) 385.
- ²¹ J. TAVLITZKI, *Ann. inst. Pasteur*, 76 (1949) 497.
- ²² CH. A. MASSCHELEIN, A. DEVREUX ET A. MESHKI, 28ème Congrès International de Chimie Industrielle, Madrid, 1955, p. 41.
- ²³ J. M. WIAME, *Advances in Enzymol.*, 18 (1957) 241.
- ²⁴ L. SMITH, *Arch. Biochem.*, 50 (1950) 288.
- ²⁵ E. VANDERWINKEL, S. BOURGEOIS ET J. M. WIAME, *Arch. intern. physiol. et biochim.*, 66 (1958) 129.
- ²⁶ A. W. LINNANE ET J. L. STILL, *Arch. Biochem. Biophys.*, 59 (1955) 383.
- ²⁷ J. P. AUBERT ET G. MILHAUD, *Ann. inst. Pasteur*, 90 (1956) 320.