

COMPOSITION CHIMIQUE DE LA PAROI D'UNE LEVURE DU GENRE *TORULOPSIS* APRES CULTURE SUR METHANOL ET ETHANOL

J. B. LELEU, J. P. MORILHAT et R. BONALY

Biochimie microbienne, Université de Nancy I, 5 rue Albert Lebrun, 54000 Nancy, France

(Received 28 January 1977)

Key Word Index—*Torulopsis*; yeast; cell wall composition; chitin; mannans; carbon source.

Abstract—The nature of the carbon source, methanol or ethanol, influences the cell wall composition of the same strain of yeast. Chemical treatment of the cell walls with ethylenediamine indicates that the parietal architecture varies. The analysis of amino acids, sugars and hexosamines reveals quantitative differences with a modification of the elaboration of the polymers. The methanol source favours the synthesis of chitin and mannan polymers, while the ethanol source favours the elaboration of glucan and glucomannan polymers. The chitin percentage rises in a ratio from 1 to 5 and simultaneously the protein percentage rises from 1 to 1.7; consequently the culture on methanol favours the formation of nitrogen compounds.

INTRODUCTION

Face au déficit mondial de la production de protéines consommables, accentué ces dernières années, certaines levures ont été considérées comme une source de matière protéique intéressante. Cependant, l'incorporation de ces levures, cultivées sur des substrats divers, dans l'alimentation humaine et animale, pose des problèmes de digestibilité.

En effet, la paroi de la cellule de levure semble être un obstacle à la pénétration des enzymes digestives dans le cytoplasme cellulaire et serait responsable de la faible digestibilité des protéines intracellulaires lorsque les cellules sont ingérées intactes dans le tractus des vertébrés. L'idéal serait d'obtenir des cellules possédant une paroi la plus fragile possible de façon à être facilement digérée.

Les procédés physico-chimiques ou enzymatiques utilisés au laboratoire pour attaquer les parois ne peuvent être appliqués au niveau industriel du fait de leur action lente ou de leur coût élevé.

Aussi, le problème peut être résolu en se basant soit sur l'isolement de cellules mutantes à paroi fragile [1],

soit en mettant à profit le fait que le milieu de culture des cellules influe sur la constitution de leur paroi. C'est dans ce but que nous avons étudié les différences pariétales chez une même souche cultivée sur deux substrats économiquement intéressants pour l'industrie: l'éthanol et le méthanol.

RÉSULTATS

Pour les deux lots d'une levure du genre *Torulopsis* cultivés sur éthanol et méthanol, la teneur en parois est identique et égale à 18% de la masse de levure lyophilisée, sèche, traitée. Nous n'avons pas noté de différence sensible dans le comportement des deux lots lors du broyage des cellules.

Le Tableau 1 rassemble les résultats de l'analyse globale des parois, effectuée après hydrolyse et attaque enzymatique. Des cinétiques d'hydrolyse ont permis de déterminer les temps d'hydrolyse permettant une libération maximale des divers constituants: 2 hr pour les oses, 12 hr pour les hexosamines et 24 hr pour les amino acides. L'identification des hexosamines, effectuée sur

Tableau 1. Composition chimique des parois

Milieu	Methanol			Ethanol		
Méthode d'hydrolyse	Hydrolyse HCl*	Hydrolyse HCl†	Traitement enzymatique	Hydrolyse HCl*	Hydrolyse HCl†	Traitement enzymatique
Hexoses	52,2	63,8	63‡	577	80,4	70‡
Estimation des acides aminés	16,6	20,3	10§	9,7	13,7	3,3
Hexosamines	11,4	13,9	7	3,3	4,6	2,4
PO ₄ ³⁻	1,6	1,9	—	0,9	1,3	—
Total	81,8	99,9	80	70,9	100	75,7

* Résultats exprimés en % de la masse de parois traitées; † Résultats exprimés en % de la masse de parois effectivement hydrolysées; ‡ Après action de la β glucannase; § Après action de la pronase; || Après action du suc d'*Helix pomatia* Valeur correspondant à la N-acétyl-glucosamine.

Tableau 2. Analyse qualitative des amino acides des parois

Amino acides	P.M.	sur méthanol		sur éthanol	
		% Molaire	µg/mg	% Molaire	µg/mg
Ac. aspartique	133	10,8	14,6	8,8	8,1
Thréonine	119	12,7	15,5	26,4	21,8
Sérine	105	7,8	8,4	9,4	6,6
Ac. glutamique	147	8,8	13,2	9,9	10,1
Proline	115	5,9	6,9	6,3	5,1
Glycine	75	7,8	6,0	5,9	3,1
Alanine	89	8,3	7,6	6,9	4,3
Valine	117	7,8	9,4	8,3	6,8
Cystéine	120	—	—	1,7	1,4
Méthionine	149	1,0	1,5	—	—
Isoleucine	131	3,4	4,6	3,2	2,9
Leucine	131	6,9	9,2	2,9	2,6
Tyrosine	181	3,4	6,3	2,4	3,1
Phénylalanine	165	4,4	7,4	2,6	3,0
Lysine	146	5,9	8,8	3,5	3,5
Histidine	155	2,0	3,1	0,7	0,7
Arginine	174	3,0	5,2	1,0	1,1
Méthionine-sulfone		traces		traces	
Ornithine		traces		traces	

un autoanalyseur Technicon, n'a permis de déceler que la présence de glucosamine pour les deux cultures. Les quantités de glucosamine libérées après hydrolyse chlorhydrique et *N*-acétyl-glucosamine libérées après action du suc d'*Helix pomatia* étant identiques, ceci signifie que toute la glucosamine présente dans les parois se trouve sous la forme *N*-acétylée. La culture sur milieu éthanol conduit à des cellules ayant des parois plus riches en hexoses et plus pauvres en hexosamines et protéines que la culture sur milieu éthanol.

La détermination des sucres ne fait cependant pas apparaître de différence quant à la nature et à la répartition de ceux-ci. En effet l'analyse chromatographique révèle pour les deux lots, la présence de glucose et mannose dont le rapport molaire glucose/mannose est de 1 pour les cellules cultivées sur méthanol et de 1,1 pour les cellules cultivées sur éthanol.

L'examen de la composition en amino acides de la fraction protéique des parois donne les résultats rapportés dans le Tableau 2. Si la teneur globale de la fraction protéique de la paroi de levure varie selon le substrat, il en est de même de la composition en amino acides de cette fraction. La culture éthanolique conduit à des parois possédant une très forte proportion de thréonine et une plus faible proportion d'acides aminés basiques et aromatiques par rapport à la culture méthanolique. Notons aussi la présence de méthionine pour la culture sur méthanol et celle de la cystéine pour la culture sur éthanol.

Tableau 3. Quantités de fractions A, B et C recueillies après traitement des parois par l'éthylène diamine

Culture fractions	Méthanol	Ethanol
A	45,1	32,6
B	5	17,2
C	47,8	38,7
Total	97,9	88,5

Les résultats sont exprimés en % de fractions obtenues.

Fractionnement des parois

Les analyses précédentes se rapportant aux parois entières révèlent une composition chimique différente sans préciser quels sont les constituants macromoléculaires modifiés. Nous avons clivé celles-ci par traitement à l'éthylène diamine et effectué les analyses chimiques des fractions obtenues. Le clivage par l'éthylène diamine nous a permis d'obtenir trois fractions A, B et C dont les teneurs respectives sont rassemblées dans le tableau 3. Le résidu solide constituant la fraction C présente encore, à l'examen microscopique, l'aspect de paroi.

Nous obtenons pour la levure cultivée sur éthanol, une teneur en fraction B environ 3,5 fois plus élevée que pour la culture sur substrat méthanol. Les fractions A et C sont plus faibles pour la culture éthanolique mais le rapport Fr A/Fr C reste sensiblement identique pour les deux substrats. La paroi de la souche cultivée sur méthanol qui est la plus riche en matière protéique, possède la fraction A la plus importante. Ce fait a déjà été rapporté par Bonaly *et al.* [2] Ces différences dans le mode de clivage mettent en évidence des architectures différentes entre les deux lots de parois.

Etude analytique des fractions A, B et C

L'étude comparative des différentes fractions entre elles respectivement pour les teneurs en hexoses, protéines et hexosamines, donne les résultats rapportés dans le tableau 4. Les résultats confirment les analyses effectuées sur les parois totales. Nous retrouvons en effet, pour la culture sur éthanol, un déficit protéique compensé par une teneur plus élevée en oses. Des différences importantes entre les deux cultures se situent également au niveau des fractions B et de la répartition des monomères glucose et mannose dans les fractions. En effet, si du point de vue protéique, les fractions B des deux cultures comportent la même quantité d'acides aminés, soit 1,3 % de la paroi pour le substrat méthanol et 1,4 % de la paroi pour le substrat éthanol, il y a une différence très importante au niveau glucidique. La fraction méthanol comporte 3,3 % des oses pariétaux tandis que la fraction éthanol en comporte 15,8 %.

Tableau 4. Composition chimique des fractions A, B et C

Fraction	Constituants	Culture sur methanol	Culture sur ethanol
A	Hexoses Teneur	50,6	58,9
	Glucose	0,7	0,3
	Mannose		
	Protéines	46,2	39,2
	Hexosamines	3,1	1,9
B	Hexoses Teneur	66,1	91,7
	Glucose	1,4	6
	Mannose		
	Protéines	25,8	8,2
	Hexosamines	8,0	traces
C	Hexoses Teneur	68,4	79,6
	Glucose	1,7	4
	Mannose		
	Protéines	10,1	6,7
	Hexosamines	21,4	13,7

Résultats exprimés en pourcentage du poids des fractions hydrolysées.

Quant à la répartition des monomères glucose et mannose les rapports molaires démontrent une différence dans le mode d'association de ces deux hexoses dans les trois fractions entre les deux cultures. Nous observons une concentration nette de mannose dans les fractions A, ce qui atteste la présence de mannanes solubles dans les alcalis, Northcote et Horne [3]. Dans les fractions B et C le glucose prédomine. Cependant, alors que les rapports glucose/mannose varient d'un facteur de 2 à 2,5 entre les diverses fractions de la culture sur méthanol, ils varient d'un facteur de 13 et de 20, entre les fractions de la culture sur éthanol. Il apparaît ainsi que la culture sur méthanol favorise la biosynthèse de polymères de type gluco-mannanes tandis que la culture sur éthanol favorise la biosynthèse de glucannes.

Les teneurs en hexosamines diffèrent également beaucoup dans les fractions C. La fraction C 'méthanol' comprend deux fois plus d'hexosamines que la fraction C 'éthanol' soit 10,2 % de la masse pariétale contre 5,3 %. Nous avons donc voulu isoler ces hexosamines et avons préparé les sous-fractions Ct selon le protocole de Moulki et Bonaly [4] qui permet d'identifier la chitine des parois en se basant sur des critères d'insolubilité de cet aminopolysaccharide proposés par Houwink et Kreger [5].

Les fractions Ct obtenues représentent respectivement pour les cultures sur méthanol et éthanol, 7,3 et 6,2 % de la masse pariétale et contiennent respectivement 73 % et 25 % de glucosamine. D'autre part, le traitement de ces sous-fractions Ct par le suc d'*Helix pomatia* libère les mêmes quantités de N-acétylglucosamine. Ceci nous amène à penser que ces molécules de N-acétylglucosamine se trouvent polymérisées sous forme de chitine. L'analyse des fractions Ct aux rayons X permet de vérifier la présence de cet aminopolysaccharide. Nous aurions donc pour la culture sur méthanol, une teneur en chitine pariétale de 5 à 6 % et pour la culture sur éthanol, une teneur de 1 à 1,5 %, le reste des hexosamines ne se trouvant pas sous forme de chitine type.

DISCUSSION

Plusieurs études ont déjà été effectuées pour mettre en évidence l'influence du milieu de culture sur la structure pariétale des levures. Ainsi, McMurrough *et al.* [6] ont mis en évidence les modifications pariétales de *Saccharomyces cerevisiae* selon la richesse du milieu nutritif en source carbonée ou azotée. De même, Bonaly *et al.* [2] ont montré l'incidence de la composition du milieu de culture sur la paroi de levures du genre *Rhodotorula*. La présente étude confirme l'importance du rôle joué par le milieu de culture sur les structures pariétales, et démontre que les cellules d'une même souche cultivées sur méthanol ou éthanol ne synthétisent pas leur paroi de façon identique.

La culture sur méthanol favorise la formation de dérivés chitineux ainsi que de constituants protéiques au détriment des oses ; Ceux-ci se présentent sous forme d'hétéropolymères à base de glucose et mannose à parties égales. La culture sur éthanol favorise la formation de glucopolymères : glucomannanes (fraction A), et glucannes les teneurs en matières protéiques, hexosamine et chitine étant faibles.

Toute la glucosamine présente dans les parois n'entre pas dans la chitine, aussi peut-on penser que les liaisons copule-glucidique copule-protéique font intervenir la glucosamine qui serait impliquée dans une liaison soit O-glycosidique, soit ester, soit N-acétylglucosamine. Les rapports taux de matière protéique/taux de glucosamine sous forme non chitineuse, sont voisins et égaux à 3 pour la culture méthanolique et 3,5 pour la culture éthanolique.

Le fractionnement chimique démontre que, après culture des cellules sur milieu méthanolique les parois possèdent un squelette présentant une trame importante de chitine associée à des éléments protéiques et glucidiques de type mannoglucanne. Après culture sur milieu éthanolique le squelette est formé de glucannes et d'un peu de chitine associés à des parties glucidiques et protéiques.

Une souche de levure ne peut donc être cultivée sur divers substrats sans variation dans la constitution de la paroi. Ce phénomène peut être exploité pour supprimer ou atténuer la présence de composés indésirables qui peuvent interférer lors de la digestion des cellules par les vertébrés. Les résultats d'une telle étude devraient être mis en parallèle avec les résultats de tests de digestibilité afin de préciser des interférences sur la valeur nutritive.

PARTIE EXPERIMENTALE

Matériel. Nous disposons de deux lots d'une souche de levure du genre '*Torulopsis*' provenant de la culture en continue dans deux substrats carbonés-méthanol et éthanol.

Obtention des parois. Les parois sont préparées conformément à la technique utilisée dans notre laboratoire [2]. Les cellules de levure, lyophilisées, sont mises en suspension dans l'eau distillée puis broyées à l'aide d'un broyeur à billes réfrigéré M.S.K. (Braun-Melsungen). Les broyats sont repris à Me₂CO pour éliminer les lipides puis lavés par le mélange Et₂O de pétrole sulfurique pour éliminer les éventuels pigments caroténoïdes. L'élimination totale des débris membranaires est assurée par traitement au phosphate disodique et à la trypsine. De nombreux lavages ultérieurs à l'eau distillée permettent d'obtenir des parois propres qui sont conservées lyophilisées.

Dissociation des polymères pariétaux. Les parois lyophilisées se présentant sous forme d'agréats, il est très difficile de les

mettre et de les maintenir en une suspension homogène. Toute étude nécessite donc une mise en solution préalable afin de pouvoir appliquer les diverses techniques analytiques sur des prises d'essais aussi homogènes que possible. Le clivage des parois est obtenu par hydrolyse acide effectuée par HCl 6N et 2N en tubes scellés à 105° en respectant les conditions préconisées par Montreuil et Spick [7].

Méthodes analytiques. Le dosage des oses neutres est effectué par les réactions à l'orcinol sulfurique [8] et à l'anthrone sulfurique [9] sur des hydrolysats obtenus par HCl 2N. Une détermination du rapport molaire des oses constitutifs de la paroi par chromatographie sur papier, selon la technique de Date [10], doit être effectuée avant le dosage (solvant: EtOAc-Py-H₂O; 2:1:2). Révélateur: citrate d'aniline. Les hexosamines sont dosées par la méthode d'Elson-Morgan selon le protocole décrit par Ghuysen, *et al.* [11] après une hydrolyse par HCl 6N à 105°. L'identification de ces composés est réalisée sur un auto-analyseur Technicon selon le procédé de Monsigny [12]. La teneur en fraction protéique est estimée par la réaction avec le 2-4 dinitrofluorobenzène [13] après hydrolyse par HCl 6N à 105° pendant 24 hr, les amino acides étant déterminés et dosés par chromatographie à l'autoanalyseur Technicon selon le procédé général de Piez et Morris [14].

Traitement des parois par l'éthylène diamine. L'action d'agents chimiques alcalins et acides pour cliver les parois est trop brutale pour l'obtention de composés suffisamment polymérisés permettant d'aborder une étude structurale. Nous avons préféré l'action de l'éthylène diamine qui permet de cliver la paroi en trois fractions: A, B et C comme le préconisent Korn et Northcote [15]. Ces trois fractions répondent aux critères de solubilité suivants: la fraction A est soluble dans l'éthylène diamine et l'eau distillée, la fraction B est soluble dans l'éthylène diamine et insoluble dans l'eau distillée, la fraction C est insoluble dans l'éthylène diamine et l'eau distillée.

Détermination de la chitine. La chitine des parois est isolée à partir de la fraction C résultant du traitement à l'éthylène diamine. La caractérisation est basée sur les critères d'insolubilité dans une solution de HCl 3% et de NaOH 3% comme décrit par Houwink et Kreger [5].

Traitements enzymatiques. Les parois ont été soumises à divers traitements enzymatiques effectués à 38° sous agitation constante. Action du suc d'*Helix pomatia* et de la β glucannase (grünsted) dans un milieu réactionnel en tampon acétate de sodium 0,1 molaire ajusté à pH = 5,5 en présence d'auréomycine à 5% (16). Action de la pronase (Calbiochem) en tampon acétate de calcium 0,01 M ajusté à pH = 8 par Na OH et sous toluène.

Acknowledgements—Nous remercions l'Institut Français du Pétrole et la Société ELF-ERAP pour l'aide apportée à la réalisation de ce travail.

REFERENCES

1. Liarada, Y., Ono, J. et Nagasawa, T. (1972) *Fern. Tech. Proc. Int. Fern. Symp. 4th Kyoto*.
2. Bonaly, R., Moulki, H., Benjelloun, A. T. et Pierfitte, M. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* **244**, 484.
3. Northcote, D. H. et Horne, R. W. (1951) *Biochem. J.* **51**, 232.
4. Moulki, H. et Bonaly R. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* **338**, 120.
5. Houwink, A. L. et Kreger, D. R. (1953) *Antonie van Leeuwenhoek* **3**, 1.
6. McMurrough, I. et Rose, A. M. (1976) *Biochem. J.* **105**, 189.
7. Montreuil, J. et Spick G. (1968) Microdosage des glucides, monographie n°2. Lille, Faculté des Sciences.
8. Rimington, C. (1940) *Biochem. J.* **34**, 931.
9. Dreywood, R. (1946) *Ind. Eng. Chem. Anal.* **18**, 499.
10. Date, J. W. (1958) *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **10**, 149.
11. Ghuysen, J. M., Tipper, D. J. et Strominger, J. L. (1966) *Methods Enzymology* **8**, 685.
12. Monsigny, M. (1969) *Bull. Soc. Chim. Biol.* **51**, 1263.
13. Ghuysen, J. M., Tipper, D. J., Birge, C. H. et Strominger, J. L. (1965) *Biochem. J.* **4**, 2245.
14. Piez, K. A. et Morris, L. (1960) *Anal. Biochem.* **1**, 187.
15. Korn, E. D. et Northcote, D. H. (1960) *Biochem. J.* **75**, 12.
16. Eddy, A. A. *Proc. Roy. Soc. B.* **149**, 425.