

LBIR1250 : RAPPORT DE LABORATOIRE N° 3

CATABOLISME DES GLUCIDES CHEZ LA LEVURE



Année Académique 2017-2018
Groupe 8

*Santacatterina Simon
Moumneh Ramy
Watchueng Tchekam Mikhail*

1 Introduction

Ce laboratoire porte sur le catabolisme glucidique des levures. Premièrement les taux de production de dioxyde de carbone seront mesurées suite à l'ajout de différents glucides. Ensuite, l'effet inhibiteur de la glycolyse de la respiration ainsi que celui du PH seront testés.

2 Mode Opératoire

Les protocoles de la séance de laboratoire sont présent sur les figures 1 et 2.

Solution	1	2	3	4	5	6	7	8
Levure (5%) 2 min à 100°C [ml]	0							5
Glucose 2,5% [ml]	0	5	0				5	0
Galactose 2,5% [ml]	0		5	0				
Maltose 2,5% [ml]	0			5	0			
Saccharose 2,5% [ml]	0				5	0		
Lactose 2,5% [ml]	0					5	0	
eau 2,5% [ml]	10	5						
Levure (5%) [ml]	5							0
Glucose [ml]	0							5
Agitez								
Incubation [°C]	37						4	37
temps [min,sec]	0,00	0,30	1,00	1,30	2,00	2,30	3,00	3,30
Volume (d'air) initial [ml]	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
temps [min,sec]	20,00	20,30	21,00	21,30	22,00	22,30	23,00	23,30
Volume [ml]	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	3,5	1,5	1,5
temps [min,sec]	40,00	40,30	41,00	41,30	42,00	42,30	43,00	43,30
Volume [ml]	1,5	5	1,5	4	5	3,5	1,5	1,5
temps [min,sec]	60,00	60,30	61,00	61,30	62,00	62,30	63,00	63,30
Volume [ml]	1,5	7,4	1,5	6,5	7,25	3,5	1,5	1,5

FIGURE 1 – Protocole pour essai blanc et essais pour différents sucres et pour différentes conditions expérimentales

Solution	9	10	11	12
Levure 5% [ml]	5			
NaN ₃ 1M [μl]	0	15	0	
NaF 1M [μl]	0		750	0
HCl 1M [ml]	0			2
Incubation 5 min [°C]	37	37	37	37
Eau [ml]	5	4,985	4,25	3
Agitez				
Glucose 2,5% [ml]	5			
temps [min,sec]	0,00	0,30	1,00	1,30
Volume (d'air) initiale [ml]	1,5	1,5	1,5	1,5
temps [min,sec]	20,00	20,30	21,00	21,30
Volume [ml]	4,6	1,5	1,5	1,5
temps [min,sec]	40,00	40,30	41,00	41,30
Volume [ml]	4,6	5	1,5	1,5
temps [min,sec]	60,00	60,30	61,00	61,30
Volume [ml]	7	3,5	1,5	1,5

FIGURE 2 – Protocole pour essai blanc et essais avec glucose en présence de différents inhibiteurs

3 Mesures et graphes

Les mesures des graduations mesurées au niveau du tube à essai (à l'envers) sont reprises dans les tables 1 et 2.

Essai	Tube 1	Tube 2	Tube 3	Tube 4	Tube 5	Tube 6	Tube 7	tube 8
Volume initial [mL]	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Volume après 20 min [mL]	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	3.5	1.5	1.5
Volume après 40 min [mL]	1.5	5	1.5	4	5	3.5	1.5	1.5
Volume après 60 min [mL]	1.5	7.4	1.5	6.5	7.25	3.5	1.5	1.5

TABLE 1 – Tableau reprenant les volumes observés sur les tubes à essais au cours du temps pour les différentes réaction de glycolyse

Essai	Tube 1 (Blanc)	Tube 2 (NaN ₃)	Tube 3 (NaF)	Tube 4 (HCl)
mesure initiale	1.5	1.5	1.5	1.5
mesure 1	4.6	1.5	1.5	1.5
mesure 2	4.6	1.5	1.5	1.5
mesure 3	7	3.5	1.5	1.5

TABLE 2 – Tableau reprenant les volumes observés sur les tubes à essai au cours du temps pour les différentes réactions entre le glucose et la levure en présence d'inhibiteur

4 Calculs et résultats

4.1 Utilisation des sucres

4.1.1 Calculs

Pour calculer les volumes de CO_2 produits il suffit de faire la différence entre les volumes au temps t_{n+1} et au temps t_n :

$$V_{produit} = \Delta V = V_{n+1} - V_n$$

Pour le taux de production de CO_2 il suffit de prendre le volume de CO_2 pendant un intervalle de temps et de le diviser par ce même intervalle soit :

$$taux_{CO_2} = \frac{\Delta V}{\Delta t}$$

Pour illustrer cela, il suffit de prendre l'exemple du saccharose et de calculer le volume de CO_2 produit et le taux de production sur l'ensemble de la réaction durant une heure, ceci avec l'aide des données des mesures prises dans la table 3 :

$$V_{produit} = \Delta V = 7.25 - 1.5 = 5.75ml$$

$$taux_{CO_2} = \frac{5.75ml}{1h} = 5.75[ml/h]$$

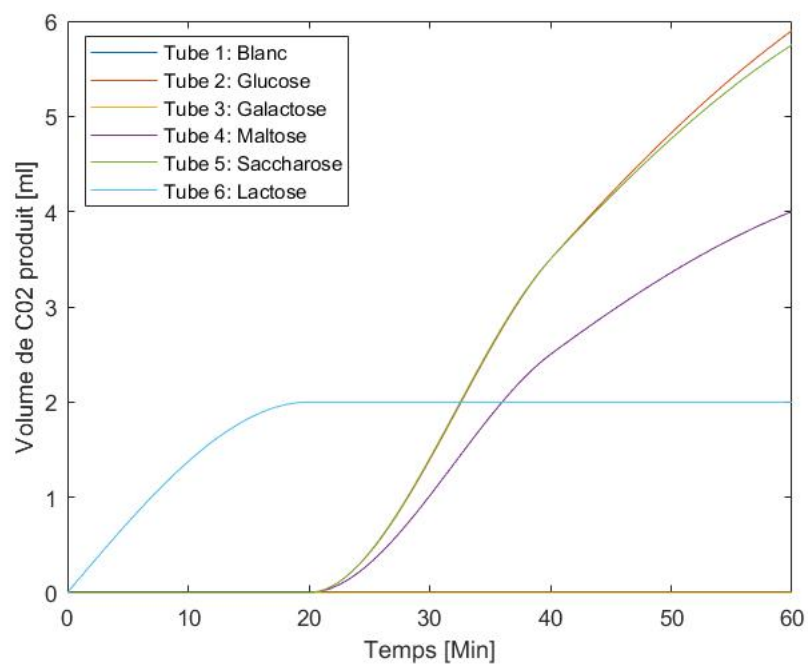


FIGURE 3 – Courbes de production de CO_2 sans inhibiteur pour différents sucres

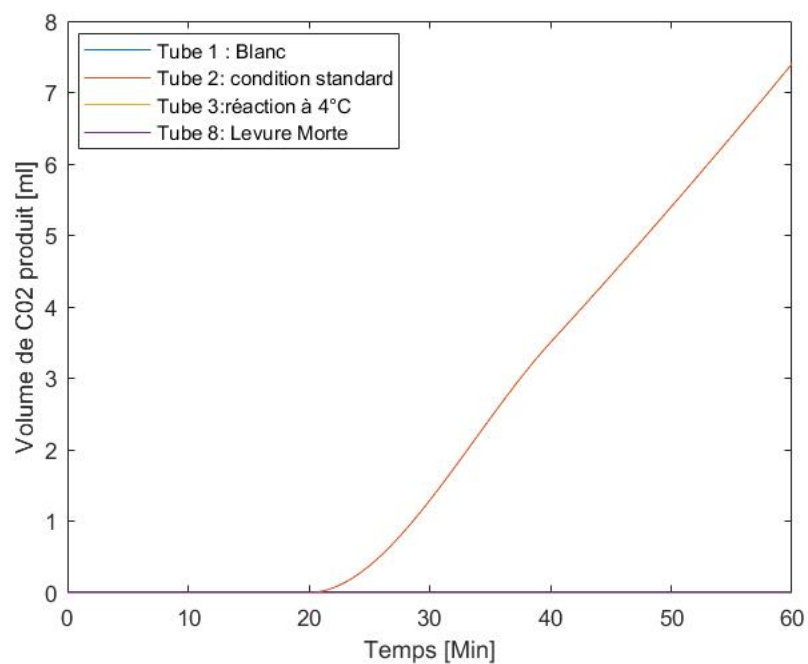


FIGURE 4 – Courbes de production de CO_2 sans inhibiteur pour différentes conditions expérimentales

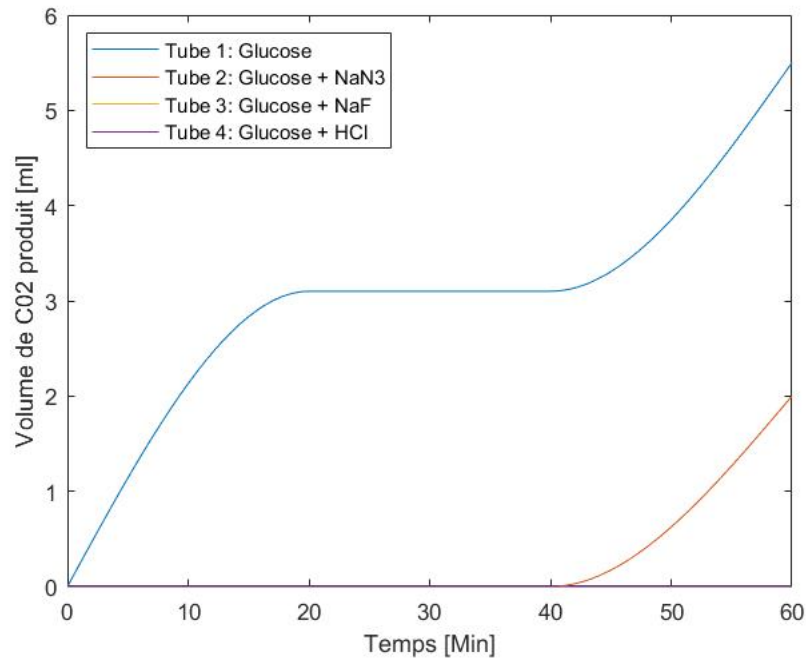


FIGURE 5 – Courbes de production de CO_2 pour le glucose avec inhibiteur

Tube	Volume final [ml]	Volume initial [ml]	Δ volume de CO_2 [ml]	Taux de production de CO_2 [ml/h]
1 Blanc	1.5	1.5	0	0
2 Glucose	7.4	1.5	5.9	5.9
3 Galactose	1.5	1.5	0	0
4 Maltose	6.5	1.5	6	6
5 Saccharose	7.25	1.5	5.75	5.75
6 Lacatose	3.4	1.5	1.9	1.9
7 Glucose (4C)	1.5	1.5	0	0
8 Glucose (levure morte)	1.5	1.5	0	0

TABLE 3 – Tableau reprenant les quantités de CO_2 produites lors de la réaction entre les sucres et la levure dans différentes conditions expérimentales sans inhibiteurs.

4.1.2 Résultats

4.2 Inhibition de la production de CO_2

4.2.1 Calculs

Les calculs sont les mêmes que pour la partie sans inhibiteurs.

4.2.2 Résultats

Tube	Volume final [ml]	Volume initial [ml]	Δ de volume de CO_2 [ml]	Taux de production de CO_2 [ml/h]
1 Glucose	7	1.5	5.5	5.5
2 Glucose + NaN_3	3.5	1.5	2	2
3 Glucose + NaF	1.5	1.5	0	0
4 Glucose + HCl	1.5	1.5	0	0

TABLE 4 – Tableau reprenant les quantités de CO_2 produites lors de la réaction entre les sucres et la levure dans différentes conditions expérimentales en présence d'inhibiteurs.

5 Réponses aux questions

Quel est l'effet d'une diminution de température sur l'utilisation du glucose ? L'effet d'une diminution de la température peut être observée sur la figure 4. La courbe rouge montre le résultat lors des conditions standards ($37^\circ C$) et la courbe jaune, confondue avec l'axe des abscisses, le résultat sous $4^\circ C$. On observe qu'à $37^\circ C$ on obtient au final 7.25 ml tandis que la production est nulle sous $4^\circ C$. La diminution de la température va donc modifier l'activité des enzymes présentes au sein de la levure que ce soit pour la respiration ou la fermentation. Ceci va induire une diminution des deux réactions et donc de la production de CO_2 .

Quel est l'effet de l'acidification sur le catabolisme du glucose ? L'acidification est engendrée lors de l'ajout d'HCl à la solution. Comme observé sur la figure 5, suite à cet ajout le volume produit est alors nul (confondu avec l'axe des abscisses). Ceci veut dire que le glucose n'a pas été catalysé par les enzymes de la levure. Ceci probablement dû au fait que la réaction se déroule sous un pH défavorable à ces activités enzymatiques.

Quels sont les effets du NaF et du NaN_3 sur le catabolisme glucidique ? Quels sont leurs modes d'action ? Sous l'action du NaF le volume de CO_2 produit est nul. Ceci indique que ni la fermentation ni la respiration n'ont lieu. Le blocage par cet inhibiteur s'effectue donc en amont. Le NaF est en fait un agent antiglycolytique, il agit sur une enzyme de la glycolyse. Dès lors, les cellules ne peuvent utiliser le glucose.

Pour NaN_3 seule la fermentation a lieu comme observé sur la figure 5. On voit alors clairement que par rapport au glucose, qui est l'étalon, uniquement la deuxième partie de la courbe correspondant à la fermentation est présente. Le CO_2 produit est alors d'environ 2mL comparé au 5mL du glucose seul. On en déduit que l'inhibiteur agit seulement sur la respiration.

Commentez l'utilisation des glucides par la levure. Le glucose est le réactif de base des deux réactions de respiration et de fermentation chez la levure. C'est pour le glucose que la production de CO_2 est maximale. Le raisonnement est de détecter si les autres glucides peuvent être importés dans la cellule et dégradés sous forme de glucose.

- Le galactose : le transporteur de galactose n'est pas exprimé chez la levure. Elle possède un transporteur mais qui n'est pas exprimé dans notre expérience. Donc pas de CO_2 produit.
- Lactose : Pas de CO_2 car pas de gène nécessaire pour faire rentrer le lactose dans la cellule et ensuite le métaboliser. Les résultats montrent le contraire, probablement dû à une erreur de manipulation expérimentale car la courbe n'augmente plus après la première mesure.
- Saccharose : la cellule possède les transporteurs pour, elle peut le dégrader en glucose et fructose. Le glucose subit alors la respiration et la fermentation. Le CO_2 produit en présence de saccharose est élevé et vaut 5.75 mL.
- Maltose : le maltose est composé de deux molécules de glucose. La cellule peut donc importer le maltose et le dégrader. L'efficacité plus faible de maltose est probablement dû à sa plus grande taille, le rendant plus difficile à importer.

D'après vos observations, dites l'état physiologique des cellules de levures (fermentation ou respiration). Cela vous semble-t-il cohérent avec le matériel cellulaire La fermentation produit une plus faible quantité de CO_2 que la respiration et elle s'opère une fois que le dioxygène est épuisé. Sur la figure 3, les pentes de

production de volume de CO_2 diminuent après un certain interval de temps pour le glucose, maltose et saccharose. Ce qui permet de déduire que l'état physiologique est la respiration au début de l'expérience. Une fois que la concentration en oxygène est suffisamment faible, la levure transite vers un état de fermentation. Cela semble cohérent avec le matériel cellulaire étant donné que la seule réserve en dioxygène présente est celle contenue dans le volume d'air initialement présent dans le respiromètre.

Quelles sont les conditions optimales pour la production de l'éthanol par la levure lors du processus brassicole ? Pour produire de l'éthanol, la dégradation des sucres doit se faire par fermentation. L'utilisation de NaN_3 comme un inhibiteur est donc optimale étant donné que celui-ci permet bloquer uniquement la respiration. Il faudra également que le sucre utilisé puisse être dégradé par la levure, le glucose ou le saccharose sont donc les deux choix les plus optimaux, comme le montre la figure 3. De plus, nos expériences ont également démontré que la glycolyse ne peut pas avoir lieu si la température est trop basse ou si le pH est trop bas. Il est donc préférable de faire la fermentation dans un milieu à pH neutre et à 37°C. Cependant nos expériences ne nous permettent pas de trouver le pH et la température les plus optimaux.