

INFLUENCE DES VITAMINES B12 ET ACIDE FOLIQUE SUR LA CROISSANCE AEROBIE ET ANAEROBIE DE SACCHAROMYCES FRAGILES

par G. SELSELET-ATTOU

Maître Assistant à l'INA.

RESUME

L'addition d'acide folique et de vitamine B12 au milieu de culture de *Saccharomyces fragilis* ne modifie pas sensiblement les critères étudiés. En *anaérobiose*, la vitamine B12 seule augmente les teneurs en ADN, ARN, et Protéines à 24 heures. En *aérobiose*, l'addition conjuguée des deux vitamines augmente la teneur en ADN en début de culture et le nombre de cellules en fin de culture.

Pour essayer de préciser l'influence que peuvent avoir les vitamines B12 et acide folique sur la croissance de *Saccharomyces fragilis* (1, 2, 8, 15), faute de pouvoir les éliminer ou tout au moins de bloquer leur action métabolique; nous avons procédé à l'addition de ces deux vitamines dans le milieu de culture primitivement exempt. Les cultures recevant une supplémentation en vitamines ont été incubées en même temps et dans les mêmes conditions que les cultures témoins en milieu simple. Les quantités ajoutées sont de 5 µg/l pour l'acide folique et 1,5 µg/l pour la vitamine B12. Ces quantités correspondent à celles qui seraient apportées par 50 g/l de lactosérum en poudre (le lactosérum est le substrat naturel de *S. fragilis* utilisé en culture industrielle).

CONDITIONS EXPERIMENTALES

Souche- *Saccharomyces fragilis Jorgensen* cultivée comme levure-aliment par le groupe des industries des Fromageries BEL. La souche est entretenue sur gélose inclinée (13).

Milieu de culture - Milieu dont les constituants ont été empruntés d'une part au milieu d'Olson et Johnson (10) et, d'autre part, au milieu de Galzy et Slonimski (5), tous deux utilisés pour *Saccharomyces cerevisiae*. La composition pour un litre de milieu est la suivante: lactose 10g, L-asparagine 2,5 g, $\text{NH}_4\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 6 g, Thiamine 4 mg, Mésoinositol 10 mg, Pyridoxine 1 mg, Acide nicotinique 0,5 mg, Biotine 0,02 mg, Pantothénate de calcium 0,5 mg, KCl 0,2 mg, MgSO_4 0,25 g, CuSO_4 0,001 g, ZnSO_4 0,078 g, FeSO_4 0,002 g, CoSO_4 0,052 g, Acide phosphorique 0,150 g.

Le milieu est réparti en fiole de 750 cm³ à raison de 250 ml en aérobiose et 500 ml en anaérobiose, gardant ainsi les proportions de milieu par rapport aux possibilités semblables à celles employées dans les premiers stades des cultures industrielles. On autoclave à 116°C pendant 10 minutes. Après ensemencement, l'incubation se fait à 31°C dans une étuve oscillante par va et vient continu pour les cultures aérobies; les cultures anaérobies sont incubées à 31°C aussi sans aucune agitation.

Durée d'incubation-récolte - Les durées d'incubation choisies sont de 7, 12, 18, 24, 48 et 72 heures. Les cellules récoltées par centrifugation.

Techniques - Les comptages cellulaires ont été réalisés au compteur de particules Coulter. Les protéines totales ont été dosées selon la méthode de LOWRY (7). L'extraction des acides nucléiques a été réalisée selon la technique de SCHMIDT et TANNHAUSER (12), les dosages d'ADN selon la méthode de BURTON (3) et d'ARN d'après la méthode de MEJBAUM (9). Les vitamines ont été dosées par voie microbiologique: les Folates libres totaux suivant la méthode préconisée par HERBERT et al. (6) sans ajouter d'autre réducteur que celui de l'extraction (11); la vitamine B12 sous forme de cobalamines totales selon la méthode exposée par CALET et RERAT (4).

RESULTATS

1) EVOLUTION DES TENEURS EN FOLATES LIBRES TOTAUX ET VITAMINE B12 DANS LES CULTURES SIMPLES.

Les valeurs mesurées en FLT et vitamine B12 (sous forme de cobalamines totales) sont données dans le tableau suivant:

Teneurs moyennes en FLT et vitamine B12 respectivement en μg et μg par 10^7 cellules.

Heures	Aerobiose		Anaerobiose	
	FLT	Vitamine B12	FLT	Vitamine B12
7	0,7	1,8	0,2	traces
12	0,7	1,0	0,9	1,1
18	0,7	0,9	1,5	2,7
24	0,5	0,7	1,4	2,8
48	0,2	0,6	0,5	1,5
72	0,2	0,6	0,4	1,3

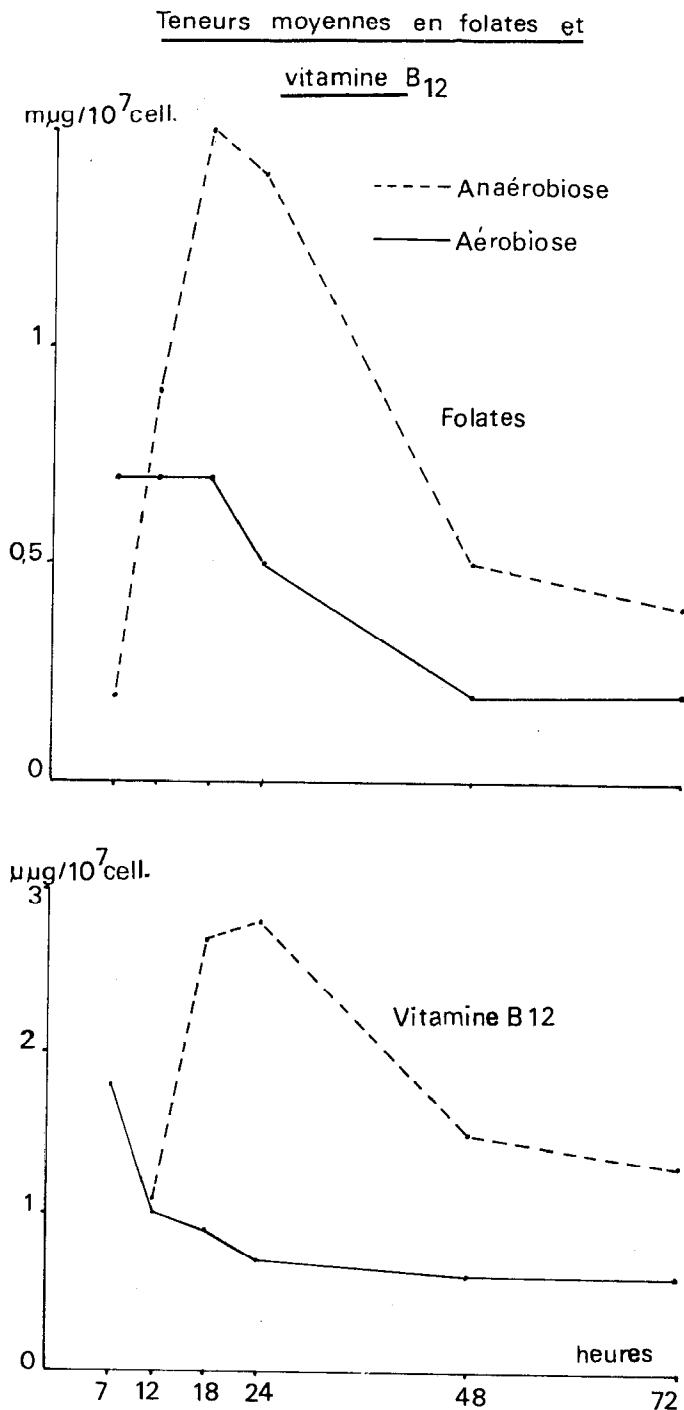


Figure 1.

Effets de l'adjonction de Vitamine B12

dans le milieu de culture anaérobie

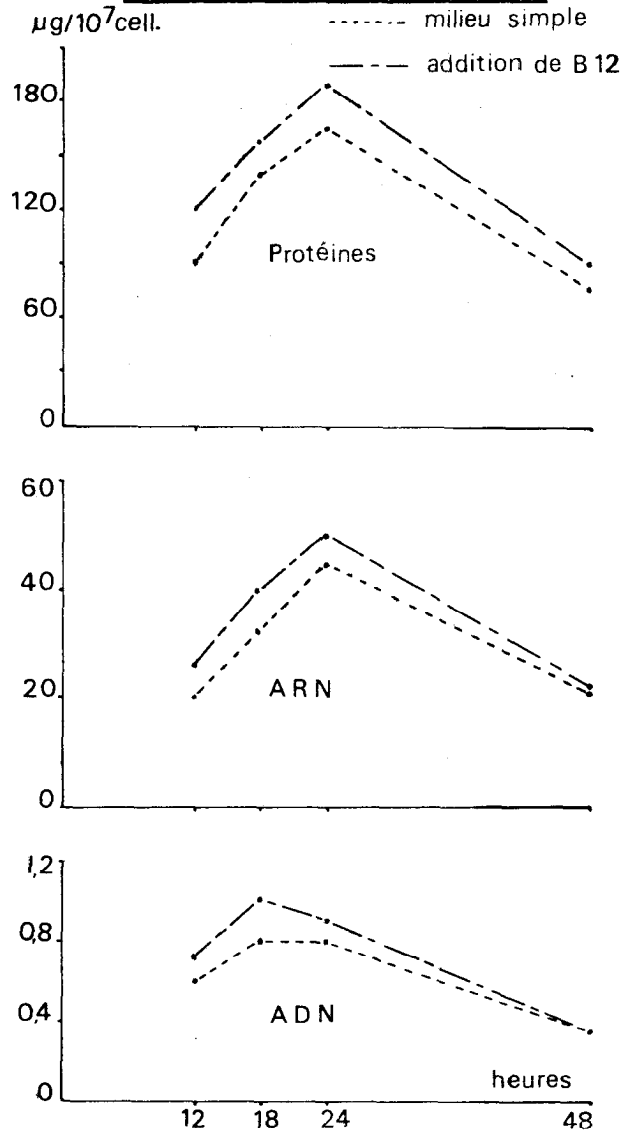


Figure 2.

Les teneurs cellulaires dans les *cultures aérobies* (fig. 1) sont relativement élevées au départ et présentent une diminution plus ou moins régulière avec la durée de l'incubation.

Les teneurs cellulaires dans les *cultures anaérobies* accusent une augmentation puis une diminution avec un sommet se situant soit à 18, soit à 24 heures.

Nous regrettons d'autant plus n'avoir pu, faute de matériel, faire une étude plus précoce dans le temps des cultures aérobies qui auraient peut être montrée des maximum dans les teneurs des constituants indiquant que l'aérobiose se caractérise également par un maximum d'activité métabolique dès le début de la culture.

2) EFFET D'UNE ADDITION DE VITAMINE B12 SEULE.

Les résultats positifs observés sur l'enrichissement en protéines et en acides nucléiques sont, en général, minimes sauf à des moments donnés de la croissance des populations correspondant à la fin de la phase exponentielle (18-24 heures) des *cultures anaérobies* (fig. 2). Cette action trophique, bien que modérée est cependant réelle et conforme à ce que l'on sait des effets de cette vitamine. On observe les pourcentages d'augmentation suivantes:

ADN	20 p. 100
ARN	22 p. 100
Protéine	22 p. 100

En *Aérobiose* l'adjonction de vitamine B12 ne se fait pas du tout sentir sur les teneurs en constituants protéiques et nucléiques. On note uniquement que les teneurs vitaminiques intra-cellulaire sont plus élevées que chez les cultures témoins (5 à 8 fois plus) au cours de la croissance.

3) EFFET D'UNE ADDITION FOLIQUE SEULE.

On constate que les changements dans les constituants protéiques et nucléiques, ainsi que les teneurs des vitamines étudiées ne méritent pas d'être mentionnées car sont trop insignifiants. On ne peut que confirmer le sentiment qu'un apport exogène isolé d'acide folique ne correspond à nul besoin chez *S. fragilis*.

4) EFFET D'UNE ADDITION CONJUGUÉE DES DEUX VITAMINES.

En *Aérobiose* on assiste à une augmentation sensible de l'ADN en début de culture de 56, 26 et 16 p. 100 respectivement à 7, 12 et 24 heures d'incubation par rapport aux cultures témoins (fig. 3). Il est vrai que cette

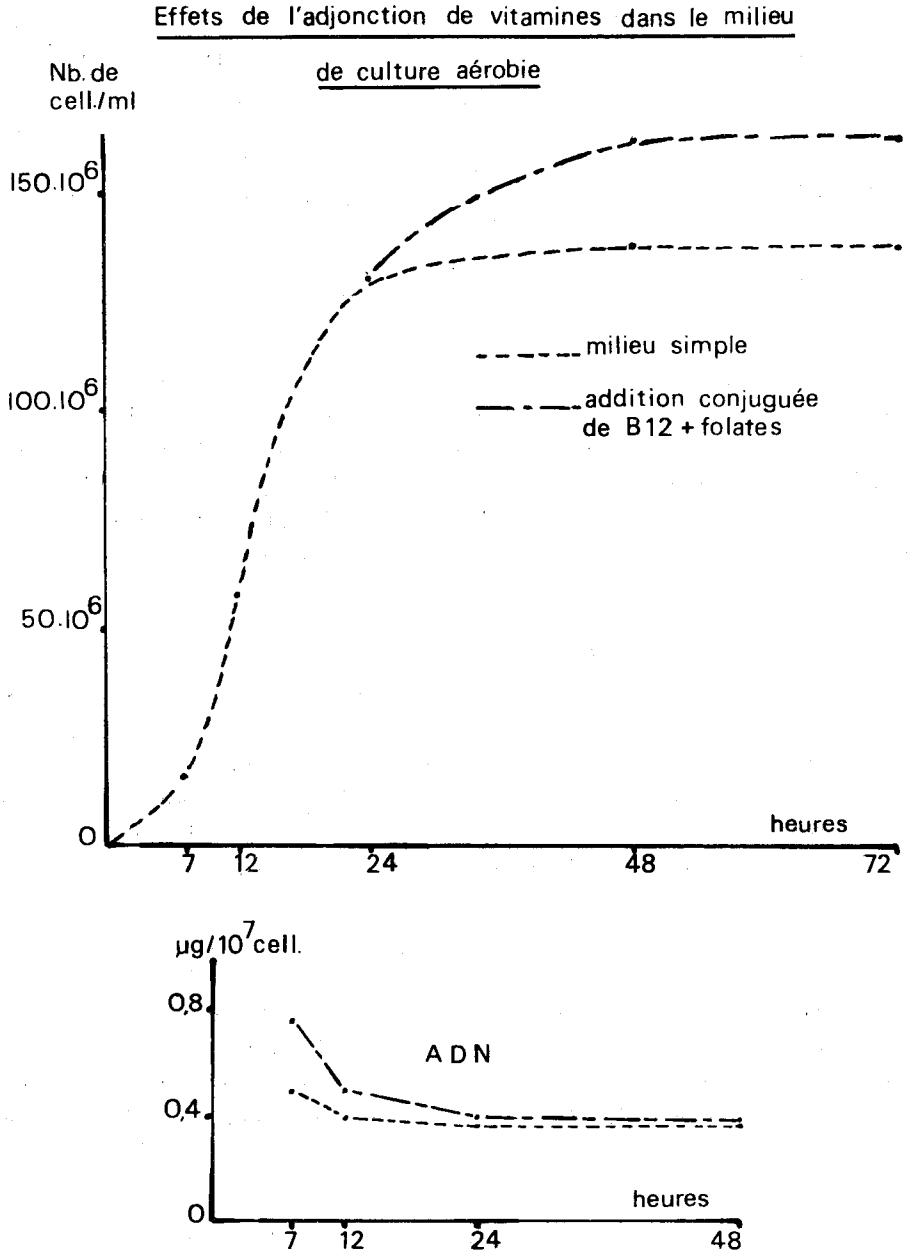


Figure 3.

*Tableau de variation du nombre de cellules en aérobiose
(en millions de cellules par ml.)*

Héures	7	12	24	48	72
Milieu simple	14	57	130	135	135
Milieu simple + vitamines .	14	57	130	160	160

différence s'estompe au fur et à mesure que l'incubation se poursuit, mais cette accélération de la synthèse d'ADN au début de la culture suffit peut être à expliquer les écarts importants observés au cours de la croissance des populations à partir de la 24ème heure: majoration de 18 p. 100 en nombre de cellules par millilitre (fig. 3).

DISCUSSION ET CONCLUSION

On peut constater qu'il existe une assez grande similitude de variations entre ces vitamines et les constituants cellulaires protéiques et nucléiques étudiés précédemment (14). Ces vitamines ne semblent pas pour la levure des facteurs de croissance exogènes, puisqu'elles sont synthétisées sans doute suivant besoin (en très grande quantité pour les Folates) alors qu'elles sont absentes du milieu de culture.

En somme dans les conditions de nos expériences, la vitamine B12 seule ne semble présenter une certaine efficacité métabolique qu'en culture anaérobie.

L'acide folique, lui, ne manifeste aucune influence lorsqu'on l'ajoute isolément, ce qui peut être mis en rapport avec le fait que les besoins sont couverts très amplement par les propres synthèses de la levure.

Quant à l'action conjuguée des deux vitamines, elle n'apparaît montrer un certain effet que dans le cadre du métabolisme aérobie, où leur action convergente ou synergique a montré un phénomène intéressant: augmentation assez nette des teneurs en ADN en début de culture, relayée par l'augmentation du nombre de cellules en fin de culture.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) ABELES R. H. and WILLIAM S. B., 1967 - « J. Biol. Chem. », 242, 3589-3593.
- (2) BLAKLEY R. I., 1969 - « North-Holland Publishing Company », Amsterdam-London, 439-463.
- (3) BURTON K., 1956 - « J. Biol. Chem. », 62, 315.
- (4) CALET C. et RERAT A., 1954 - « Ann. Zootech. », 3, 247-270.
- (5) GALZY P. et SLONIMSKI P., 1957 - « C. R. Acad. Sci. », 245, 2423-2426.
- (6) HERBERT V., 1966 - « J. Clin. Pathol. », 19, 12-16.
- (7) LOWRY O. H., NIRA J. R., LEWIS A. and ROSE J. R., 1951 - « J. Biol. Chem. », 193, 265-275.
- (8) MASSON L. A., 1961 - « Europ. Symp. Hambourg », 191-195.
- (9) MEJBAUM W., 1939 - « Hope Seyler Z. », 258, 117-120.
- (10) OLSON B. H. and JOHNSON M. J., 1949 - « J. Bact. », 57, 235-246; 1950 - « Nutrition Abstracts », 19, 163.
- (11) ROY C., BERTAUX O., VALENCIA R., 1971 - « Ann. Nutr. Alimen. », 25, 263-275.
- (12) SCHMIDT G. and TANNHAUSER, 1945 - « J. Biol. Chem. », 161, 83-89.
- (13) SELSELET-ATTOU G., 1973 - « Thèse 3ème cycle », Paris.
- (14) SELSELET-ATTOU G., 1975 - « Ann. de l'Institut Agronomique », n. 5, Alger.
- (15) STOKSTAD E. L. R. and JUERGEN K., 1967 - « Physiological Reviews », 47, n. 1, 83-116.