

TP : Suivi de cinétique de croissance de *Saccharomyces cerevisiae* et cinétique de disparition du substrat (glucose)

Etapes du TP

- Réalisation d'une Pré culture levure de boulangerie
- Préparation du milieu de culture
- Ensemencement et culture pendant 3 heures
- Prélèvements d'échantillons toutes les 30 min
- Détermination de la biomasse par turbidimétrie
- Dosage du substrat (glucose) par colorimétrie (3-5 DNS)

1. Préculture : Réaliser en eau distillée une suspension de levure de boulangerie à environ 25g pour 100mL d'eau distillée stérilée.

2. Préparation du milieu de culture : Milieu de culture : S1 : - extrait de levure 2,5g - KH_2PO_4 12,5g - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,3 g - eau distillée qsp 150 mL et autoclavage à 120°C pendant 20 min.

S2 : - solution de glucose à 10g dans 50mL d'eau, stérilisée par filtration. Le milieu de culture est obtenu en ajoutant aseptiquement 50 mL de S2, aux 150 mL de S1 avant l'ensemencement. l'anaérobiose est réalisée après ensemencement par addition d'huile de vaseline à la surface du milieu à 35°C sous agitation modérée (bain-Marie agité) .

3. Culture

Ensemencer le milieu complet avec 25mL de la suspension de levure (préculture) dans une fiole de 250 mL. Ajouter l'huile de vaseline jusqu'au col de la fiole (environ 3 à 4 cm de hauteur). Suivre la croissance par analyse d'échantillons prélevés (~ 2 mL), dans des conditions stériles, aux temps : 0 ; 30 ; 60 ; 90 ; 120 min. Centrifuger de suite, en petits tubes eppendorf, si ~1ml, 5 min, à vitesse maximum.

4. Dosages

4.1. Détermination de la biomasse par turbidimétrie : on préleve un 1 mL du milieu de culture et on mesure l'absorbance à 600 nm contre un blanc constitué de milieu de culture non ensemencé, En déduire la concentration en biomasse sachant qu'une variation "d'absorbance" de 1 à 600nm, correspond à une variation de biomasse de 0,7 g/L.

4.2. Dosage du glucose (méthode au DNS)

-Solution de glucose à 0,005 mol/L

-Solution de DNS (pour 100 mL)

- o 1g d'acide 3,5-dinitrosalicylique
- o 20mL de solution de NaOH 2M
- o 30g de tartrate de sodium-potassium tétrahydraté
- o eau distillée q.s.p. 100mL

-Eau distillée

-Solution à doser

Étapes

Préparation de la gamme d'étalonnage

Dans une série de tubes :

- introduire 0 - 0,2 - 0,4 - 0,6 - 0,9 - 1,2 ml de solution de glucose à 0,005 mol/L ;
- ajuster chaque tube à 1,5 ml avec de l'eau distillée ;
- ajouter 1 ml de réactif 3-5 DNS ;
- mélanger et boucher les tubes avec du coton cardé et du papier aluminium ;
- porter au [bain-marie](#) à 100 °C pendant 5 min exactement ;
- refroidir et ajouter 7,5 ml (q.s.p. 10 ml) d'eau distillée dans chaque tube (on suppose que l'évaporation est la même pour chaque tube), homogénéiser et laisser reposer pendant 15 min.

Lire les absorbances à 540 nm contre le blanc (tube n° 0).

Essais

Ils sont à traiter dans les mêmes conditions opératoires.

Réaliser le dosage avec des prises d'essais de 0,5 ml diluées convenablement, additionnées d'1 ml d'eau distillée et d'1 ml de DNS.

N° de tube	0	1	2	3	4	5
Solution étalon de glucose à 0,005 mol/L en mL	0	0,2	0,4	0,6	0,9	1,2
Eau distillée en mL (avant chauffage)	1,5	1,3	1,1	0,9	0,6	0,3
DNS en mL	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Eau distillée en mL (après chauffage)	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
Quantité de glucose en µmol	0	1,0	2,0	3,0	4,5	6,0

Ce tableau représente ce qui doit être mis dans chaque tube et en quelle quantité.

Questions :

- 1- Tracer la cinétique de croissance de la levure
- 2- Tracer la courbe d'étalonnage du glucose
- 3- Tracer la cinétique de disparition du substrat.