

Atelier de
Travaux pratiques de Microbiologie Industrielle/ M1

Pr. Yacine Benhizia- 2019/2020

TP N°1

Stérilisation des milieux et leur complexité à l'échelle industrielle

Une des conditions nécessaires pour obtenir une culture pure au cours d'une fermentation industrielle consiste à avoir un milieu et un appareillage stériles en vue d'éviter les surinfections.

Mais le problème des contaminations n'est pas le même dans tous les cas :

- Milieu acide = conditions de culture sont sélectives (cas des levures) ;
- Dans les autres fermentations, il est nécessaire de réaliser une asepsie rigoureuse.

Il faut signaler que par suite des énormes volumes de liquide à stériliser, les radiations ou les ultra-sons ne peuvent être utilisés.

Alors que les fermenteurs vides peuvent être stérilisés par des agents chimiques gazeux (β -propiolactone, oxyde d'éthylène), mais c'est la vapeur d'eau sous pression qui est universellement employée (l'utilisation est plus pratique et moins onéreuse).

Contenu de la séance :

1/ Sensibilité des microorganismes à la chaleur à température constante (courbe de survie à température constante = thermal Death Time Curve).

2/ Sensibilité des microorganismes à la chaleur en fonction de la température.

TP N°2

Préparation du fermenteur et du matériel annexe à l'autoclavage

- Que se passe-t-il lors de l'autoclavage ?

a- La transmission de la chaleur n'est pas immédiate, elle dépend :

- de la surface de contact,
- de la différence de température,
- des caractéristiques de conduction de la chaleur.

b- D'après la loi des gaz parfaits ($Pv = nRT$), cette différence de température entre l'élément à stériliser et le fluide de chauffage (vapeur d'eau) crée une différence de pression qui peut provoquer des incidents de stérilisation :

- en absence de système de respiration :
explosions des éléments à stériliser
- en absence d'une préparation correcte du matériel
ouverture des flacons
perte des fluides à stériliser

Remarque : ce phénomène est amplifié car le verre est un mauvais conducteur thermique.

Les points essentiels lors de la préparation à l'autoclavage sont :

a- protection vis-à-vis des contaminations :

- verrouillage de la platine supérieure
- obstruction suffisante des ports ouverts : prélèvement, ensemencement, aération...

b- protection des parties sensibles à la chaleur et à l'humidité :

- assemblage par rodage de verre : graisse aux silicones résistante aux températures élevées
- sorties au coton cardé : papier aluminium
- parties métalliques fragiles (sonde, raccord...) et câbles électriques

c- protection vis-à-vis des différences de pression :

- ne pas trop tasser le coton cardé (système de respiration) mais suffisamment (résistant aux variations de pression)
- fermer les tubes plongeurs
- remplir la double enveloppe d'eau

TP N°3

Dilution / Etalonnage

Séance 1 :

La réalisation d'une série de dilutions à partir d'une solution mère (solution de *Saccharomyces cerevisiae*) d'une concentration de 1g/l.

La recherche de la longueur d'onde à laquelle la suspension de levure absorbe le plus.

Séance 2 :

La lecture de différentes densités optiques des dilutions qu'on a réalisées.

Etablissement de la courbe d'étalonnage (la concentration en fonction de la densité optique).

Matériel nécessaire :

- Matériel biologique

La levure : choisie à cause de son caractère non pathogène pour éviter tout risque de contamination.

- Matériel et verrerie pour la préparation des solutions :

spatule, papier d'aluminium, béchers, portoirs, tubes à essai, pipettes...

- Appareillage :

balance (avec précision), spectrophotomètre dans le visible de 300 à 700 nm, cuvette pour spectrophotomètre, agitateur magnétique avec barreau magnétique...

- Eau distillée comme solvant.

TP N°4

Culture de levures dans un fermenteur

Les levures sont considérées comme un aliment de grande valeur nutritive. Pour cette raison, la production de "levure-aliment" s'effectue sur des milieux très variés (mélasses de Betterave ou de Canne à sucre, lactosérum...).

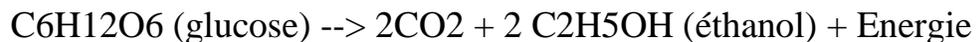
Objectif :

- 1- Utiliser un fermenteur (de petite taille ou Erlenmeyer) pour réaliser une culture de levures (ici *Saccharomyces cerevisiae*) en essayant d'obtenir le meilleur rendement possible.
- 2- Suivre l'évolution du nombre d'organismes, celle de la concentration en nutriment (glucose), et celle de la concentration en produit fabriqué (biomasse).

Principe :

La levure *saccharomyces* utilise la respiration pour oxyder le glucose, elle extrait ainsi 40% de l'énergie contenue dans ce métabolite. Grâce à cette énergie, elle réalisera ses travaux cellulaires et se reproduira par bourgeonnement. Mais elle utilise aussi la fermentation alcoolique qui, elle, n'extrait qu'environ 2% de l'énergie du métabolite. La fermentation alcoolique est une dégradation très incomplète du glucose puisqu'elle produit en plus du dioxyde de carbone, un résidu organique qui contient de l'énergie potentielle : l'éthanol.

L'équation de l'oxydation incomplète du glucose au cours de la fermentation alcoolique (bilan) est:



Dans cette expérience, on cultive des levures *saccharomyces* dans un fermenteur ou des Erlenmeyers en aérobiose, en suivant l'évolution de la biomasse et le taux de glucose consommé.

Protocole expérimental :

- Une préculture de levures *saccharomyces*
- Un fermenteur avec une sonde thermique et un thermostat, un aérateur d'aquarium qui permet l'aération du milieu et son brassage.
- Un test colorimétrique permettant de doser le glucose par une méthode enzymatique : réactif du

Glucose = glucose oxydase + peroxydase + chromogène et solution de glucose étalon à 1g/l.

- Un spectrophotomètre (et des cuves)
- Tubes à essais
- Pipettes et micropipettes.

Expérience :

Introduire dans le fermenteur une préculture de levures dans un volume donné de milieu nutritif (liquide). Il contient les nutriments nécessaires au développement des levures dont le glucose. Le pH choisi (pH = 5) est optimal pour le développement des levures et trop bas pour permettre un développement de bactéries ; on l'obtient en introduisant de l'acide sulfurique dans le fermenteur, de même, la température de 26°C est optimale. Au début de l'expérience (t = 0min.), effectuer les mesures suivantes par prélèvements (ils sont facilement réalisables grâce à un système utilisant des seringues).

Evaluation du nombre de cellules :

Après avoir fait le zéro d'absorbance sur le milieu nutritif (sans levures), mesurer l'absorbance à 600nm de manière à pouvoir déterminer le nombre d'organismes grâce à la courbe d'étalonnage obtenue par la méthode des dilutions à l'aide d'une cellule de Malassez.

Dosage du glucose :

-Solution étalon:

Introduire dans un tube 20µl d'une solution de glucose à 1g/l et 2ml de réactif (du glucose). Attendre pendant 10min. Mesurer l'absorbance (= 505nm car à cette longueur d'onde, les rayons lumineux sont parfaitement absorbés par le chromogène coloré (contenu dans le réactif)

-Dosage du glucose dans le fermenteur :

Introduire dans un tube 20µl de solution prélevée à partir du fermenteur et 2ml de réactif, bien mélanger. Attendre 10min. Mesurer l'absorbance (= 505nm)

Résultats

Nombre de cellules

On utilise la courbe d'étalonnage réalisée au cours d'une séance précédente. Elle permet d'établir qu'une unité d'absorbance (UA) qui correspond à environ 17500 cellules.

Taux de glucose

Pour déterminer la concentration en glucose de la solution prélevée, on utilise la mesure obtenue avec la solution étalon soit pour Glucose 1g/l : $A_{505} = 0,46$
On déduit ainsi la concentration en glucose de la solution prélevée dans le fermenteur pour une absorbance donnée.

A partir du tableau, tracer les courbes

Interprétation de :

la courbe représentant l'évolution du nombre de cellules ;

la courbe représentant l'évolution du taux de glucose consommé.