

FRUCTOSE ET METABOLISME DES LEVURES

Fiche sujet - candidat

Les levures sont des organismes unicellulaires hétérotrophes régénérant leur ATP par respiration et/ou fermentation alcoolique réalisées à partir d'un substrat prélevé dans leur milieu, le glucose par exemple.

On cherche à déterminer si des levures métabolisent un autre substrat, le fructose, et si oui, à préciser par quelle(s) voie(s) ce substrat est métabolisé (respiration et/ou fermentation).

| | |
|---|--|
| Matériel : | |
| <ul style="list-style-type: none"> - une chaîne d'acquisition ExAO comportant une sonde à dioxygène, une sonde à éthanol, une enceinte et une interface - un ordinateur, un logiciel d'acquisition de données et une imprimante - fiche technique du logiciel utilisé - répertoire d'enregistrement : _____ - une seringue de 1 mL ; une pipette ; - une solution de fructose (10 g.L⁻¹) | <ul style="list-style-type: none"> - une suspension A de levures (10 g.L⁻¹), cultivées sans fructose - une suspension B de levures (10 g.L⁻¹) cultivées avec du fructose - papier absorbant - un spectrophotomètre, des cuves de mesure, - un portoir avec 2 tubes à essai, un flacon d'eau déminéralisée, 2 pipettes de 1 mL et 10 mL, propipette, - film plastique, feutre |

| Activités et déroulement des activités | Capacités et principaux critères d'évaluation | Barème |
|--|---|--------|
| 1. En utilisant les informations fournies par les deux fiches protocoles, relier chacune des deux manipulations à l'un des deux objectifs de la problématique. Démarrer la manipulation ExAO (question 3 et 4) et utiliser le temps d'attente pour répondre à la question 2. | Comprendre la manipulation | 2 |
| 2. Mesurer les densités de population des suspensions de levures A et B en suivant les consignes de la fiche protocole-spectrophotométrie. Appeler l'examineur pour vérification | Réaliser une manipulation d'après un protocole | 4 |
| 3. Réaliser le montage ExAO en suivant les consignes de la fiche protocole-ExAO. Appeler l'examineur pour faire contrôler le montage | Réaliser une manipulation d'après un protocole et utiliser une chaîne d'ExAO respect des étapes du protocole | 7 |
| 4. Effectuer la mesure en respectant les conditions indiquées dans la fiche-protocole-ExAO. Appeler l'examineur pour vérification, enregistrer puis imprimer Demander un résultat de secours en cas de besoin. | utilisation maîtrisée des fonctionnalités du logiciel gestion et organisation du poste de travail | |
| 5. Titrer et légender le graphique (ou le document de secours), délimiter et annoter ses différentes parties en fonction des conditions expérimentales | Traiter des données sous forme d'un graphique adaptation de l'échelle des axes aux phénomènes | 3 |
| 6. Exploiter l'ensemble des résultats pour répondre au problème. Argumenter la réponse sur la fiche réponse - candidat. | Appliquer une démarche explicative | 3 |
| 7. En fin d'épreuve, ranger le poste de travail et fermer le logiciel. | Gérer et organiser le poste de travail | 1 |

Réalisation du montage

(on réalisera les points 1 et 2 dans l'ordre qui convient en fonction du matériel)

1. **remplir**, à l'aide d'une pipette, la quantité de suspension de levures nécessaire pour remplir l'enceinte ; fermer l'enceinte
2. **installer** dans l'enceinte les sondes choisies et vérifier l'absence de bulles d'air
3. **éponger** les débordements éventuels
4. **lancer** l'agitation à vitesse modérée
5. **préparer** une seringue avec mL de la solution de fructose

Appeler l'examineur pour faire contrôler le montage.

Acquisition des mesures

- **choisir** les paramètres de la mesure (en s'aidant de la fiche technique du logiciel utilisé) : durée = 15 minutes
- **prévoir** l'insertion d'un repère sur le graphique
- **démarrer** la mesure
- à t = 2 minutes, **ajouter** dans le réacteur mL de la solution de fructose (penser à mettre un repère sur le tracé)
- **poursuivre** l'enregistrement durant le temps restant
- **présenter** les résultats de façon optimale en jouant sur les fonctionnalités du logiciel ; adapter les échelles des axes aux paramètres mesurés

Appeler l'examineur pour vérification.

- **enregistrer** dans le répertoire indiqué et **imprimer** le graphe obtenu

Remarques :

- on constate parfois une présence d'éthanol dès le début de la manipulation. Plusieurs explications sont possibles mais elles ne sont pas demandées dans ce sujet.
- cette présence initiale d'éthanol sera considérée ici comme négligeable et l'interprétation des résultats des mesures ne prendra en compte que les variations significatives de la teneur en éthanol par rapport à cette valeur initiale.
- dans une population, toutes les levures n'ont pas la même réponse par rapport aux variations du milieu.

FRUCTOSE ET METABOLISME DES LEVURES

Fiche protocole spectrophotométrie – candidat

Principe du protocole de mesure de la densité d'une population de levures en spectrophotométrie

La densité de levures dans une suspension est évaluée par l'absorbance de la suspension, mesurée grâce à un spectrophotomètre.

L'absorbance de la suspension augmente quand le nombre de levures augmente. Pour obtenir une valeur d'absorbance dans l'intervalle de mesure de l'appareil, il est souvent nécessaire de diluer la suspension utilisée.

Obtention des suspensions de levures fournies

Les suspensions de levures A et B ont été préparées comme suit : une suspension initiale de levures à 10 g. L⁻¹ a été oxygénée pendant 24 h pour éliminer tous les substrats présents dans le milieu et dans les cellules.

L'absorbance de cette suspension de levures, diluée au dixième, au début de la culture, était

On a séparé en deux fractions cette suspension :

- une fraction A cultivée pendant 24 h sans fructose
- une fraction B cultivée pendant 24 h avec du fructose (10 g. L⁻¹).

Mesure de la densité de population de levures en spectrophotométrie

- effectuer des dilutions au dixième des suspensions A et B (on rappelle que $C1.V1 = C2.V2$ avec C = concentration de cellules et V = volume de la suspension)
- agiter la suspension diluée (en fermant le tube avec le film plastique) avant de la transférer en versant directement du tube dans la cuve du spectrophotomètre
- préparer une cuve avec de l'eau déminéralisée (pour faire le zéro d'absorbance du spectrophotomètre)
- réaliser les mesures d'absorbance des 2 suspensions selon les indications de la fiche technique du spectrophotomètre