

## **TP3 : PROTOCOLE DE TRAVAIL PRATIQUE : PRODUCTION DE PROTÉINES D'ORGANISMES UNICELLULAIRES (P.O.U) – LA LEVURE**

### **1. Objectifs :**

- Comprendre les conditions optimales de culture des levures pour maximiser la production de protéines.
- Appliquer des techniques de fermentation pour la croissance des levures.
- Extraire et quantifier les protéines produites par les levures.

### **2. Matériel et Réactifs :**

#### **Matériel :**

- Bioréacteur ou erlenmeyers de 500 mL
- Agitateur magnétique ou incubateur orbital
- pH-mètre
- Autoclave
- Spectrophotomètre UV-Vis
- Centrifugeuse
- Papier filtre et entonnoir
- Tubes Eppendorf
- Pipettes automatique

#### **Réactifs :**

- Milieu de culture (ex : YPD : 10 g/L d'extrait de levure, 20 g/L de peptone, 20 g/L de glucose)
- Souche de levure (*Saccharomyces cerevisiae*)
- Tampon phosphate (pH 7,4)
- Réactif de Biuret ou de Bradford (pour quantification des protéines)
- Solution de NaOH 1 M (ajustement du pH)
- Eau distillée

### **3. Protocole Expérimental :**

#### **A. Préparation du Milieu de Culture**

1. Peser les quantités nécessaires d'extrait de levure, de peptone et de glucose.
2. Dissoudre les composés dans de l'eau distillée et ajuster le volume final.
3. Ajuster le pH à 6,5 à l'aide de NaOH 1 M ou HCl 1 M.

4. Stériliser le milieu par autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

## **B. Ensemencement et Culture des Levures**

1. Prélever une boucle de levure à partir d'une souche préservée sur gélose YPD.
2. Inoculer le milieu stérile avec la souche de levure.
3. Incuber à 30°C sous agitation (150-200 rpm) pendant 24 à 48 heures.
4. Suivre la croissance en mesurant la densité optique à 600 nm toutes les 6 heures.

## **C. Récupération et Extraction des Protéines**

1. Après incubation, centrifuger la culture à 4000 rpm pendant 10 minutes à 4°C.
2. Récupérer le culot de levure et le laver avec du tampon phosphate.
3. Resuspendre le culot dans du tampon de lyse.
4. Effectuer une lyse mécanique (billes de verre + vortex) ou chimique (traitement avec des détergents).
5. Centrifuger à 12 000 rpm pendant 15 minutes pour séparer les protéines solubles du débris cellulaire.
6. Récupérer le surnageant contenant les protéines.

## **D. Dosage des Protéines**

1. Préparer une gamme étalon de protéines (ex : albumine de sérum bovin, BSA).
2. Mélanger 200 µL de surnageant avec 800 µL du réactif de Bradford ou de Biuret.
3. Incuber 10 minutes à température ambiante.
4. Lire l'absorbance à 595 nm (Bradford) ou 540 nm (Biuret).
5. Déterminer la concentration en protéines à l'aide de la courbe étalon.

## **4. Analyse et Discussion des Résultats :**

- Comparer la concentration en protéines obtenue avec des valeurs attendues.
- Discuter de l'efficacité du protocole d'extraction.
- Analyser les conditions influençant la production (température, source de carbone, pH).

## **5. Conclusion :**

Ce protocole permet de produire et extraire des protéines à partir de levures. L'optimisation des conditions de culture et d'extraction est essentielle pour maximiser le rendement protéique.