

BACCALAURÉAT TECHNOLOGIQUE

**Série : Sciences et Technologies de Laboratoire
Spécialité : Biotechnologies**

SESSION 2014

Sous-épreuve écrite de Biotechnologies

MARDI 17 JUIN 2014

Coefficient de la sous-épreuve : 4

Ce sujet est prévu pour être traité en deux heures.

**Les sujets de CBSV et de biotechnologies seront traités
sur des copies séparées.**

L'usage de la calculatrice est autorisé.

Ce sujet comporte **9** pages.

OPTIMISATION D'UN PROCESSUS DE FERMENTATION D'UN RÉSIDU DE L'INDUSTRIE CÉRÉALIÈRE : LE SON DE BLÉ

Une entreprise souhaite valoriser le son de blé, un des produits obtenu lors de l'extraction de la farine du grain de blé. Le son de blé subit diverses transformations qui aboutissent à un extrait liquide : le sirop de son de blé.

Ce sirop riche en glucides permet par fermentation d'obtenir de l'acide lactique capable de polymériser en acide polylactique (P.L.A.). Ce bio-polymère permet de fabriquer des emballages biodégradables.

Le laboratoire de recherche et développement de l'entreprise souhaite optimiser la production d'acide lactique en fermenteur à partir des glucides du sirop de son de blé.

Le laboratoire se donne trois objectifs :

- choisir une souche bactérienne capable d'utiliser les glucides présents dans le sirop de son de blé ;
- optimiser la production d'acide lactique par la souche sélectionnée ;
- construire une souche génétiquement modifiée productrice d'acide D-lactique.

1. CHOIX D'UNE SOUCHE PRODUCTRICE D'ACIDE LACTIQUE CAPABLE D'UTILISER LES GLUCIDES DU SIROP DE SON DE BLÉ

1.1. Identification des glucides présents dans le sirop de son de blé

Afin d'identifier les glucides présents dans le sirop de son de blé, une chromatographie sur couche mince (CCM) est réalisée.

- Q1.** Interpréter les résultats du chromatogramme fourni dans le **document 1**.
- Q2.** Tous les glucides présents dans le sirop de son de blé ne sont pas identifiables par cette CCM. Proposer une adaptation du protocole afin d'identifier tous les glucides présents.

1.2. Identification de souches capables de fermenter les glucides présents dans le sirop de son de blé et de produire de l'acide lactique

Le laboratoire dispose de plusieurs souches de *Lactobacillus* productrices d'acide lactique. La fermentation des glucides pour chaque souche est étudiée grâce à une micro-galerie. Un extrait de la fiche technique de cette micro-galerie ainsi que les résultats obtenus sont présentés dans le **document 2**.

- Q3.** A partir de l'analyse du document, expliquer le principe de lecture d'une cupule positive et préciser sa couleur.
- Q4.** A partir de la réponse à la question **Q1** et des résultats fournis dans le **document 2**, argumenter le choix de la souche la plus adaptée à la production d'acide lactique à partir des glucides présents dans le sirop de son de blé.

2. OPTIMISATION DE LA PRODUCTION D'ACIDE LACTIQUE

Afin de suivre la production d'acide lactique produit au cours de la fermentation, un dosage d'acide lactique est réalisé selon la fiche technique fournie dans le **document 3**.

2.1. Dosage de l'acide lactique

La fermentation produit deux formes d'acide lactique : l'acide L-lactique et l'acide D-lactique.

- Q5.** Repérer dans le **document 3** ce qui permet d'affirmer que le coffret de dosage choisi est adapté au dosage de ces deux formes.
- Q6.** Expliquer l'évolution de l'absorbance à 340 nm.
- Q7.** Expliquer ce qui est mesuré par chacune des absorbances A_1 , A_2 et A_3 de l'essai.
- Q8.** Calculer le volume de milieu réactionnel V_{MR} lors de la lecture de A_3 .
- Q9.** Etablir l'équation aux unités et aux valeurs numériques de $\rho_{(ac. lactique ; \text{échantillon})}$.
Vérifier, par le calcul, que $\rho_{(ac. lactique ; \text{échantillon})} = 5,6 \text{ g.L}^{-1}$.

Données : $\Delta A_{ac. lactique total} = \Delta A_{D-ac. lactique} + \Delta A_{L-ac. lactique} = 0,344$
Facteur de dilution : $Fd = 50$

2.2. Choix du milieu de culture adapté à la production d'acide lactique

Afin d'optimiser la production d'acide lactique à moindre coût, la souche de *Lactobacillus* choisie est cultivée dans deux milieux A et B dérivés du milieu MRS additionné des glucides du sirop de son de blé (présentés dans le **document 4**)

Les sources d'azote présentes dans les milieux de culture comme les peptones, les extraits de levure et les extraits de viande, sont des ingrédients coûteux pour les industriels. Les éléments minéraux le sont beaucoup moins.

L'entreprise choisit le milieu B pour la production d'acide lactique.

- Q10.** Argumenter ce choix à l'aide du **document 4**.

3. CONSTRUCTION D'UN *LACTOBACILLUS* GÉNÉTIQUEMENT MODIFIÉ PRODUCTEUR D'ACIDE D-LACTIQUE

Afin de produire des bio-polymères de P.L.A. plus résistants, il est préférable d'utiliser la forme D de l'acide lactique.

Pour cela, la souche de *Lactobacillus* choisie a été modifiée génétiquement : le gène codant la L-LDH a été inactivé puis un plasmide noté pD-LDH contenant le gène D-LDH a été introduit dans cette souche.

- Q11.** Schématiser et annoter les deux étapes décrites ci-dessus permettant d'obtenir la souche génétiquement modifiée à partir de la souche sauvage de *Lactobacillus*.

Le technicien veut vérifier l'identité du plasmide introduit dans la souche de *Lactobacillus*. Pour cela, il extrait le plasmide et réalise une digestion enzymatique suivie d'une électrophorèse en gel d'agarose.

Le **document 5** présente la carte de restriction du plasmide pD-LDH ainsi que les résultats de la migration électrophorétique après coupure du plasmide extrait par les enzymes de restriction *BamH1* et *Pst1*.

Q12. Déterminer la taille approximative des fragments d'ADN obtenus après coupure par les enzymes de restriction.

Q13. Démontrer que le plasmide extrait correspond au plasmide pD-LDH.

SYNTHESE

Q14. Rédiger une synthèse regroupant l'ensemble des éléments permettant une production optimale, à moindre coût d'acide D-lactique à partir du sirop de son de blé.

Q15. Proposer un avantage de fabriquer des emballages à partir d'un bio-polymère de l'acide lactique.

DOCUMENT 1 : Chromatographie sur couche mince du sirop de son de blé

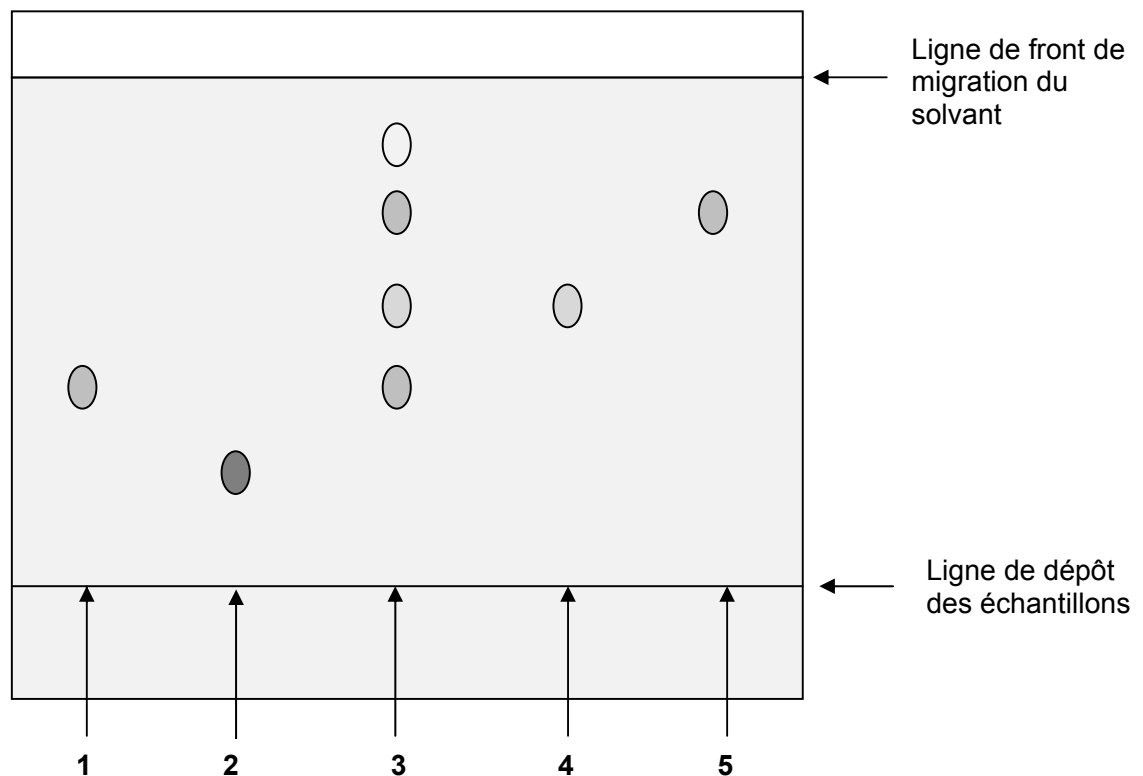
Principe

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une méthode de séparation qui permet l'identification des différents constituants d'un mélange.

Cette technique repose sur la différence de solubilité d'une substance dans deux phases non miscibles :

- la phase stationnaire, liée au support adsorbant ; c'est une couche de silice hydratée déposée sur une feuille d'aluminium ;
- la phase mobile constituée par le solvant ; le solvant est choisi pour son aptitude à solubiliser sélectivement les constituants du mélange sans réagir avec eux.

Résultats obtenus pour le sirop de son de blé



Nature des dépôts :

1. Glucose
2. Maltose
3. Echantillon de sirop de son de blé
4. Arabinose
5. Xylose

DOCUMENT 2 : Identification de la souche capable d'utiliser les glucides du son de blé

Extrait de la fiche technique de la micro-galerie « API 50 CHL Medium »

Principe : Le microorganisme à tester est mis en suspension dans le milieu « API 50 CHL Medium » puis inoculé dans chaque tube de la galerie. Chaque tube contient un glucide différent sous forme déshydratée (seule source de carbone). Pendant l'incubation, le catabolisme des glucides conduit à la production d'acides organiques qui provoquent le virage de l'indicateur de pH. Les résultats obtenus constituent le profil biochimique permettant l'identification du microorganisme à l'aide du logiciel d'identification.

Le milieu « API 50 CHL Medium » destiné à l'identification du genre *Lactobacillus* et germes apparentés est prêt à l'emploi.

Il permet l'étude de la fermentation des 49 glucides de la galerie « API 50 CHL Medium ».

Composition du milieu 50 CHL Medium

| | |
|------------------------|--------------|
| Polypeptone | 10 g |
| Extrait de levure | 5 g |
| Tween 80 | 1 mL |
| Phosphate dipotassique | 2 g |
| Acétate de sodium | 5 g |
| Citrate d'ammonium | 2 g |
| Sulfate de magnésium | 0,20 g |
| Sulfate de manganèse | 0,05 g |
| Bromocrésol pourpre | 0,17 g |
| Eau déminéralisée | qsp* 1000 mL |

*qsp : quantité suffisante pour

Zone de virage du bromocrésol pourpre (BCP) :

pH < 5,2 : jaune ; pH > 6,8 : pourpre

Profils de fermentation obtenus après 48 h d'incubation à 35°C

| Souches | Arabinose | Glucose | Maltose | Fructose | Sorbitol | Xylose |
|-------------------------------------|------------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|---------------|
| <i>Lactobacillus curvatus</i> | - | + | + | + | - | - |
| <i>Lactobacillus bif fermentans</i> | + | + | + | + | - | + |
| <i>Lactobacillus pentosus</i> | + | + | + | + | + | + |
| <i>Lactobacillus cellobiosus</i> | + | + | + | + | - | - |

Production d'acide lactique obtenue en 24 h à 35°C, pH 5,6

La culture des différentes souches est effectuée en bouillon MRS additionné de sirop de son de blé.

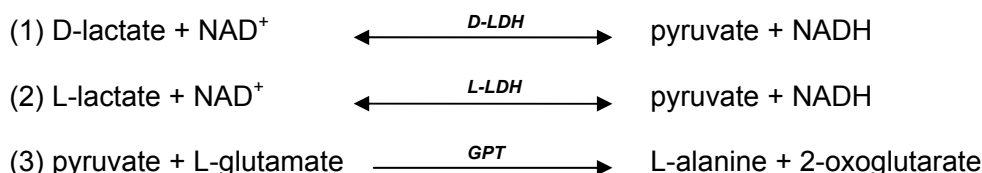
| Souches | Production d'acide lactique (en g.L⁻¹) |
|-------------------------------------|--|
| <i>Lactobacillus curvatus</i> | 1,9 |
| <i>Lactobacillus bif fermentans</i> | 5,6 |
| <i>Lactobacillus pentosus</i> | 4,8 |
| <i>Lactobacillus cellobiosus</i> | 3,2 |

DOCUMENT 3 : Extrait de la fiche technique du coffret de dosage de l'acide lactique

Principe

Le dosage de l'acide lactique dans l'échantillon nécessite que cette molécule soit consommée grâce aux réactions mises en jeu, celles-ci doivent donc être totalement déplacées vers la production de pyruvate (rôle de la réaction 3). Il est nécessaire d'attendre la fin de la réaction pour effectuer le mesurage.

Réactions mises en jeu :



D-LDH : D-lactate deshydrogénase

L-LDH : L-lactate deshydrogénase

GPT : glutamate pyruvate transaminase

L'augmentation de l'absorbance du mélange réactionnel est mesurée à 340 nm.
Le NADH absorbe à 340 nm.

Mode opératoire

Réactifs en quantité suffisante

| | |
|----|---|
| R1 | Tampon pH 10 ; L-glutamate en large excès. |
| R2 | NAD ⁺ |
| R3 | GPT |
| R4 | D-LDH |
| R5 | L-LDH |

Procédure d'essai : longueur d'onde 340 nm

| Volumes en mL | Blanc | Essai |
|---|-------|-------|
| R1 | 1 | 1 |
| R2 | 0,2 | 0,2 |
| R3 | 0,02 | 0,02 |
| Eau | 1,0 | 0,9 |
| Echantillon | 0 | 0,1 |
| Homogénéiser et lire l'absorbance A₁ | | |
| R4 | 0,02 | 0,02 |
| Homogénéiser et lire l'absorbance A₂ après 45 min | | |
| R5 | 0,02 | 0,02 |
| Homogénéiser et lire l'absorbance A₃ après 45 min | | |

Ajuster le spectrophotomètre au zéro d'absorbance contre de l'eau

Calcul du $\Delta A_{\text{ac. lactique total}}$

$$\Delta A_{\text{ac. lactique total}} = \Delta A_{\text{D-ac. lactique}} + \Delta A_{\text{L-ac. lactique}}$$

avec :

$$\text{pour l'acide D-lactique : } \Delta A_{\text{D-ac. lactique}} = (A_2 - A_1)_{\text{essai}} - (A_2 - A_1)_{\text{blanc}}$$

$$\text{pour l'acide L-lactique : } \Delta A_{\text{L-ac. lactique}} = (A_3 - A_2)_{\text{essai}} - (A_3 - A_2)_{\text{blanc}}$$

Calcul de la concentration massique en acide lactique

$$\rho_{(\text{ac. lactique}; \text{échantillon})} = \frac{\Delta A_{\text{ac. lactique total}}}{\epsilon_{\text{NADH}} \cdot \ell} \times \frac{V_{\text{MR}}}{V_{\text{échantillon}}} \times M_{\text{ac. lactique}} \times Fd$$

$$\epsilon_{\text{NADH}} = 6300 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

$$\ell : \text{trajet optique} = 1 \text{ cm}$$

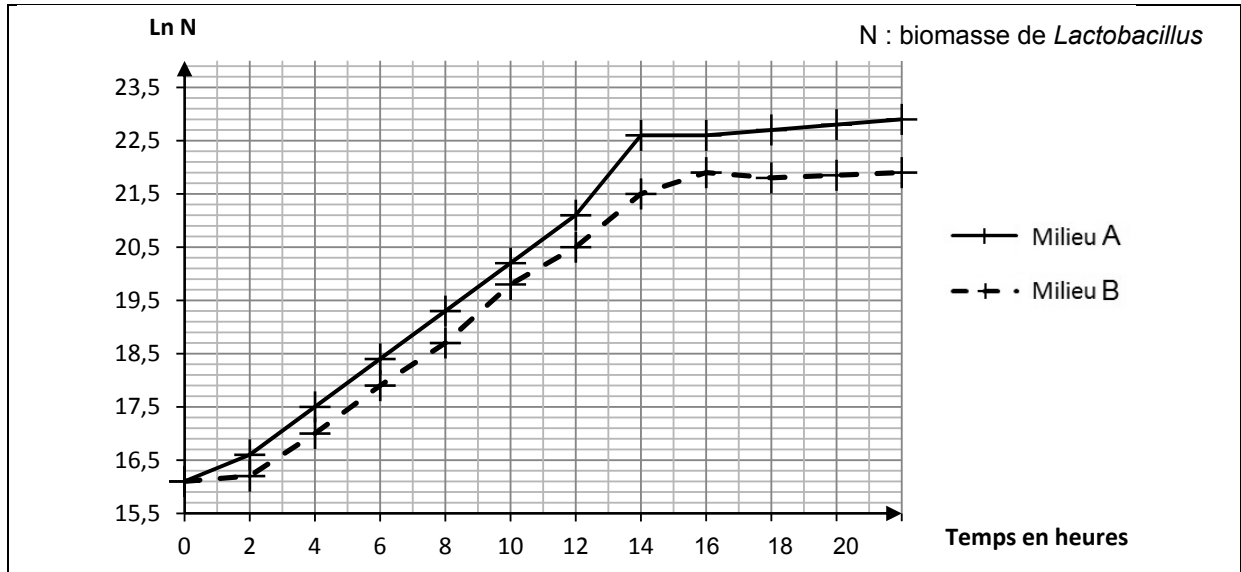
$$V_{\text{MR}} : \text{volume de milieu réactionnel}$$

$$M_{\text{ac. lactique}} = 90,1 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$

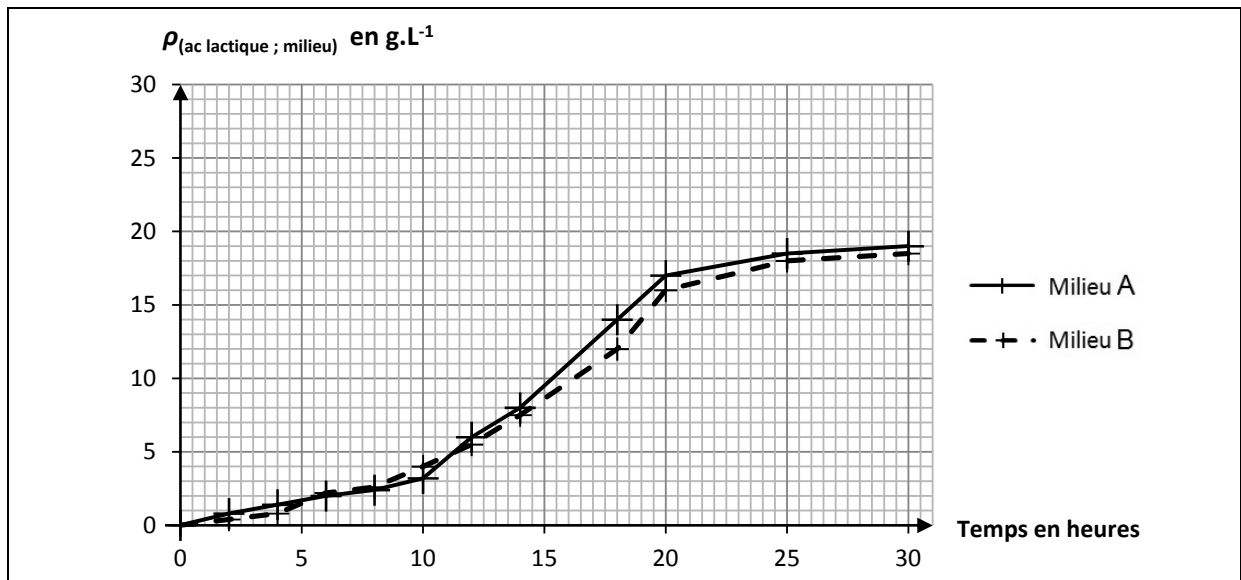
$$Fd : \text{facteur de dilution}$$

DOCUMENT 4 : Productions d'acide lactique dans deux milieux A et B

Influence du milieu de culture sur la croissance bactérienne



Influence du milieu de culture sur la production d'acide lactique

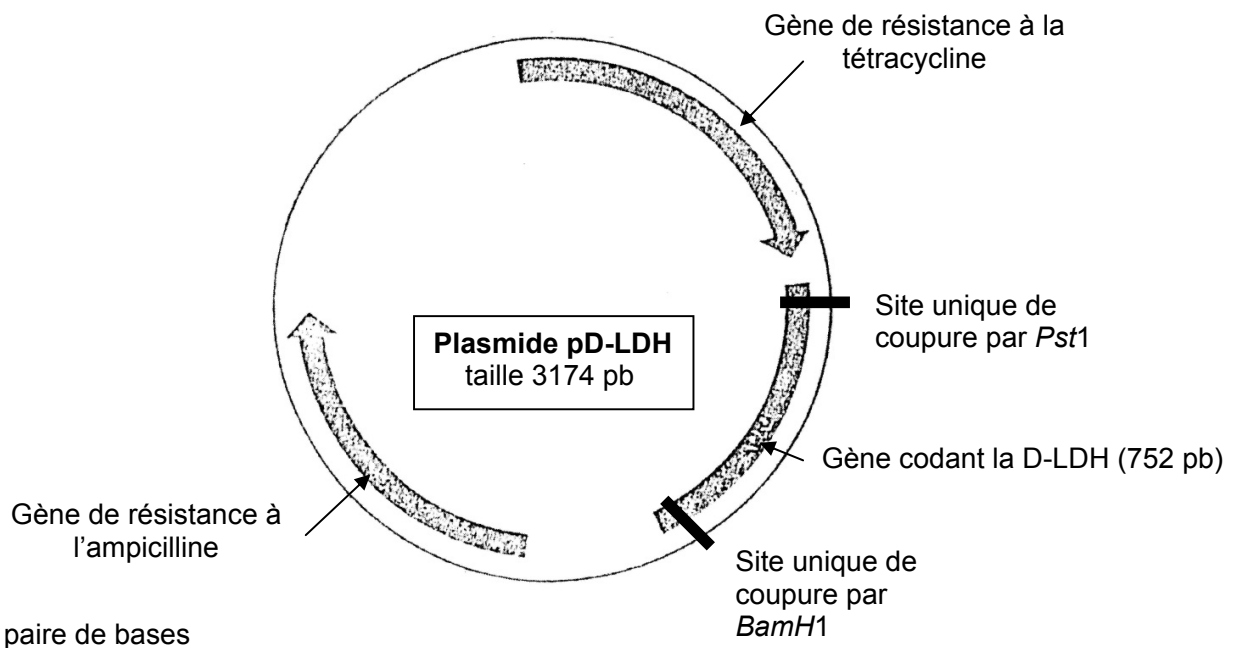


Composition des milieux A et B en g.L⁻¹

| Constituants | Milieu A | Milieu B |
|---------------------------------|----------|----------|
| Extrait de levure | 8,75 | 5 |
| Peptone de caséine | 10 | 2,5 |
| Extrait de viande | 10 | 2,5 |
| NH ₄ PO ₄ | 2 | 0,5 |
| Tween 80 | 1 | 1 |
| Phosphate dipotassique | 2 | 2 |
| Citrate de sodium | 5 | 7,5 |
| Phosphate d'ammonium | 0,2 | 3 |
| Sulfate de manganèse | 0,05 | 0,05 |

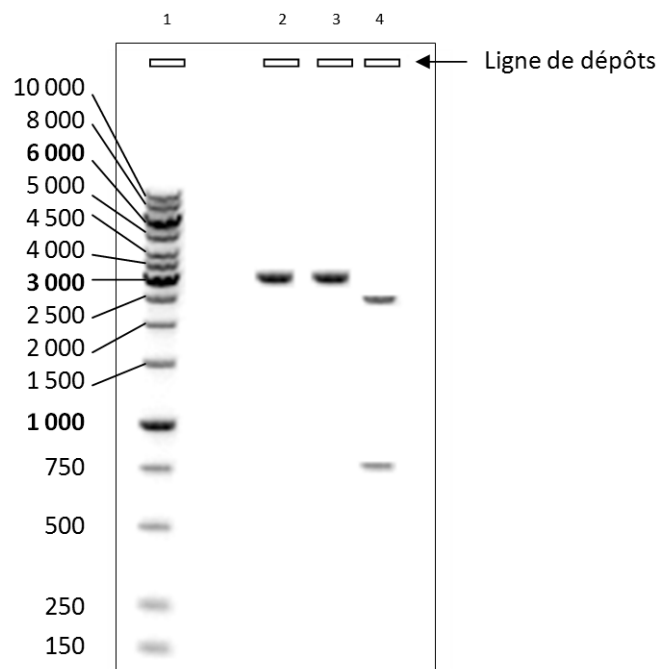
DOCUMENT 5 : Contrôle du plasmide recombinant pD-LDH

Cartographie du plasmide pD-LDH



Electrophorégramme des fragments d'ADN obtenus après coupure du plasmide extrait

L'électrophorèse sur gel d'agarose permet de séparer les fragments d'ADN chargés négativement en fonction de leur masse moléculaire.



- Piste 1 : marqueur de taille en paire de bases
- Piste 2 : plasmide extrait coupé par *Bam*H1
- Piste 3 : plasmide extrait coupé par *Pst*I
- Piste 4 : plasmide extrait coupé par *Bam*H1 et *Pst*I