

BACCALAURÉAT TECHNOLOGIQUE

Série : Sciences et Technologies de Laboratoire

Spécialité : **Biotechnologies**

SESSION 2020

LUNDI 22 JUIN 2020

Sous-épreuve écrite de Biotechnologies

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 avec mode examen actif est autorisé.
L'usage de la calculatrice sans mémoire, « type collègue » est autorisé.*

Ce sujet comporte **9** pages.

Compétences évaluées					
C1 Extraire une information	C2 Analyser un document	C3 Expliquer une démarche	C4 Argumenter une réponse	C5 Construire une synthèse	C6 S'exprimer à l'écrit
3 points	5 points	3 points	5 points	3 points	1 point

OPTIMISATION DE LA PRODUCTION DE BIOÉTHANOL DE 2^E GÉNÉRATION

Les biocarburants, comme le bioéthanol, sont des combustibles obtenus à partir de matières organiques ou de biomasse.

Dans le cas des biocarburants de 2^e génération, la biomasse est de nature ligno-cellulosique et provient de déchets végétaux issus de l'agriculture destinée à l'alimentation humaine et animale. Ainsi les déchets issus de l'exploitation de la canne à sucre, appelés « bagasse », peuvent être valorisés à l'aide d'un procédé utilisant notamment des enzymes cellulolytiques issues d'une moisissure, *Trichoderma citrinoviride*.

Afin d'être plus concurrentielle, une entreprise de la filière des biocarburants demande à son département Recherche et développement (R & D) de lancer une étude visant à augmenter les rendements et diminuer les coûts de production d'éthanol d'origine biologique.

Pour cela, le département R & D étudie le procédé de production de bioéthanol selon trois axes :

- optimiser les conditions de culture de la moisissure *Trichoderma citrinoviride* pour une production optimale des enzymes cellulolytiques ;
- étudier l'efficacité et la stabilité des enzymes cellulolytiques dans les conditions de transformation de la bagasse ;
- optimiser le rendement de production d'éthanol lors de l'étape de fermentation.

1. ÉTUDE DU PROCÉDÉ DE PRODUCTION DU BIOÉTHANOL

Plusieurs étapes sont nécessaires à la production du bioéthanol.

La biomasse ligno-cellulosique est d'abord traitée chimiquement pour éliminer la lignine et libérer la cellulose et l'hémicellulose. Ces polymères sont hydrolysés en glucose et xylose par des enzymes cellulolytiques extraites de moisissures qui les produisent naturellement. Il s'agit de cellulases, de β -glucosidases et de xylanases. Les oses produits sont finalement fermentés en éthanol par des levures.

Q1. Construire un logigramme représentant la succession de chaque étape du procédé de production du bioéthanol à partir de bagasse de canne à sucre, tel que présenté ci-dessus.

2. ÉTUDE DE L'AMÉLIORATION DES CONDITIONS DE CULTURE DE *TRICHODERMA CITRINOVIRIDE* POUR UNE PRODUCTION OPTIMALE DES ENZYMES CELLULOLYTIQUES

L'espèce *Trichoderma citrinoviride*, moisissure ubiquitaire symbiotique des plantes, est très utilisée dans le milieu industriel. Elle sécrète des enzymes exo-cellulaires capables de dégrader la biomasse ligno-cellulosique.

Afin de déterminer des conditions optimales de production des enzymes cellulolytiques, *Trichoderma citrinoviride* a été cultivée en milieu liquide spécifique dans différentes conditions de pH. La production des enzymes est évaluée par la mesure de leur activité. Les résultats obtenus pour trois enzymes d'intérêt sont présentés dans le **document 1**.

- Q2. Analyser les résultats et effectuer un choix argumenté du pH adapté à la production simultanée des trois enzymes.
- Q3. Expliquer la raison pour laquelle ces enzymes peuvent être extraites par simple centrifugation. Préciser dans quelle fraction issue de la centrifugation elles se trouveront.

3. ÉTUDE DE L'EFFICACITÉ DES ENZYMES HYDROLYTIQUES IMMOBILISÉES SUR NANOPARTICULES MAGNÉTIQUES (NPM-ENZYMES)

Après croissance dans les conditions optimales choisies précédemment, la fraction contenant les enzymes de *Trichoderma citrinoviride* est récupérée. L'extrait obtenu est traité avec des nanoparticules magnétiques (NPM) pour fixer artificiellement les différentes enzymes. On obtient les trois enzymes immobilisées : les NPM-enzymes. L'obtention et l'utilisation de ces enzymes sont présentées dans le **document 2**.

- Q4. Indiquer le ou les intérêt(s) et inconvénient(s) d'utiliser des enzymes immobilisées plutôt que des enzymes libres.
- Q5. Décrire la technique de récupération des NPM-enzymes après leur utilisation.

L'efficacité de l'hydrolyse par les NPM-enzymes est vérifiée vis-à-vis de la dégradation de la bagasse de canne à sucre prétraitée et comparée à celle d'enzymes libres. Les résultats sont présentés dans le **document 3**.

- Q6. Déterminer, en argumentant, le temps au bout duquel les enzymes libres ne sont plus actives.
- Q7. Montrer que ce phénomène n'est pas observé pour les NPM-enzymes et en déduire l'intérêt de l'immobilisation.

L'industriel met en place une procédure de cellulolyse de 48 h sur chaque lot de bagasse prétraitée. Après chaque procédure, les NPM-enzymes sont récupérées pour être réutilisées. L'entreprise souhaite vérifier que la stabilité enzymatique des NPM-enzymes est maintenue après plusieurs utilisations. La détermination des activités résiduelles est présentée dans le **document 4**.

- Q8. Analyser les résultats et conclure sur le nombre maximal d'utilisations des NPM-enzymes pour que moins de 20 % de chaque activité enzymatique soit perdue.
- Q9. Argumenter l'intérêt pour l'entreprise d'utiliser des NPM-enzymes plutôt que des enzymes libres.

4. FERMENTATION DES PRODUITS ISSUS DE L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE : PRODUCTION DE BIOÉTHANOL

La fermentation des sucres obtenus après hydrolyse enzymatique peut être réalisée par différentes souches de levures. Afin d'optimiser le rendement de production, le département R & D souhaite obtenir une souche capable d'utiliser à la fois le glucose et le xylose. Un

auxanogramme du carbone est alors réalisé avec la souche de *Saccharomyces cerevisiae* dont les résultats sont décrits dans le **document 5**.

Q10. Analyser l'auxanogramme et en déduire l'intérêt pour le département R & D de modifier la souche par recombinaison.

Le **document 6** présente la procédure d'obtention du vecteur recombiné pXR à partir du plasmide YCplac33 et du gène d'intérêt XYL1 issu d'une autre espèce de levure, *Schefferomyces stipitis*.

Le **document 7** présente les étapes ultérieures :

- l'amplification du vecteur recombinant dans une souche d'*E.coli* ;
- la transformation de *S. cerevisiae*.

Q11. Argumenter le choix des enzymes de restriction Pst I et Hind III pour la digestion du plasmide et du gène d'intérêt.

La procédure de préparation du vecteur recombinant pXR a conduit à l'obtention d'un mélange de vecteurs, pXR et YCplac33.

Parmi les bactéries transformées, il est nécessaire de différencier celles qui ont été transformées par le vecteur recombinant pXR de celles qui ont été transformées par le plasmide YCplac33.

Q12. Proposer, en argumentant, un moyen de sélectionner les bactéries *E.coli* transformées, sachant que cette souche bactérienne est sensible à l'ampicilline.

Q13. Indiquer la couleur des colonies de *E.coli* transformées par pXR après croissance sur le milieu de culture. Argumenter la réponse.

SYNTHÈSE

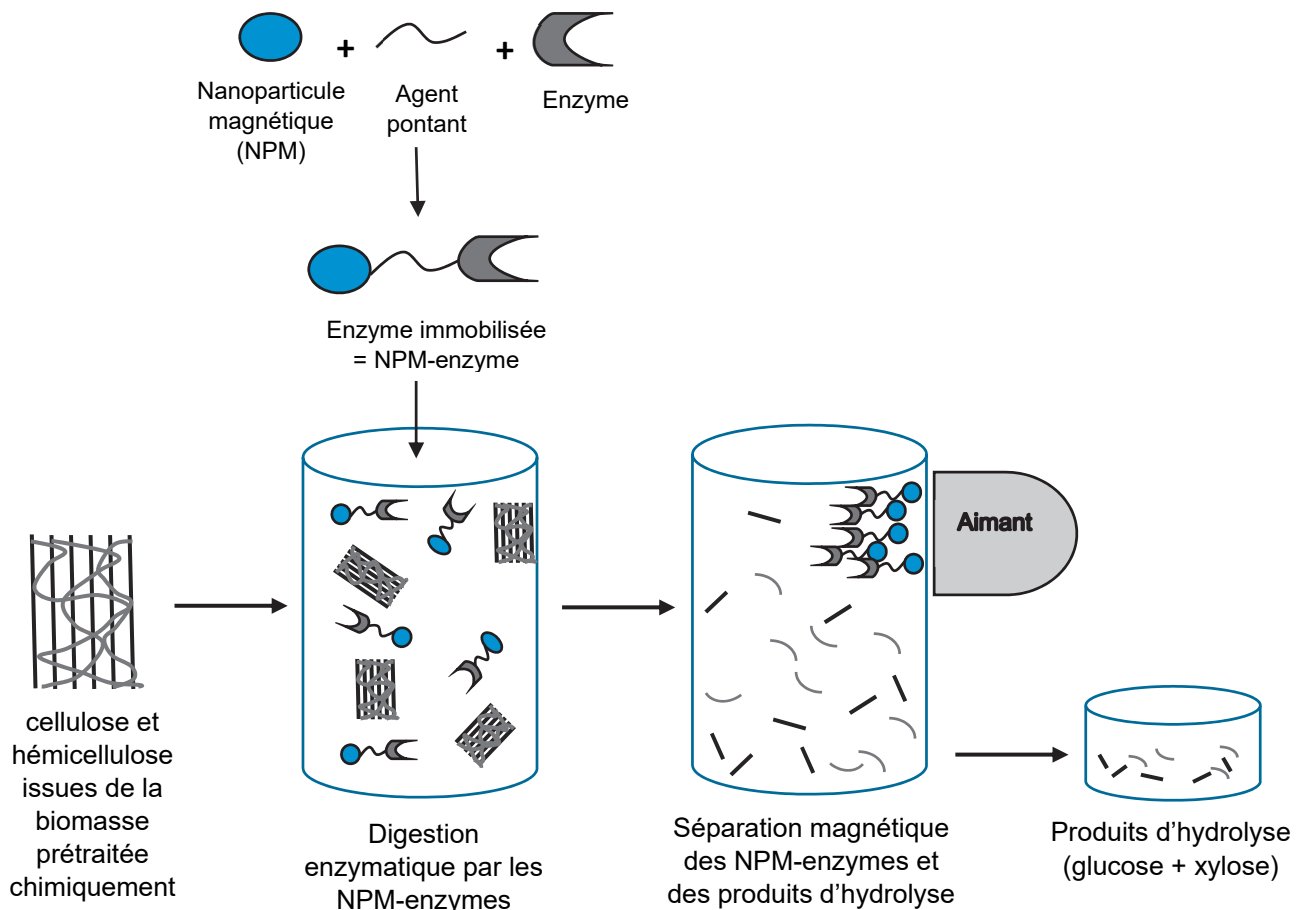
Q14. Rédiger une synthèse présentant les moyens développés par le département R & D pour améliorer les différentes étapes du procédé dans le but d'augmenter le rendement de production de bioéthanol à partir de la bagasse de canne à sucre.

DOCUMENT 1 : influence du pH du milieu sur la production des enzymes exocellulaires chez *Trichoderma citrinoviride* à 30 °C.

pH du milieu de culture	Activité enzymatique en U · g ⁻¹ de biomasse sèche		
	Cellulase	β-Glucosidase	Xylanase
3,0 ± 0,1	204 ± 3	250 ± 4	9047 ± 15
4,0 ± 0,1	287 ± 2	696 ± 3	40188 ± 16
5,0 ± 0,1	384 ± 5	695 ± 5	55000 ± 20
6,0 ± 0,1	386 ± 4	510 ± 4	40547 ± 19
7,0 ± 0,1	150 ± 3	277 ± 3	30487 ± 20
8,0 ± 0,1	89 ± 3	187 ± 2	19147 ± 18

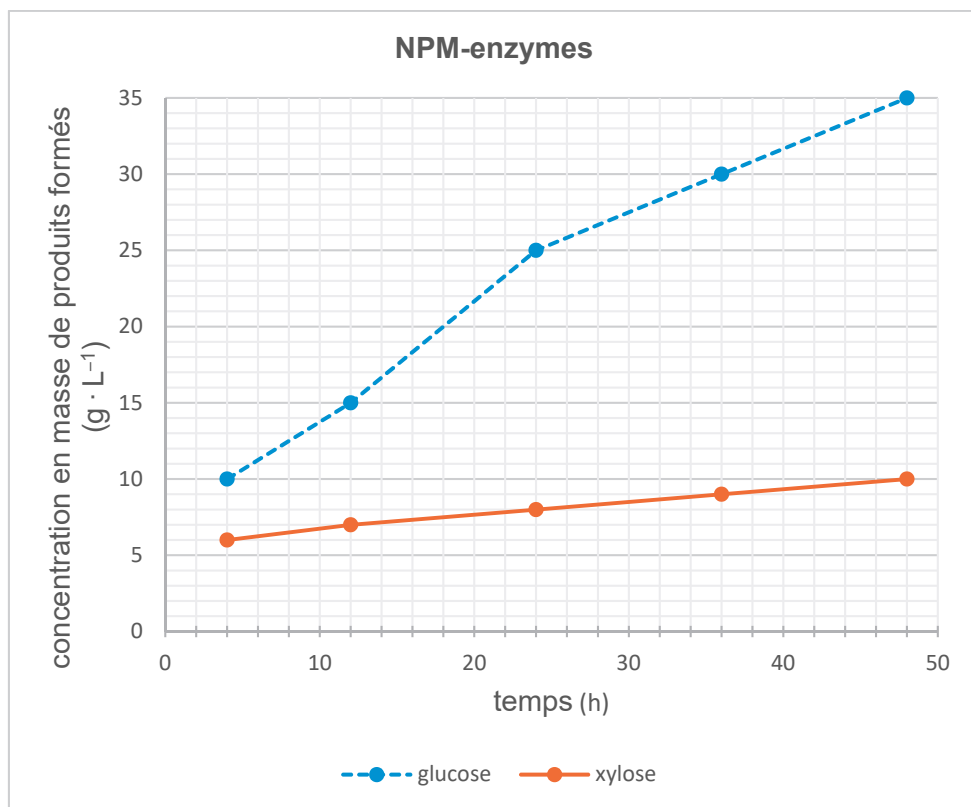
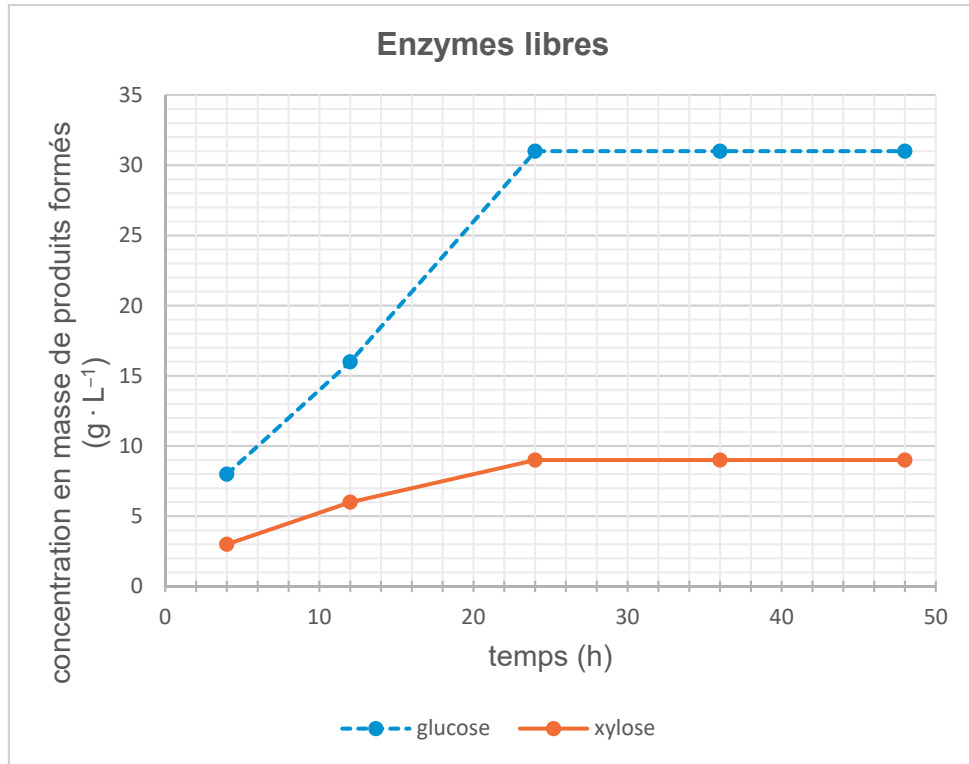
DOCUMENT 2 : obtention et utilisation des enzymes immobilisées sur des nanoparticules magnétiques (NPM-enzymes).

Les enzymes immobilisées sont des enzymes liées par des moyens physico-chimiques sur des nanoparticules magnétiques. L'immobilisation tend à diminuer leur activité par masquage d'une partie des sites actifs. Toutefois, en industrie, les enzymes sont souvent utilisées sous cette forme car l'immobilisation augmente leur stabilité dans le temps et les rend plus résistantes à la dénaturation. L'immobilisation permet aussi leur réutilisation pour plusieurs cycles d'hydrolyse grâce aux propriétés des particules sur lesquelles elles sont fixées.



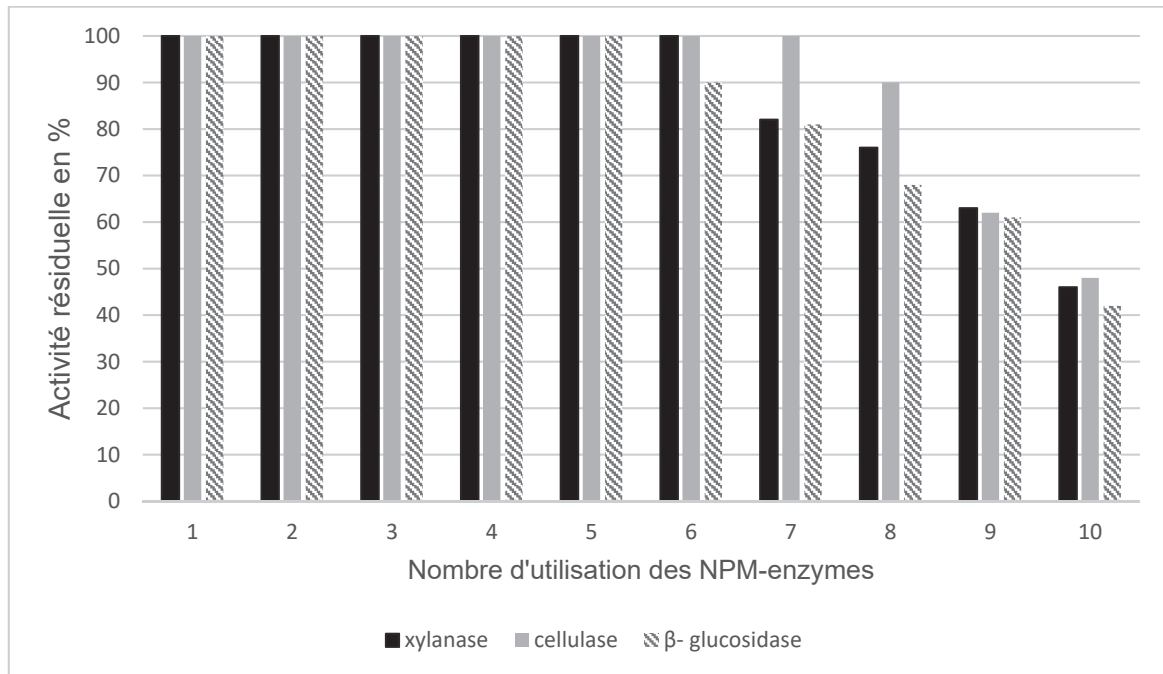
DOCUMENT 3 : étude de l'efficacité hydrolytique des enzymes libres et immobilisées.

Les expériences sont réalisées avec des quantités d'enzymes libres ou immobilisées équivalentes et en présence d'une quantité identique de biomasse prétraitée.



DOCUMENT 4 : étude de la stabilité des NPM-enzymes.

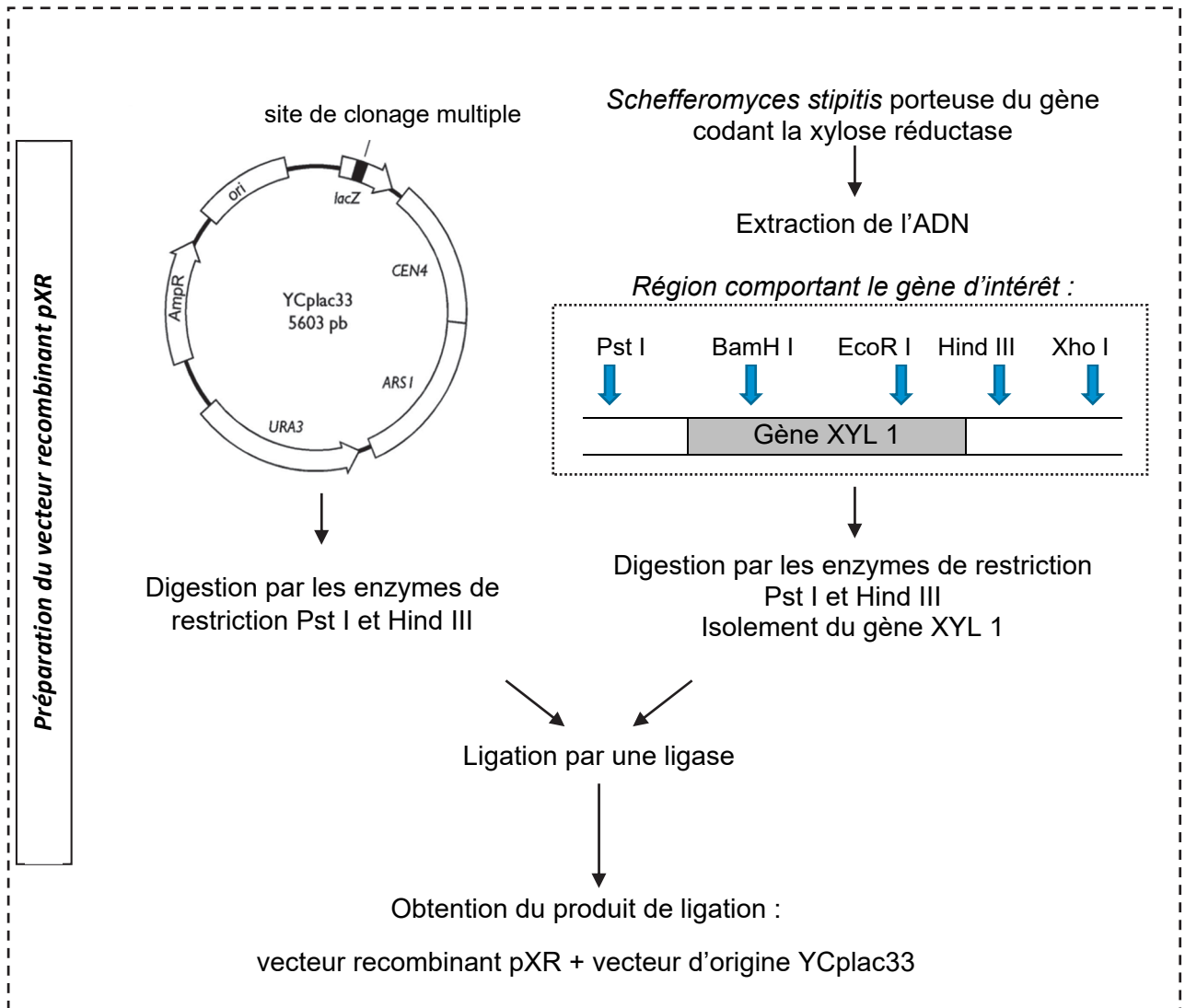
Les mesures d'activités résiduelles sont réalisées pour des quantités d'enzymes immobilisées équivalentes et en présence d'une quantité identique de biomasse initiale.



DOCUMENT 5 : auxanogramme de la souche *Saccharomyces cerevisiae*.

	Unique source de carbone				
	Glucose	Glycérol	Arabinose	Xylose	Galactose
Aspect du milieu de culture après incubation	Trouble	Limpide	Limpide	Limpide	Trouble

DOCUMENT 6 : démarche d'obtention du vecteur recombinant pXR.



Éléments du plasmide YRplac33 :

AmpR : gène de résistance à l'ampicilline.

LacZ : gène de la β -galactosidase. Pour vérifier la présence ou l'absence de l'activité enzymatique β -galactosidase, le milieu de culture est additionné de X-gal, un galactoside incolore dont l'hydrolyse par la β -galactosidase donne un produit coloré en bleu.

ori : origine de réplication bactérienne.

ARS I : origine de réplication de levure.

URA3 : gène de synthèse de l'uracile.

Site de clonage multiple : comporte de nombreux sites de restriction.

DOCUMENT 7 : démarches d'amplification du vecteur recombinant dans *E. coli* et de transformation de *S. cerevisiae*.

