

BACCALAURÉAT TECHNOLOGIQUE

Série : Sciences et Technologies de Laboratoire

Spécialité : Biotechnologies

SESSION 2017

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 est autorisé.

Compétences évaluées :					
C1	C2	C3	C4	C5	C6
Extraire une information	Analyser un document	Expliquer une démarche	Argumenter une réponse	Construire une synthèse	S'exprimer à l'écrit
1 point	7 points	5 points	3 points	3 points	1 point

Ce sujet comporte 8 pages.

OPTIMISATION D'UN PROCÉDÉ DE PRODUCTION DE PÉNICILLINE

La pénicilline, antibiotique découvert en 1928 par Alexander Fleming, est une molécule produite par une moisissure du genre *Penicillium*.

La production industrielle des antibiotiques nécessite de cultiver le microorganisme producteur dans des conditions optimales (milieu de culture, température, pH, oxygénation) pour la croissance de la souche comme pour la production d'antibiotique.

Un industriel souhaite optimiser son procédé de production. Dans les conditions actuelles, après six jours de culture, la productivité volumique est de 7 g de pénicilline par litre de milieu. L'objectif est d'atteindre, dans le même délai, une concentration minimale de 9 g·L⁻¹. L'industriel envisage de changer le milieu de culture de la souche sélectionnée, notamment pour améliorer le temps de génération G actuellement de 10 h.

La démarche d'optimisation du procédé de fabrication impose de :

- contrôler la souche sélectionnée avant l'ensemencement en fermenteur ;
- suivre la croissance de cette souche dans le nouveau milieu de culture ;
- évaluer la production de pénicilline par dosage immuno-enzymatique.

1. CONTROLE DE LA SOUCHE PRODUCTRICE DE PÉNICILLINE

Le contrôle de pureté de la souche avant ensemencement en fermenteur est réalisé sur gélose Sabouraud. La composition de ce milieu est fournie dans le **document 1**.

Q1. Expliquer le choix de ce milieu pour cultiver la souche productrice de pénicilline.

La moisissure ainsi isolée est observée au microscope optique après coloration. Des photographies annotées de moisissures A et B observées au microscope grossies 400 fois sont présentées dans le **document 2**.

Q2. Utiliser le **tableau du document 2** pour identifier, en précisant la démarche, laquelle des moisissures A ou B observées, est la souche d'intérêt isolée.

2. PRODUCTION DE PÉNICILLINE EN FERMENTEUR

Afin de déterminer les conditions optimales de croissance pour la production de pénicilline, la souche isolée de *Penicillium* est cultivée dans trois milieux de culture M1, M2 et M3, de compositions différentes. Les résultats de croissance et de production d'antibiotique par gramme de biomasse, sont présentés dans le **document 3**.

Q3. Argumenter le choix du milieu M2 pour la production de l'antibiotique.

La souche sélectionnée est cultivée dans le milieu M2, à une température de 22 °C, pendant six jours. Les suivis de croissance et de production de pénicilline, effectués en parallèle, sont présentés dans le **document 4**.

Q4. Analyser la courbe de croissance pour identifier les différentes phases et leur durée respective.

Q5. A l'aide de la courbe et de l'équation aux grandeurs ci-après, déterminer la vitesse spécifique de croissance (μ_{expo} ou $Q_{x \text{ expo}}$) de la souche au cours de la phase exponentielle de croissance, exprimée en h^{-1} .

Donnée : équation aux grandeurs
$$\mu_{\text{expo}} = Q_{x \text{ expo}} = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1}$$

Q6. Déterminer, graphiquement ou par le calcul, le temps de génération G , exprimé en h .

Donnée : équation aux grandeurs
$$G = \frac{\ln 2}{\mu_{\text{expo}}}$$

Q7. Analyser la courbe représentant l'évolution de la concentration en masse en pénicilline au cours du temps en identifiant les phases de la courbe de croissance au cours desquelles la pénicilline est produite.

Q8. À l'aide du **document 5**, préciser à quel type de métabolite appartient la pénicilline.

Q9. Déterminer graphiquement la concentration en masse en pénicilline obtenue après 140 heures de culture.

3. DOSAGE IMMUNO-ENZYMATIQUE DE LA PÉNICILLINE PRODUITE

Le **document 6** présente le mode opératoire de détermination de la concentration en masse en pénicilline par méthode immuno - enzymatique ELISA. La réalisation du dosage de la pénicilline nécessite de préparer une gamme d'étalonnage de concentration en masse en pénicilline. Les cupules correspondant à la gamme sont traitées en même temps que les essais dans la même microplaque.

Q10. À l'aide de la légende fournie, schématiser **sur la copie** l'édifice moléculaire obtenu à l'issue de chacune des étapes **3, 5 et 7**.

Q11. Expliquer le rôle du lavage avec du tampon PBS-Tween de l'étape **4**.

Q12. Identifier la couleur attendue dans les cupules positives. Expliquer ce résultat.

En parallèle de la gamme d'étalonnage, un témoin de spécificité est réalisé avec du milieu de culture stérile à la place de la pénicilline.

Q13. Décrire le résultat attendu et expliquer l'intérêt de ce témoin.

L'intensité de coloration du pNP est mesurée par spectrophotométrie et les résultats obtenus sont présentés dans le **document 7**. Dans le domaine de linéarité de la courbe d'étalonnage, la grandeur $A_{(\text{pNP à } 405 \text{ nm})}$ est proportionnelle à la grandeur $\ln(\rho_{(\text{pénicilline ; solution étalon})})$.

Q14. Repérer les valeurs de $\ln(\rho_{(\text{pénicilline ; solution étalon})})$ délimitant le domaine de linéarité de la courbe d'étalonnage. Relever les valeurs de $\rho_{(\text{pénicilline ; solution étalon})}$ correspondantes.

L'échantillon de milieu de culture de la souche étudiée dans le **document 4**, est prélevé après 140 heures de culture. Il est dilué au 1/400 puis analysé par méthode ELISA.

Q15. Montrer la nécessité de diluer cet échantillon de milieu de culture pour réaliser le dosage immuno-enzymatique.

Pour l'échantillon dilué, l'absorbance mesurée à 405 nm contre le blanc réactif est égale à 0,280.

Q16. À l'aide du **document 7**, déterminer la concentration en masse en pénicilline en $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ dans cet échantillon (à $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ près). Expliquer la démarche.

SYNTHÈSE

Q17. En rappelant les objectifs à atteindre, rédiger une synthèse pour montrer que les conditions de culture de la souche sélectionnée permettent l'optimisation souhaitée par l'industriel.

DOCUMENT 1 : Gélose Sabouraud

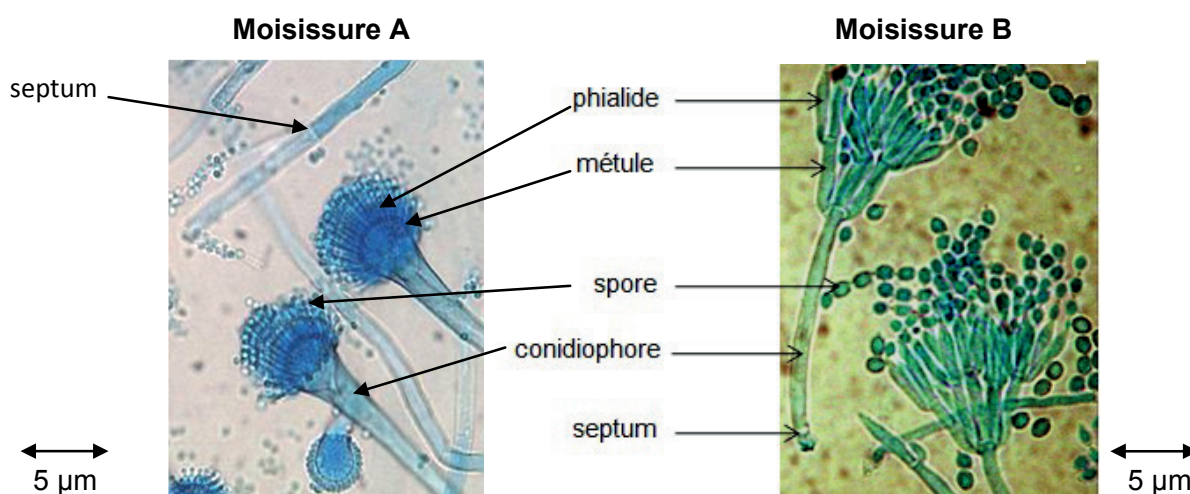
La gélose Sabouraud est recommandée pour l'isolement des levures et des moisissures, micro-organismes acidophiles.

Formule type pour 1 litre de milieu :

- Peptone pepsique de viande10,0 g
 - Glucose.....20,0 g
 - Agar agar.....15,0 g
- pH du milieu à 25 °C : 5,7 ± 0,2

DOCUMENT 2 : Caractères morphologiques des moisissures

2.a Observation microscopique des moisissures A et B (x 400)



2.b Tableau d'identification morphologique des moisissures

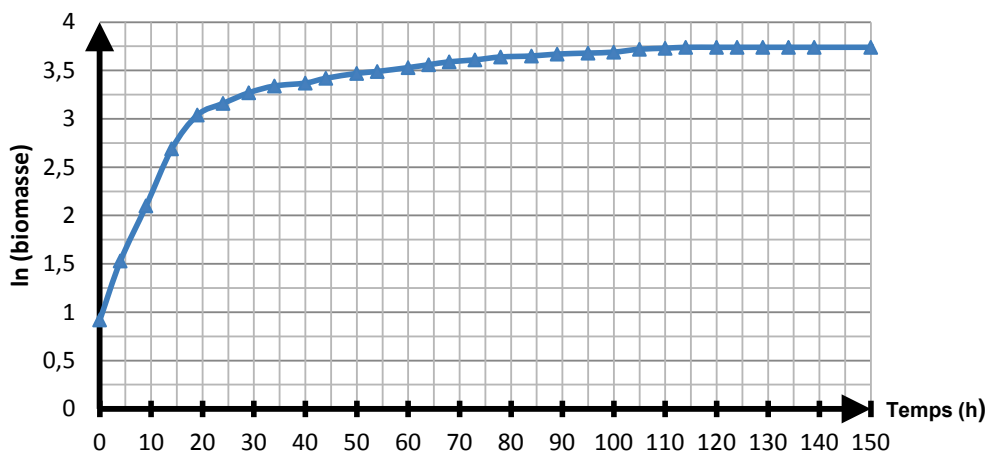
Hyphes	Spores	Structure microscopique	Genre
Septés	Externes	Conidiophore terminé en vésicule ou en « pomme d'arrosoir ». Conidiophore portant des métules ramifiées en phialides qui donnent naissance à des chaînes de spores.	<i>Aspergillus</i>
		Conidiophore avec un aspect « en pinceau ». Conidiophore portant des métules ramifiées en phialides qui donnent naissance à des chaînes de spores.	<i>Penicillium</i>
Non septés	Internes	Sporange contenant des spores internes, porté par un sporangiophore.	<i>Mucor</i>
		Sporangiophore en bouquet présentant des structures ressemblant à des racines.	<i>Rhizopus</i>

DOCUMENT 3 : Culture de la souche sélectionnée.

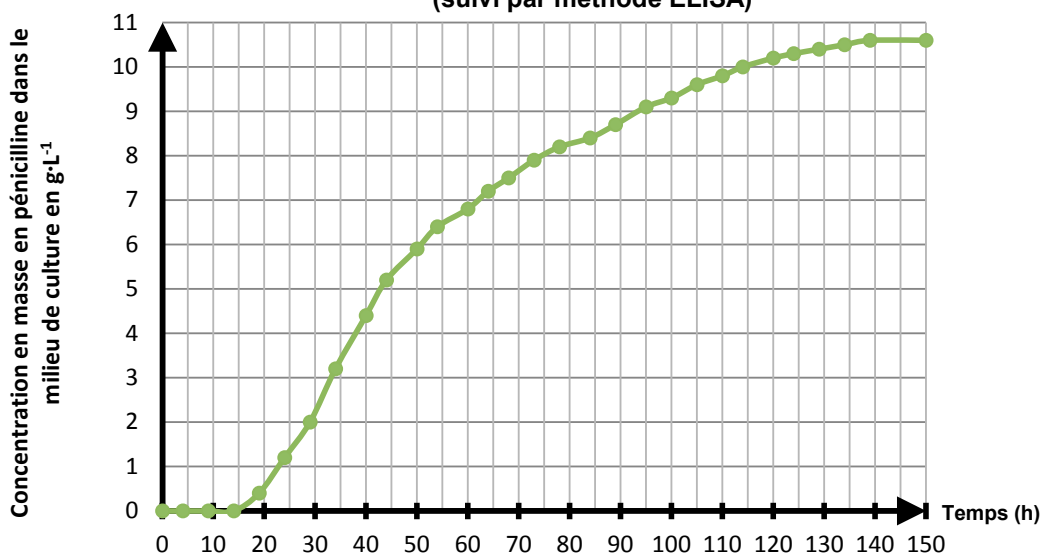
Milieu de culture	M1	M2	M3
Temps de génération en heure	4	7	10
Quantité de pénicilline produite par gramme de biomasse	+	++	++

DOCUMENT 4 : Suivi de croissance de la souche sélectionnée et de la production de pénicilline en milieu M2 et à 22 °C

Evolution de la biomasse de la souche sélectionnée en fonction du temps



Evolution, en fonction du temps, de la concentration en masse en pénicilline (suivi par méthode ELISA)



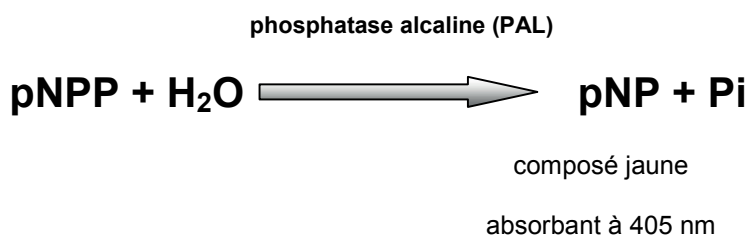
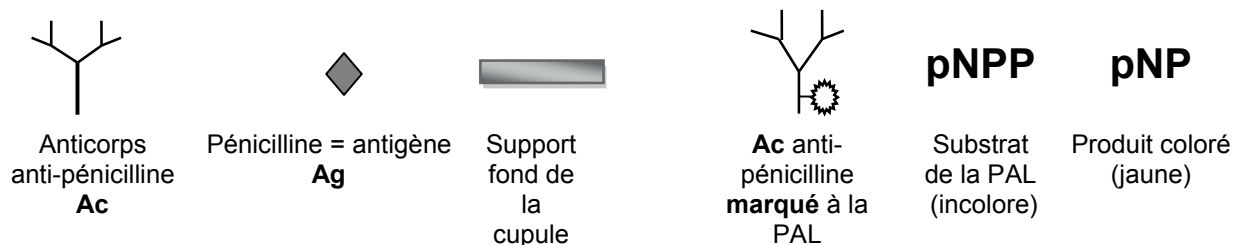
DOCUMENT 5 : Les différents types de métabolites

Type de métabolite	Définition
Métabolite primaire	Molécule indispensable à la cellule, produite dès la phase exponentielle de croissance.
Métabolite secondaire	Molécule produite après la fin de la phase exponentielle de croissance.

DOCUMENT 6 : Mode opératoire de détermination de la concentration en masse en pénicilline par une technique ELISA en microplaque

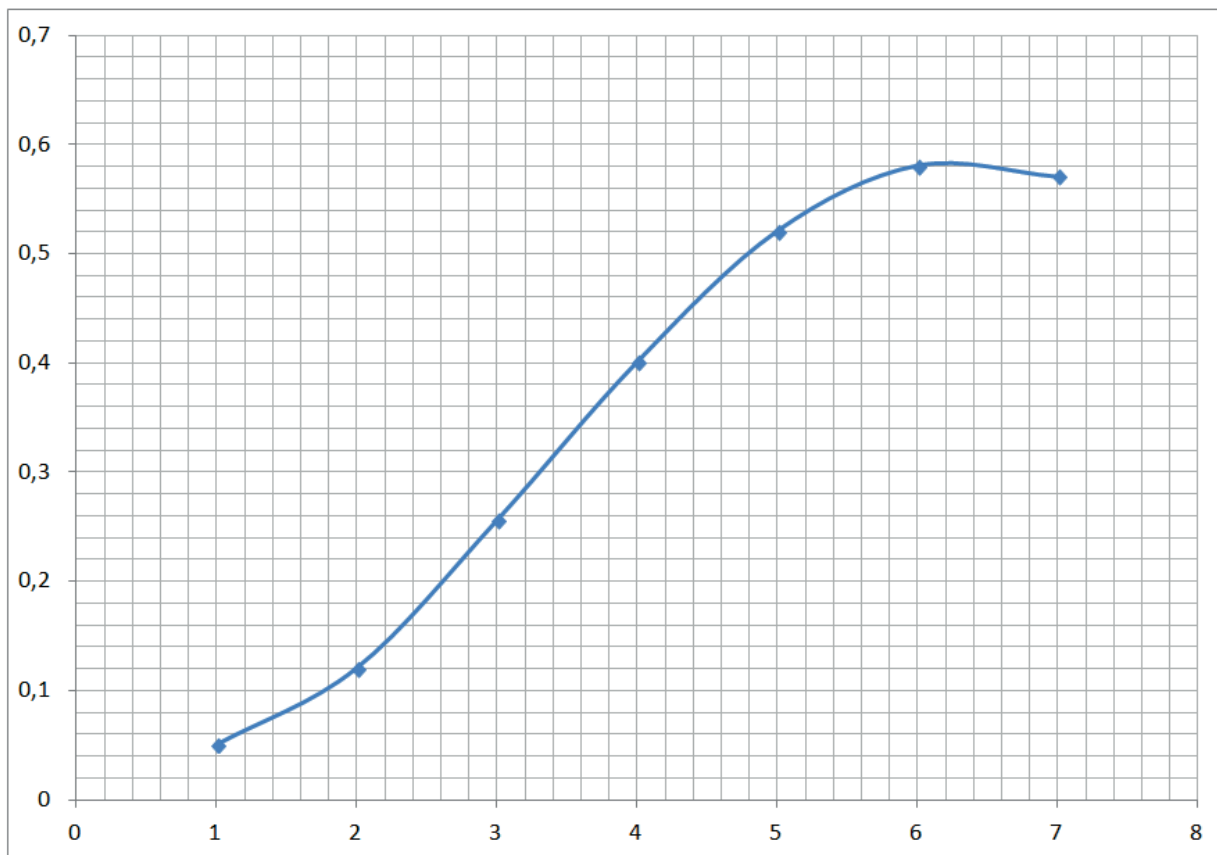
N° de l'étape	Instructions
1	- Fixer 200 µL d' Ac dans le fond des cupules de la microplaque.
2	- Incuber 3 heures à 37 °C. - Vider les cupules et laver avec du tampon PBS. - Saturer les sites non spécifiques avec un tampon de saturation. - Laver trois fois avec du PBS-Tween.
3	- Ajouter 100 µL de la solution d' Ag correspondante, dans chaque cupule de la gamme et des essais.
4	- Incuber 1 heure à température ambiante. - Laver 3 fois avec du PBS-Tween.
5	- Ajouter 100 µL d' Ac marqué .
6	- Agiter et incuber 1 heure à 37 °C. - Laver et rincer 3 fois avec du PBS Tween.
7	- Ajouter 150 µL de substrat. - Incuber 15 minutes à 37 °C.
8	- Ajouter 50 µL de solution d'arrêt (NaOH à 1 mol·L ⁻¹).
9	- Mesurer l'absorbance à 405 nm.

Légende à utiliser pour les schémas :



DOCUMENT 7 : Courbe d'étalonnage du dosage immunoenzymatique de la pénicilline par la technique ELISA

A (pNP à 405 nm contre blanc réactif)



$\ln(\rho_{\text{(pénicilline ; solution étalon)}} \text{ (mg·L}^{-1}\text{)})$

Tableau de correspondance entre les grandeurs $\ln(\rho_{\text{(pénicilline ; solution étalon)}} \text{ (mg·L}^{-1}\text{)})$ et $\rho_{\text{(pénicilline ; solution étalon)}} \text{ (mg·L}^{-1}\text{)}$

$\ln(\rho_{\text{(pénicilline ; solution étalon)}} \text{ (mg·L}^{-1}\text{)})$	$\rho_{\text{(pénicilline ; solution étalon)}} \text{ (mg·L}^{-1}\text{)}$	$\ln(\rho_{\text{(pénicilline ; solution étalon)}} \text{ (mg·L}^{-1}\text{)})$	$\rho_{\text{(pénicilline ; solution étalon)}} \text{ (mg·L}^{-1}\text{)}$	$\ln(\rho_{\text{(pénicilline ; solution étalon)}} \text{ (mg·L}^{-1}\text{)})$	$\rho_{\text{(pénicilline ; solution étalon)}} \text{ (mg·L}^{-1}\text{)}$
1,0	2,72	3,2	24,53	5,4	221,41
1,2	3,32	3,4	29,96	5,6	270,43
1,4	4,06	3,6	36,60	5,8	330,30
1,6	4,95	3,8	44,70	6,0	403,43
1,8	6,05	4,0	54,60	6,2	492,75
2,0	7,39	4,2	66,69	6,4	601,85
2,2	9,03	4,4	81,45	6,6	735,10
2,4	11,02	4,6	99,48	6,8	897,85
2,6	13,46	4,8	121,51	7,0	1096,63
2,8	16,44	5,0	148,41	7,2	1339,43
3,0	20,09	5,2	181,27	7,4	1635,98