

# 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.

Ce sujet comporte 10 pages.

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

*L'usage de la calculatrice est autorisé.*

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

## SÉLECTION ET PRODUCTION D'UNE SOUCHE D'ASPERGILLUS UTILISÉE POUR LA PRODUCTION DE SAKÉ

Les moisissures du genre *Aspergillus* sont très largement utilisées dans l'industrie agro-alimentaire en Asie. Elles sont en particulier utilisées dans la production de saké, un vin de riz, titrant de 14 à 17 degrés alcooliques, exprimé en % ( $\frac{V}{V}$ ).

Au Japon, sa préparation se fait en ensemençant un mélange de riz et d'eau avec une culture pure d'une souche d'*Aspergillus* sélectionnée parmi trois espèces utilisées traditionnellement :

- *Aspergillus oryzae* ;
- *Aspergillus sojae* ;
- *Aspergillus kawachii*.

Certaines souches de moisissures du genre *Aspergillus* produisent des aflatoxines qui sont des toxines cancérigènes ne devant en aucun cas être retrouvées dans les aliments. Il convient ainsi, pour la production du saké, de sélectionner une espèce d'*Aspergillus* qui ne produit pas d'aflatoxine.

Une entreprise biotechnologique souhaite produire et commercialiser une de ces souches. Elle doit donc :

- optimiser sa production en déterminant les conditions de croissance optimales des moisissures du genre *Aspergillus* ;
- sélectionner la souche la plus adaptée à la production de saké, en choisissant une souche d'*Aspergillus*
  - ne produisant pas d'aflatoxine ;
  - permettant d'obtenir la meilleure fermentation.

### 1. DÉTERMINATION DES CONDITIONS OPTIMALES DE CULTURE DES MOISSURES DU GENRE *ASPERGILLUS*

L'entreprise souhaite déterminer les conditions optimales de culture du genre *Aspergillus*. Elle réalise, en bioréacteur, des expériences de production de biomasse en faisant varier certains paramètres physico-chimiques du milieu de culture.

Le **document 1** présente le bioréacteur utilisé.

**Q1.** À l'aide du **document 1**, identifier les dispositifs techniques du bioréacteur permettant de faire varier le pH, la température et l'oxygénation du milieu.

Les résultats obtenus pour les expériences de production de biomasse sont présentés sur le **document 2**.

**Q2.** À partir de l'analyse des courbes appropriées du **document 2**, déterminer les conditions optimales de pH et de température pour la croissance d'*Aspergillus*.

Une production test est en cours dans un fermenteur de l'entreprise. Le dispositif de régulation du pH est défaillant. L'alarme ne se déclenche que lorsque le pH est descendu à 4. La diminution de la concentration en biomasse par rapport à celle obtenue au pH optimum est alors de  $10 \text{ g.L}^{-1}$ .

**Q3.** Calculer la perte de biomasse en g pour un réacteur de 100 L.

Pour limiter cette perte de biomasse, l'entreprise souhaite que l'alarme se déclenche pour une diminution de la concentration en biomasse de  $3 \text{ g.L}^{-1}$ .

**Q4.** A l'aide du **document 2**, estimer les valeurs seuils de pH à partir desquelles l'alarme doit se déclencher.

## **2. RECHERCHE DE LA PRODUCTION D' AFLATOXINE PAR LES TROIS SOUCHES INDUSTRIELLES D' ASPERGILLUS**

L'aflatoxine est une molécule cancérigène dont la synthèse nécessite l'intervention de nombreuses enzymes.

Afin d'identifier les souches ne produisant pas d'aflatoxine, l'entreprise recherche la présence de l'un des gènes nécessaires à la biosynthèse de l'aflatoxine dans le génome des trois espèces d'*Aspergillus* traditionnellement utilisées.

Pour cela, une technique de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) est réalisée, à l'aide d'amorces spécifiques de ce gène, à partir de l'ADN extrait de chaque espèce. Le fragment amplifié mesure 750 pb.

Les produits de réactions de PCR sont analysés par électrophorèse en gel d'agarose et l'électrophorégramme obtenu est présenté sur le **document 3**.

**Q5.** Expliquer le rôle des pistes 1 et 6 du **document 3**.

**Q6.** Analyser l'électrophorégramme obtenu pour valider la manipulation.

**Q7.** Analyser les résultats obtenus pour chacune des trois souches d'*Aspergillus* testées.

**Q8.** Conclure en lien avec l'objectif de l'entreprise.

## **3. RECHERCHE DE LA SOUCHE AYANT LA CAPACITÉ DE FERMENTATION OPTIMALE**

Pour pouvoir fermenter l'amidon du riz, il faut que la souche sélectionnée soit capable d'hydrolyser l'amidon en maltose grâce à l' $\alpha$ -amylase et ensuite de fermenter ce maltose en éthanol.

### **3.1. Détermination des paramètres cinétiques de l'alpha-amylase des différentes souches industrielles d'Aspergillus**

Un laboratoire de recherche a extrait les molécules d' $\alpha$ -amylase de chacune des trois souches disponibles et cherche à déterminer leurs paramètres cinétiques ( $K_M$  et  $v_{i \max}$ ).

**Q9.** A l'aide du **document 4**, estimer la vitesse initiale maximale ( $v_{i \max}$ ) de la réaction catalysée par l' $\alpha$ -amylase extraite d'*Aspergillus oryzae*.

**Q10.** Expliquer la démarche permettant d'en déduire que la constante de Michaelis ( $K_M$ ) pour cette enzyme est de  $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ .

**Q11.** A partir des paramètres cinétiques estimés pour *Aspergillus oryzae* et des informations du **document 5**, argumenter le choix de la ou des espèces d'*Aspergillus* les plus favorables pour la production de saké.

### 3.2. Dosage de l'éthanol produit dans les sakés par les différentes souches d'*Aspergillus*

L'entreprise souhaite déterminer la concentration en éthanol obtenue lors de la fermentation de riz pour chacune des espèces d'*Aspergillus*. Elle utilise un coffret de dosage enzymatique dont la fiche technique est présentée dans le **document 6**.

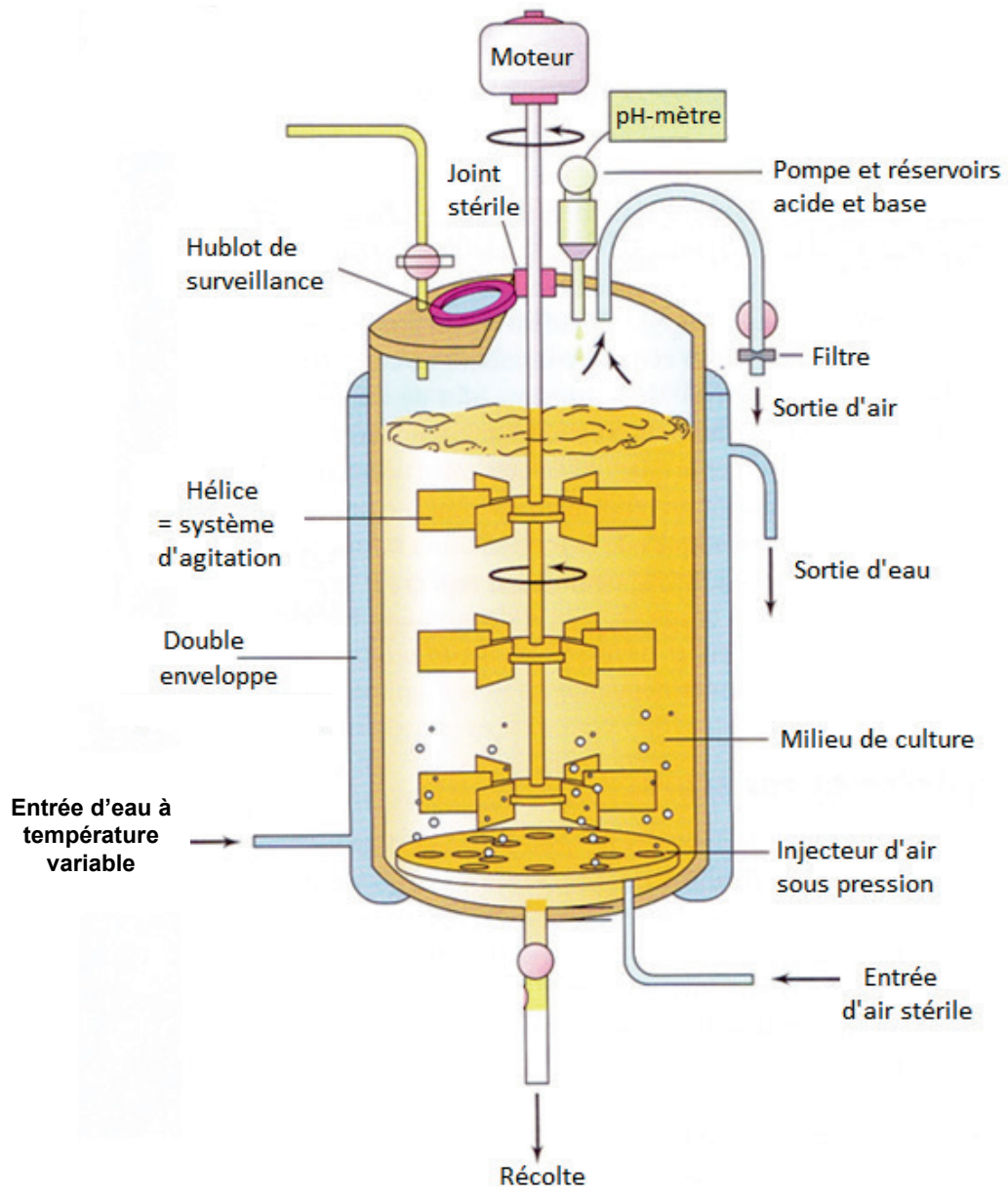
Les indications et valeurs mesurées obtenues pour les trois souches disponibles sont présentées dans le **document 7**.

- Q12.** A l'aide du **document 6**, identifier les substrat(s) et enzyme(s) apportés par la solution réactionnelle.
- Q13.** A partir de l'équation aux grandeurs de la concentration en masse en éthanol, notée  $\rho_{\text{(éthanol; solution essai)}}$ , fournie dans le **document 6**, établir l'équation aux unités.
- Q14.** A l'aide des **documents 6 et 7**, écrire l'équation aux valeurs numériques puis calculer la concentration en masse en éthanol du saké C, exprimée en  $\text{g.L}^{-1}$ .
- Q15.** A l'aide du **document 8**, écrire l'équation aux valeurs numériques puis retrouver le titre du saké C exprimé en degré alcoolique, noté  $\% \left(\frac{V}{V}\right)$ .
- Q16.** Choisir la ou les espèces permettant d'obtenir un titre alcoolique suffisant pour la production de saké.

#### SYNTHÈSE

- Q17.** Rédiger une courte synthèse argumentant le choix de la souche d'*Aspergillus* la plus adaptée à la production de saké, en précisant les conditions optimales de développement de cette souche.

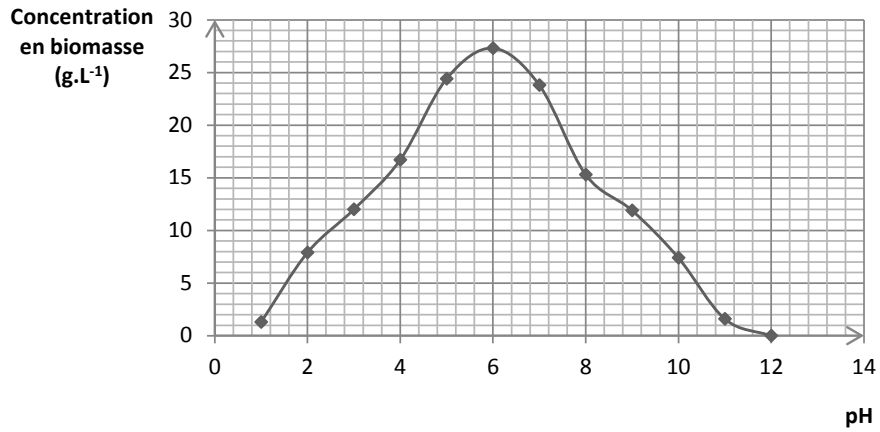
**DOCUMENT 1 - Schéma d'un bioréacteur industriel utilisé pour la production de biomasse.**



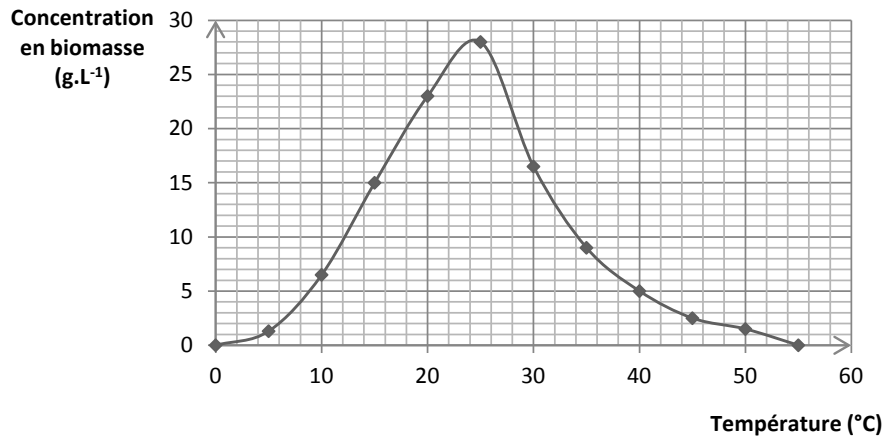
## DOCUMENT 2 - Etude des conditions de croissance d'*Aspergillus*

Les graphiques représentent l'évolution de la biomasse obtenue en phase stationnaire de croissance, pour différentes conditions de culture.

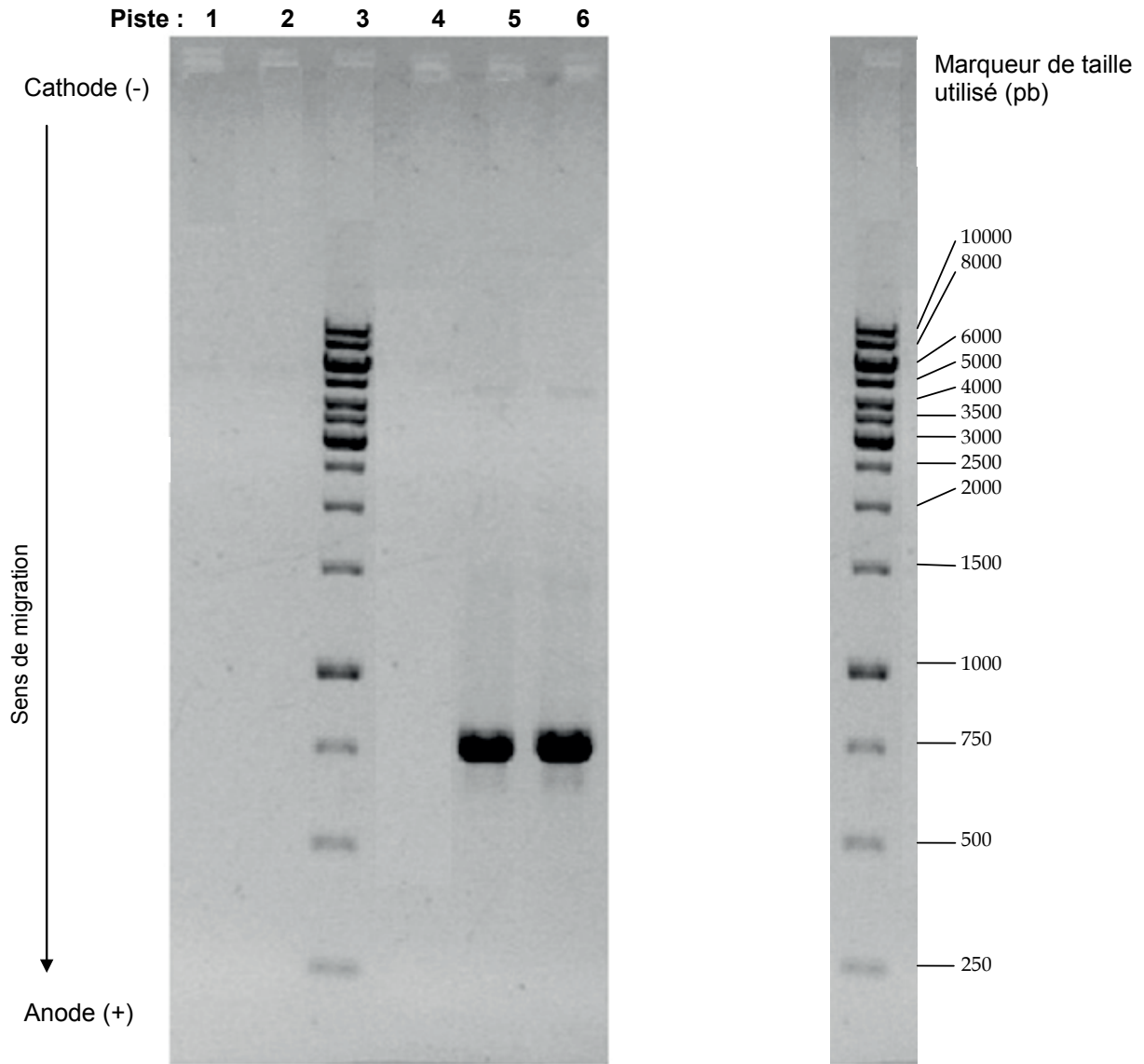
**Courbe A - Influence du pH sur la biomasse produite**



**Courbe B - Influence de la température sur la biomasse produite**



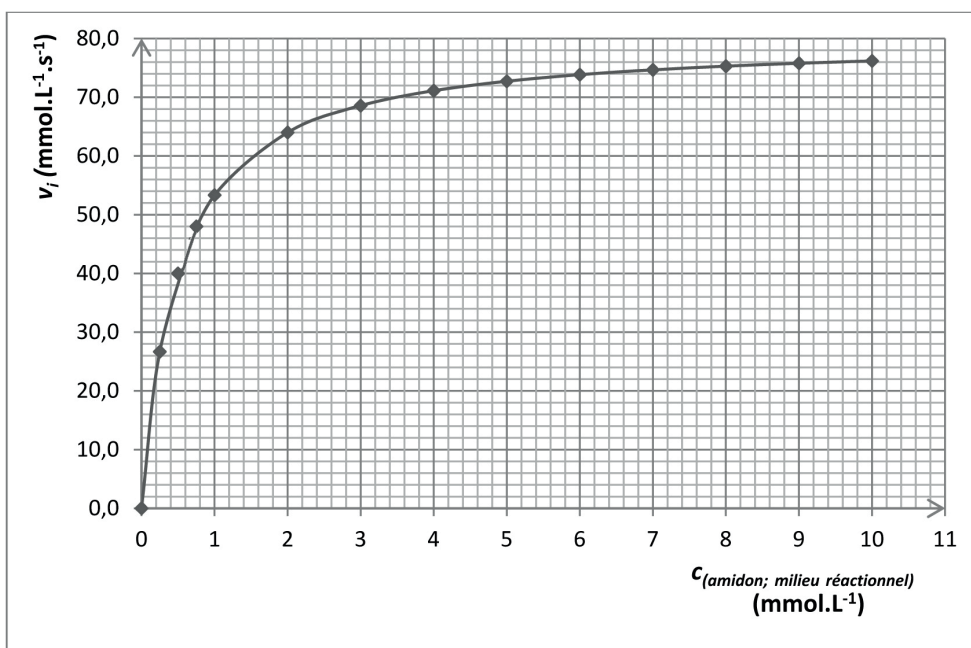
**DOCUMENT 3 - Electrophorégramme obtenu après migration des produits de réaction de PCR**



**Légende:**

- **Piste 1** : PCR réalisée sans ADN matrice
- **Piste 2** : PCR réalisée sur l'ADN extrait d'*Aspergillus oryzae*
- **Piste 3** : Marqueur de taille
- **Piste 4** : PCR réalisée sur l'ADN extrait d'*Aspergillus sojae*
- **Piste 5** : PCR réalisée sur l'ADN extrait d'*Aspergillus kawachii*
- **Piste 6** : PCR réalisée avec un ADN connu possédant le gène nécessaire à la biosynthèse de l'aflatoxine

**DOCUMENT 4 – Etude de la cinétique de l'α-amylase extraite d'*Aspergillus oryzae***  
**Représentation de Michaelis et Menten**



**DOCUMENT 5 - Paramètres cinétiques des α-amylases extraites des trois souches d'*Aspergillus***

Les résultats suivants sont obtenus dans les mêmes conditions expérimentales que celles utilisées pour *Aspergillus oryzae* (même volume d'échantillon et même quantité d'α-amylase) :

α-amylase extraite de la souche	<i>Aspergillus sojae</i>	<i>Aspergillus kawachii</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>
Paramètres cinétiques			
$K_M$ (mmol.L <sup>-1</sup> )	0,5	0,8	0,5
$v_{i\ max}$ (mmol.L <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )	68	60	Déterminée à la question 8

Donnée : On peut assimiler la constante de Michaelis ( $K_M$ ) à l'inverse de l'affinité de l'enzyme pour son substrat, c'est-à-dire :

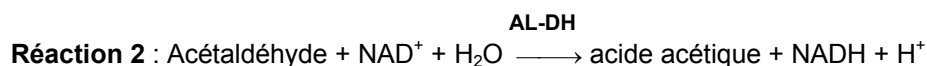
$$affinité = \frac{1}{K_M}$$



## DOCUMENT 6 – Fiche technique du coffret de dosage enzymatique de l'éthanol

### Principe

Le coffret permet le dosage de l'éthanol grâce à deux réactions enzymatiques :



### Réactifs fournis :

- Solution réactionnelle
- Solution d'ADH

### Procédure opératoire

- Longueur d'onde : 340 nm
- Température : 25 °C
- Cuve UV : 1 cm de trajet optique
- Mesurer contre l'air

Introduire dans les cuves	Témoin	Essai
Solution réactionnelle	3,00 mL	3,00 mL
Eau distillée	0,10 mL	-
Solution essai	-	0,10 mL
Mélanger. Après environ 3 min, lire l'absorbance des solutions ( <b>A<sub>1</sub></b> ). Déclencher la réaction par addition de :		
Solution d'ADH	0,05 mL	0,05 mL
Mélanger. Après réaction complète (environ 5-10 minutes), lire les absorbances des cuves ( <b>A<sub>2</sub></b> ).		

Déterminer les différences d'absorbance ( $A_2 - A_1$ ) du témoin et de l'essai.

Déduire la différence d'absorbance  $\Delta A = (A_2 - A_1)_{\text{Essai}} - (A_2 - A_1)_{\text{Témoin}}$ .

### Calcul de la concentration en masse en éthanol

$$\rho_{(\text{éthanol}; \text{solution essai})} = \frac{V_{\text{total mélange réactionnel}} \times M_{\text{éthanol}}}{\epsilon_{\text{NADH,H}^+}^{340 \text{ nm}} \times l \times V_{\text{solution essai}} \times 2} \times \Delta A_{(\text{NADH,H}^+; \text{milieu réactionnel})}$$

Si une dilution a été effectuée lors de la préparation de l'échantillon, multiplier le résultat par le facteur de dilution.

### Données :

- $\epsilon_{\text{NADH,H}^+}^{340 \text{ nm}} = 6300 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
- $M_{\text{éthanol}} = 46,07 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$
- $l = 1 \text{ cm}$
- $V_{\text{total mélange réactionnel}} = 3,15 \text{ mL}$

## DOCUMENT 7 – Dosage de l'éthanol du saké

Les sakés A, B et C ont été obtenus selon des procédés industriels strictement identiques, à partir des trois espèces d'*Aspergillus* sélectionnées :

- Pour le saké A : *Aspergillus sojae* ;
- Pour le saké B : *Aspergillus kawachii* ;
- Pour le saké C : *Aspergillus oryzae*.

Les indications de mesure du dosage de l'éthanol pour les différents sakés **dilués au 1/1000<sup>ème</sup>** sont présentées dans le tableau ci-dessous :

	Saké dilué au 1/1000					
	Saké A		Saké B		Saké C	
	Témoin	Essai	Témoin	Essai	Témoin	Essai
$A_1$ ( $\lambda = 340 \text{ nm}$ )	0,312	0,315	0,311	0,314	0,312	0,315
$A_2$ ( $\lambda = 340 \text{ nm}$ )	0,319	1,150	0,318	1,340	0,319	1,367

Résultats du dosage de l'éthanol dans les différents sakés non dilués :

	Saké A	Saké B	Saké C
$\rho_{(\text{éthanol} ; \text{saké})}$ en $\text{g.L}^{-1}$	95,4	117,4	à déterminer
Titre en % (v/v)	12,1	14,9	15,2

## DOCUMENT 8 - Calcul du degré alcoolique d'une solution d'éthanol

Equation aux grandeurs :

$$\text{Degré alcoolique} = \frac{\rho_{(\text{éthanol} ; \text{saké C})}}{\rho_{\text{éthanol}}} \times 100$$

Equation aux unités :

$$[\%] = \frac{[\text{g.L}^{-1}]}{[\text{g.L}^{-1}]} \times [\text{sans unité}]$$

Donnée :

$$\text{Masse volumique de l'éthanol } \rho_{\text{éthanol}} = 789 \text{ g.L}^{-1}$$