

BACCALAURÉAT TECHNOLOGIQUE

Série : Sciences et Technologies de Laboratoire

Spécialité : Biotechnologies

SESSION 2013

Sous-épreuve écrite de Biotechnologies

Coefficient de la sous-épreuve : 4

Ce sujet est prévu pour être traité en deux heures.

Ce sujet sera traité par les candidats
se présentant pour la première fois aux épreuves terminales
du baccalauréat.

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

L'usage de la calculatrice est autorisé.

Ce sujet comporte 8 pages.

PRODUCTION DE BIOÉTHANOL

Mise en place d'une méthode alternative

Les biocarburants sont préparés à partir de bioéthanol produit par fermentation du glucose par des levures. Actuellement, le glucose est obtenu par hydrolyse de l'amidon de maïs cependant, la culture du maïs présente des inconvénients pour le développement de cette filière : temps de culture et impact écologique.

Un laboratoire envisage de développer l'extraction du glucose par hydrolyse acide de la cellulose, constituant principal de la paroi des micro-algues. La culture de micro-algues présenterait l'avantage de diminuer les coûts économique et écologique.

Il décide donc de valider ce nouveau processus de production du bioéthanol par :

- étude des conditions de culture des micro-algues ;
- contrôle de l'identité de la souche de levure utilisée ;
- évaluation de la biomasse de levure et de la production d'éthanol par le nouveau système.

1. ÉTUDE DE LA CHAÎNE DE PRODUCTION DE BIOÉTHANOL À PARTIR DE MICRO-ALGUES

Le **document 1** présente les étapes de la production de bioéthanol à partir d'une culture de micro-algues.

Q1. À partir de l'analyse du **document 1**, reporter sur la copie les lettres **A**, **B**, et **C** du **document 2** et indiquer les légendes correspondantes.

Une production importante de micro-algues est nécessaire pour obtenir une quantité suffisante de glucose. L'influence de deux paramètres sur la croissance des micro-algues est étudiée dans le **document 3**.

Q2. Analyser les résultats fournis dans le **document 3A**.

En déduire l'influence des paramètres étudiés sur la croissance des micro-algues.

Q3. À l'aide des **documents 3A et 3B**, déterminer les types trophiques des micro-algues vis-à-vis de ces paramètres.

Q4. Retrouver dans le **document 1** les indications qui confirment les types trophiques des micro-algues cultivées.

2. BIOTRANSFORMATION DU GLUCOSE EN BIOÉTHANOL

La fermentation du glucose est effectuée par une souche de levure, *Saccharomyces cerevisiae*.

2.1. Contrôle de l'identité de la levure

Le laboratoire souhaite vérifier la pureté de la pré-culture réalisée en bouillon Sabouraud.

Q5. Proposer une manipulation simple permettant de vérifier la pureté de la pré-culture de levure.

L'identité de la levure est vérifiée par ensemencement d'une microgalérie « API 20 C AUX » dont un extrait de la fiche technique est fourni dans le **document 4**.

Q6. À partir de l'analyse du **document 4**, expliquer la présence du trouble dans une cupule pour un résultat positif.
D'après sa composition, en déduire le rôle du milieu « API C Medium » en vue de la préparation de l'inoculum.

Q7. Indiquer le rôle de la cupule nommée « 0 ».

Le résultat de la lecture de la galerie est fourni dans le **document 5**.

Le **document 6** est le tableau d'identification de la microgalerie « API 20 C AUX ».

Q8. À l'aide du **document 6**, exploiter le **document 5** pour vérifier l'identité de la levure.

2.2. Évaluation de la biomasse et de la production de bioéthanol lors de la fermentation

La levure identifiée est cultivée en fermenteur dans des conditions de faible oxygénation en présence d'une forte concentration en glucose afin de favoriser la production d'éthanol. Afin de suivre la production de biomasse au cours de la fermentation, des prélèvements sont réalisés toutes les heures. La biomasse est évaluée par mesure de la densité optique (*DO*) à 600 nm du milieu de culture.

La courbe de suivi de croissance $\ln DO_{600\text{ nm}} = f(t)$ est fournie dans le **document 7**.

Q9. Déterminer l'intervalle de temps au cours duquel la croissance est en phase exponentielle (**document 7**).

Q10. À l'aide de la courbe $\ln(DO_{600\text{ nm}}) = f(t)$ (**document 7**) et des formules fournies ci-dessous, déterminer la vitesse spécifique de croissance en phase exponentielle $\mu_{X\text{ expo}}$ (ou $Q_{X\text{ expo}}$) en h^{-1} . Puis calculer le temps de génération (*G*) en h :

$$\mu_{X\text{ expo}} = Q_{X\text{ expo}} = \frac{\ln DO_2 - \ln DO_1}{t_2 - t_1} \qquad G = \frac{\ln 2}{\mu_{X\text{ expo}}} \qquad \text{ou} \qquad G = \frac{\ln 2}{Q_{X\text{ expo}}}$$

Q11. Cette levure présente théoriquement un temps de génération d'environ 1 h. Comparer cette valeur avec la valeur expérimentale obtenue à la question **Q10**. En déduire si la croissance de la levure en fermenteur est satisfaisante.

L'éthanol produit est dosé par méthode enzymatique. Le **document 8** présente un extrait de la fiche technique du dosage mis en œuvre au laboratoire.

Q12. À partir du principe exposé dans le **document 8**, prévoir et expliquer le sens de l'évolution de l'absorbance A_2 par rapport à A_1 .

Au cours de la fermentation, la production d'éthanol est suivie par des prélèvements réalisés toutes les heures dans le fermenteur. Les résultats sont présentés dans le **document 7**. Le laboratoire estime que la production d'éthanol est satisfaisante lorsque la concentration massique en éthanol atteinte en phase stationnaire est de $(10 \pm 4) \text{ g.L}^{-1}$.

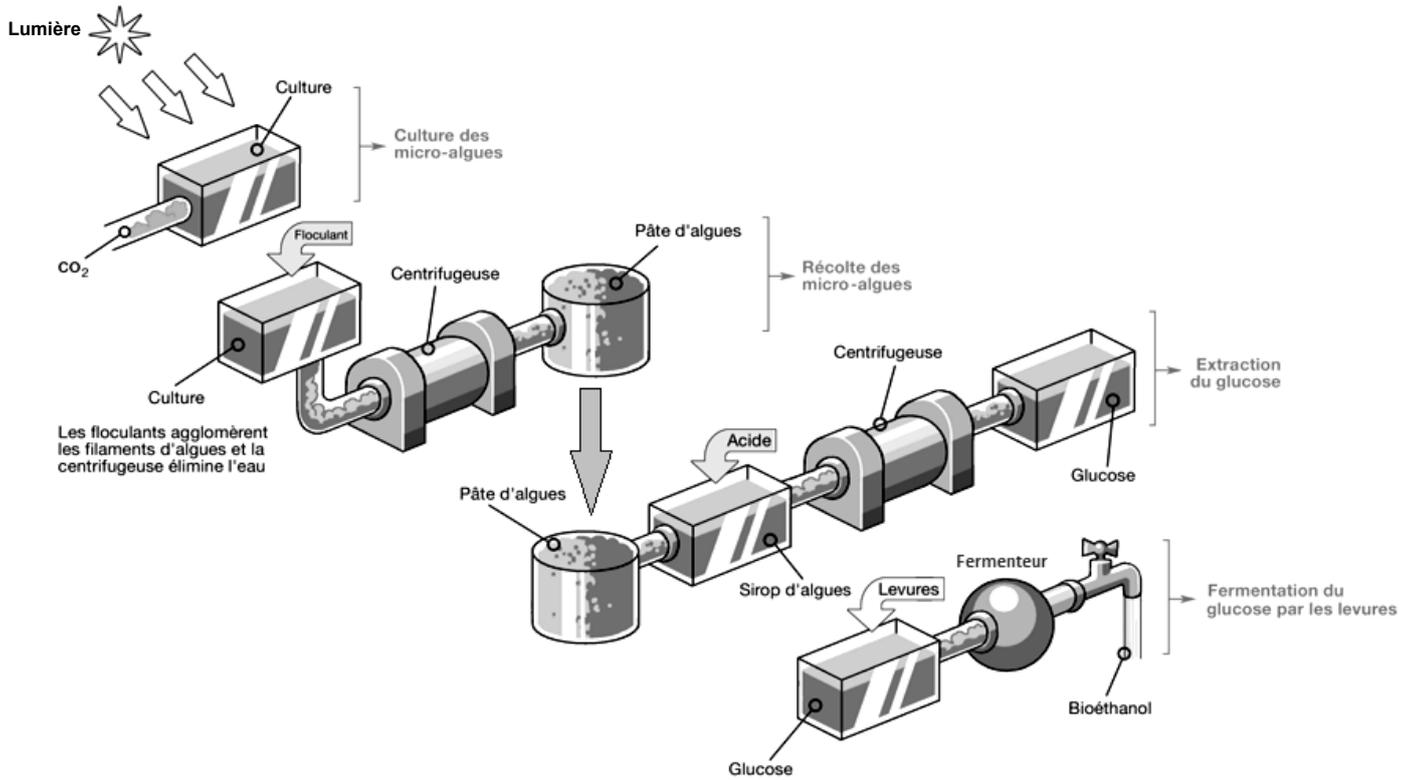
Q13. Exprimer la concentration massique en éthanol sous forme d'intervalle.

Q14. Analyser la courbe $[\text{éthanol}] = f(t)$ (**document 7**). En déduire si la production d'éthanol est satisfaisante.

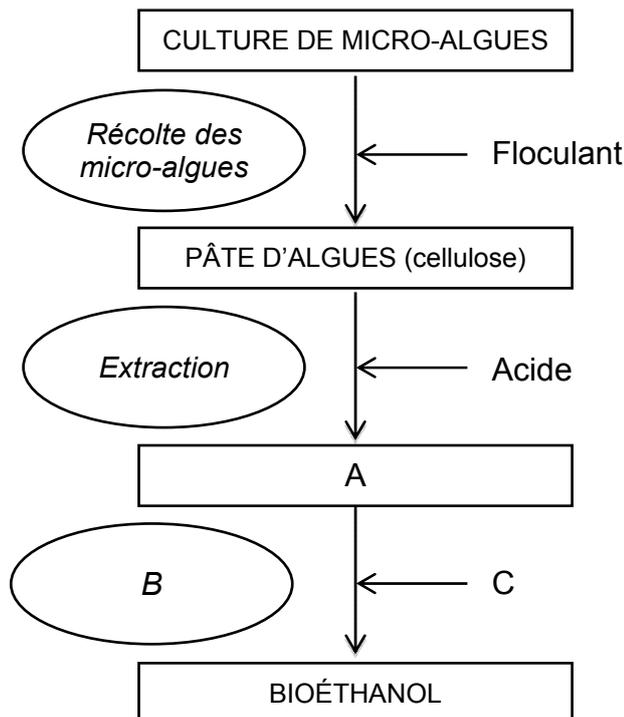
3. SYNTHÈSE

Q15. En considérant les résultats obtenus, donner les avantages de la production de bioéthanol par cette méthode alternative à l'échelle industrielle.

DOCUMENT 1 :
Production de bioéthanol à partir d'une culture de micro-algues



DOCUMENT 2 :
Étapes de production de bioéthanol à partir d'une culture de micro-algues



DOCUMENT 3 :

Influence de deux paramètres sur la croissance des micro-algues

Document 3A : expériences et résultats

Les micro-algues sont cultivées dans différentes conditions.

Les mesures sont effectuées le premier jour (J_0) et le 7^{ème} jour (J_7) et sont consignées dans le tableau suivant :

Conditions de culture		DO_{600} à J_0	DO_{600} à J_7
En présence de lumière	Milieu minimum sans ajout de CO_2	0,049	0,050
	Milieu minimum avec ajout de CO_2	0,052	0,626
À l'obscurité	Milieu minimum sans ajout de CO_2	0,050	0,052
	Milieu minimum avec ajout de CO_2	0,052	0,051

La mesure de la densité optique à 600 nm (DO_{600}) est proportionnelle à la concentration de micro-algues dans la limite de linéarité.

Un blanc réactif est réalisé avec du milieu minimum.

Document 3B : définitions de types trophiques

Un micro-organisme phototrophe utilise comme source d'énergie l'énergie lumineuse.

Un micro-organisme chimiotrophe utilise comme source d'énergie l'énergie chimique.

Un micro-organisme autotrophe utilise comme source de carbone une molécule minérale.

Un micro-organisme hétérotrophe utilise comme source de carbone une molécule organique.

DOCUMENT 4 :

Extrait de la fiche technique de la microgalerie « API 20 C AUX » (auxanogramme)

INTRODUCTION

La galerie API 20 C AUX est un système d'identification précise des levures les plus couramment rencontrées basé sur le **principe de l'auxanogramme**.

PRINCIPE

La galerie API 20 C AUX est constituée de 20 cupules contenant des substrats déshydratés qui permettent d'effectuer 19 tests d'assimilation. Les cupules sont inoculées avec un milieu minimum semi-gélosé et les levures poussent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant comme **seule source de carbone**.

Un résultat positif est révélé par un **trouble dans la cupule**.

COMPOSITION

Galerie

La composition de la galerie API 20 C AUX est reportée dans la liste des tests ci-dessous :

TESTS	SUBSTRATS	QTE (mg/cupule)
0	Aucun	-
GLU	D-GLUcose	1,2
GLY	GLYcérol	1,2
2KG	calcium 2-céto-Gluconate	1,2
ARA	L-ARAbinose	1,2
XYL	D-XYLose	1,2
ADO	ADOnitol	1,2
XLT	XyLiToI	1,2
GAL	D-GALactose	1,9
INO	INOsitol	2,36
SOR	D-SORbitol	1,2
MDG	Méthyl- α D-Glucopyranoside	1,2
NAG	N-Acétyle-Glucosamine	1,2
CEL	D-CELLobiose	1,2
LAC	D-LACTose (origine bovine)	1,2
MAL	D-MALtose	1,2
SAC	D-SACcharose	1,2
TRE	D-TREhalose	1,2
MLZ	D-MéLéZitose	1,2
RAF	D-RAFfinose	1,9

Milieu

API C Medium 7 mL	Sulfate d'ammonium	5 g
	Phosphate monopotassique	0,31 g
	Phosphate dipotassique	0,45 g
	Phosphate disodique	0,92 g
	Chlorure de sodium	0,1 g
	Chlorure de calcium	0,05 g
	Sulfate de magnésium	0,2 g
	L-Histidine	0,005 g
	L-Tryptophane	0,02 g
	L-Méthionine	0,02 g
	Agent gélifiant	0,5 g
	Solution de vitamines	1 mL
	Solution d'oligo-éléments	10 mL
Eau déminéralisée qsp	1000 mL	
pH final : 6,4-6,8 (à 20-25°C)		

MODE OPERATOIRE (extrait)

Préparation de l'inoculum

- Ouvrir une ampoule d'API Suspension Medium (2 mL) ou une ampoule d'API NaCl 0,85 % Medium (2 mL) ou utiliser un tube contenant 2 mL de la même solution sans additif.
- A l'aide d'une pipette, prélever une fraction de colonie par aspiration ou par touches successives. Utiliser préférentiellement des cultures jeunes (18-24 h).
- Réaliser une suspension de levures de turbidité égale à 2 de McFarland. Cette suspension doit être utilisée extemporanément.
- Ouvrir une ampoule d'API C Medium et y transférer environ 100 μ L de la suspension précédente. Homogénéiser avec la pipette en évitant la formation de bulles.

Inoculation de la galerie

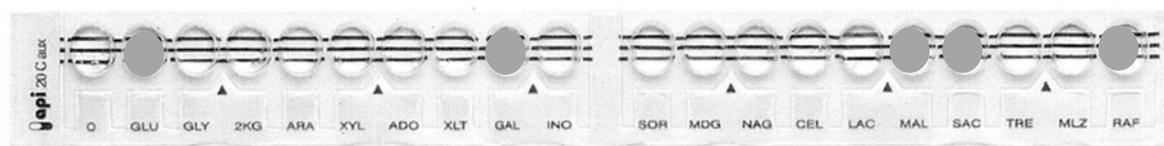
- Remplir les cupules avec la suspension obtenue dans API C Medium. Éviter la formation de bulles en posant la pointe de la pipette sur le côté de la cupule. Veiller à créer un niveau horizontal ou légèrement convexe, mais jamais concave. Des cupules incomplètement remplies ou trop remplies peuvent entraîner des résultats incorrects.
- Refermer la boîte d'incubation.
- Incuber 48-72 h \pm 6 h à 29°C \pm 2°C.

LECTURE

Cupule plus trouble que le témoin : croissance.
Cupule aussi limpide que le témoin : pas de croissance.

DOCUMENT 5 : Résultats de l'ensemencement de la galerie Api 20 C AUX

Présence d'un trouble : ●



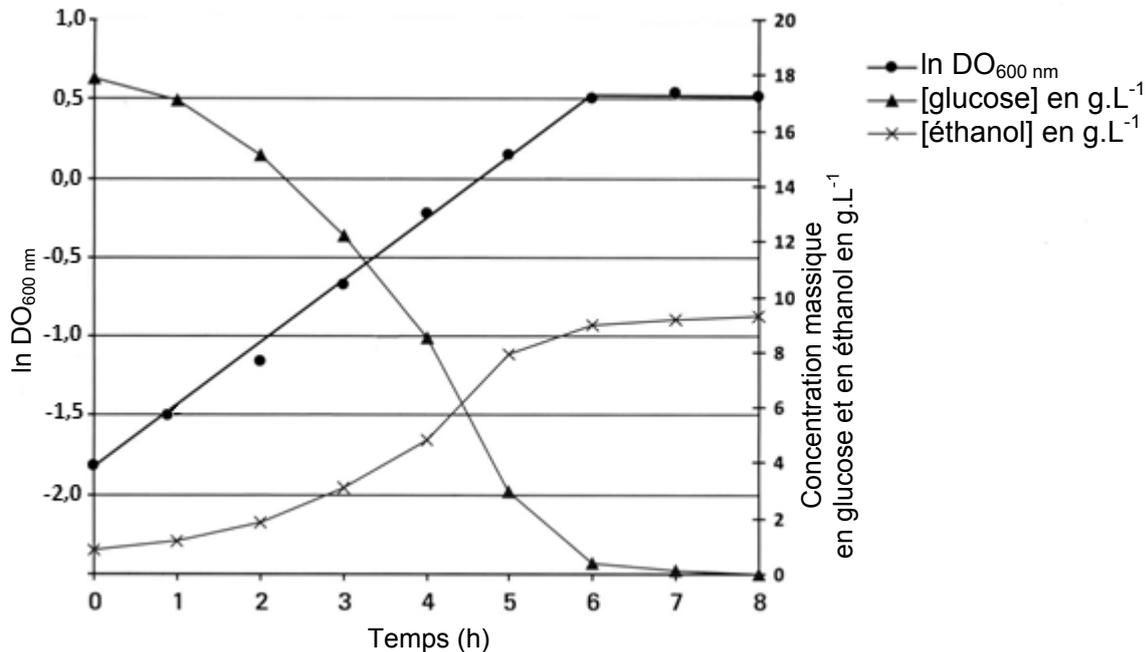
DOCUMENT 6 : Tableau d'identification

% de réactions positives après 48-72 h (± 6 h) à 29°C ± 2°C

API 20 C AUX	V4.0	0	GLU	GLY	ZKG	ARA	XYL	ADO	XLT	GAL	INO	SOR	MDG	NAG	CEL	LAC	MAL	SAC	TRE	MLZ	RAF	HYPH
<i>Candida albicans 1</i>	0	100	14	99	2	88	94	90	99	0	94	85	99	0	0	99	97	97	5	0	99	
<i>Candida albicans 2</i>	0	100	1	99	1	90	1	75	99	0	70	1	99	0	0	90	1	5	1	0	99	
<i>Candida boidinii</i>	0	100	55	1	0	89	70	89	25	0	95	1	55	0	0	1	1	1	0	0	100	
<i>Candida colliculosa</i>	0	100	96	100	0	0	0	5	13	0	60	1	0	0	0	3	99	60	0	96	25	
<i>Candida dubliniensis</i>	0	100	96	99	0	1	99	50	100	1	99	0	40	0	0	100	60	1	0	0	99	
<i>Candida famata</i>	0	100	96	98	60	60	98	75	99	0	100	99	99	89	70	100	100	96	78	75	1	
<i>Candida glabrata</i>	0	100	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	94	0	0	1	
<i>Candida guilliermondii</i>	0	100	99	97	79	85	97	92	99	0	97	88	99	95	0	94	100	99	90	95	46	
<i>Candida kefyr</i>	0	100	27	0	1	18	1	25	100	0	34	0	0	1	95	1	100	1	1	96	75	
<i>Candida krusei/inconspicua</i>	0	99	73	0	0	0	0	0	6	0	2	0	64	0	0	0	0	0	0	0	79	
<i>Candida lusitanae</i>	0	100	90	95	1	65	95	20	30	0	99	60	95	80	0	100	99	100	99	0	75	
<i>Candida magnoliae</i>	0	100	32	50	0	0	0	0	10	0	60	0	0	0	0	2	97	10	1	75	1	
<i>Candida norvegensis</i>	0	100	85	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	25	0	0	0	0	0	0	93	
<i>Candida parapsilosis</i>	0	100	94	88	89	89	93	3	99	0	99	89	99	0	0	100	100	93	99	1	99	
<i>Candida pelliculosa</i>	0	100	99	0	0	67	1	1	56	0	70	95	1	70	0	97	99	87	96	30	70	
<i>Candida rugosa</i>	0	100	74	0	1	70	1	26	99	0	94	0	59	0	0	0	0	0	0	0	99	
<i>Candida sphaerica 1</i>	0	100	31	2	0	2	0	62	99	0	99	68	0	35	1	95	100	99	29	76	99	
<i>Candida sphaerica 2</i>	0	100	88	1	0	1	0	36	94	0	99	50	0	31	99	80	100	53	80	64	1	
<i>Candida tropicalis</i>	0	100	9	99	1	96	99	12	99	0	99	69	99	17	1	99	73	100	72	5	99	
<i>Candida utilis</i>	0	100	99	0	0	60	0	1	5	0	1	3	0	37	0	98	96	16	72	79	69	
<i>Candida zeylanoides</i>	0	100	100	87	0	0	1	0	1	0	99	0	99	0	0	0	0	74	0	0	75	
<i>Cryptococcus albidus</i>	0	100	0	98	80	81	0	0	6	30	60	65	0	99	10	98	100	82	81	51	1	
<i>Cryptococcus humicola</i>	0	100	82	100	100	100	36	64	100	100	95	100	100	98	100	100	99	99	95	99	99	
<i>Cryptococcus laurentii</i>	0	100	6	92	99	99	69	76	99	84	53	76	92	96	99	92	99	92	96	99	25	
<i>Cryptococcus neoformans</i>	0	100	0	100	14	91	71	1	93	97	100	99	88	10	0	99	99	75	97	88	25	
<i>Cryptococcus terreus</i>	0	100	0	100	87	100	0	0	45	50	99	0	96	96	36	0	0	54	0	0	1	
<i>Cryptococcus uniguttulatus</i>	0	100	3	99	99	99	3	0	1	99	50	99	100	0	0	100	100	75	100	7	25	
<i>Geotrichum capitatum</i>	0	95	92	0	0	0	0	0	25	0	10	0	2	0	0	0	0	0	0	0	95	
<i>Geotrichum klebahnii</i>	0	100	100	0	0	92	0	0	75	0	88	0	0	0	0	0	0	0	0	0	92	
<i>Kloeckera spp</i>	0	100	0	50	1	0	0	0	0	0	0	0	0	96	0	0	0	0	0	0	1	
<i>Kodamaea ohmeri</i>	0	100	99	96	0	0	66	0	84	0	93	98	99	56	0	99	99	93	0	80	84	
<i>Pichia angusta</i>	0	100	84	0	1	1	66	36	0	0	90	1	1	20	0	94	90	46	97	0	2	
<i>Prototheca wickerhamii</i>	0	100	100	0	0	0	0	0	55	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	1	
<i>Rhodotorula glutinis</i>	0	100	15	91	0	0	8	0	50	0	84	3	0	1	0	91	100	59	84	96	1	
<i>Rhodotorula minuta</i>	0	100	100	100	98	95	3	0	0	0	5	0	85	60	1	0	95	95	95	0	1	
<i>Rhodotorula mucilaginosa 1</i>	0	100	5	4	15	33	92	61	10	0	5	0	0	0	0	33	100	5	1	87	25	
<i>Rhodotorula mucilaginosa 2</i>	0	100	60	1	80	80	64	52	80	0	60	1	0	1	0	98	100	95	86	98	25	
<i>Saccharomyces cerevisiae 1</i>	0	100	8	0	0	0	0	0	78	0	1	13	0	0	0	75	90	2	1	62	30	
<i>Saccharomyces cerevisiae 2</i>	0	100	1	0	0	0	0	0	99	0	1	29	0	0	0	99	99	99	85	81	25	
<i>Sporobolomyces salmonicolor</i>	0	100	1	0	0	0	0	0	5	0	80	0	0	0	0	0	100	85	0	70	90	
<i>Stephanoascus ciferrii</i>	0	100	80	80	100	100	71	60	100	100	43	0	99	60	0	99	100	99	0	99	100	
<i>Trichosporon asahii</i>	0	100	20	100	100	100	0	5	100	0	1	94	100	100	100	100	98	66	20	0	95	
<i>Trichosporon inkin</i>	0	100	4	100	0	98	0	0	95	98	0	100	57	100	95	100	100	95	89	0	95	
<i>Trichosporon mucoides</i>	0	100	40	99	74	100	53	65	100	92	78	100	94	100	100	100	100	78	82	99	95	

DOCUMENT 7 :

Évolution de la biomasse, de la concentration en glucose et en éthanol dans le milieu de culture au cours de la fermentation par *Saccharomyces cerevisiae*

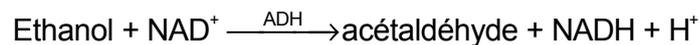


DOCUMENT 8 :

Extrait de la fiche technique du dosage de l'éthanol par méthode enzymatique

Principe

L'éthanol est oxydé en acétaldéhyde (ou éthanal) par l'alcool déshydrogénase (ADH) :



L'absorbance du NADH est mesurée à 340 nm contre l'air.

Réactifs utilisés

R₁ : solution tamponnée à pH 9

R₂ : solution tamponnée à pH 6,6 contenant du NAD⁺ et de l'ADH

Mode opératoire

Dans une cuve pour spectrophotomètre, introduire :

- 2 mL de R₁
- 0,1 mL de solution à doser.

Homogénéiser et lire l'absorbance A₁ après 3 minutes d'incubation.

Ajouter 0,5 mL de R₂.

Homogénéiser, attendre environ 15 minutes et lire l'absorbance A₂.