

BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR BIOANALYSES ET CONTRÔLES
--

**ÉPREUVE E3 – UNITÉ U32
MICROBIOLOGIE ET TECHNOLOGIES D'ANALYSE**

SESSION 2020

Durée : 3 heures
Coefficient : 3

Matériel autorisé :

- L'usage de la calculatrice avec mode examen actif est autorisé.
- L'usage de la calculatrice sans mémoire « type collègue » est autorisé.
- Dictionnaire anglais-français.

Capacités évaluées :

Mobilisation des connaissances de microbiologie et TA dans le cadre de situations professionnelles	5 points
Qualités d'analyse	6 points
Aptitude à la réflexion et au raisonnement scientifique	5 points
Qualités de synthèse	3 points
Clarté et rigueur de l'expression écrite de la composition	1 point

Dès que le sujet vous est remis, assurez-vous qu'il est complet.
Le sujet se compose de 13 pages, numérotées de 1/13 à 13/13.

La production bio-industrielle de L-lysine

La production mondiale de lysine et d'autres acides aminés est en pleine expansion pour des besoins accrus en alimentation animale et humaine, ainsi qu'en industrie pharmaceutique.

Une usine désire mettre en place une production de L-lysine à l'aide de souches mutantes de *Corynebacterium glutamicum*. Dans cet objectif, le laboratoire de recherche et développement étudie les caractéristiques structurales et métaboliques de nouvelles souches mutantes.

Pour la souche retenue, le développement du projet se poursuit par :

- l'étude des conditions de culture et de croissance,
- des essais de rendement et productivité,
- la mise en place de contrôles en cours de production.

1. Caractéristiques structurales et métaboliques des souches productrices

Les corynébactéries sont des bacilles à Gram positif dont la paroi atypique fait l'objet d'une étude approfondie. En effet, la paroi joue un rôle essentiel dans l'excrétion des acides aminés et permet l'identification des souches par chimiotaxonomie.

1.1. Structure et composition de la paroi

Le **document 1** est un modèle de la paroi. On y constate une organisation structurale proche de celle des parois de bactéries Gram - bien que *Corynebacterium* soit un genre Gram +.

- Q1.** Identifier l'élément d'ultrastructure de la paroi rapprochant *Corynebacterium* des bactéries de type Gram -.
- Q2.** Expliquer l'aspect Gram + des corynébactéries après coloration à partir de la structure de leur paroi et du principe de la technique de la coloration de Gram.

1.2. Obtention et identification des souches mutantes

Le laboratoire a mis au point différents mutants par mutagenèse permettant l'amélioration de la souche sauvage.

- Q3.** Proposer une définition de la mutagenèse et nommer un agent physique ou chimique mutagène.

Pour l'identification des souches, le laboratoire dispose d'un spectromètre de masse MALDI-TOF dont le **document 2** présente sous forme schématique le principe décrit dans la notice de l'appareil.

- Q4.** Repérer la nature des molécules à analyser et nommer les grandes étapes de la technique d'identification des souches.
Argumenter le principal intérêt de la technologie MALDI-TOF par rapport aux méthodes traditionnelles d'identification.

BTS BIOANALYSES ET CONTRÔLES		Session 2020
U32 - Microbiologie et technologies d'analyse	Code : 20-BAE3MT	Page : 2/13

Le **document 3** présente le résultat obtenu pour la souche sauvage et pour un mutant. Celui-ci a été obtenu par une mutation entraînant la modification de la régulation de la transcription du gène codant pour une porine.

Q5. Analyser les spectres obtenus pour conclure sur la capacité de cette technique à différencier ces deux souches.

1.3. Validation des souches mutantes Eh, Ec et Yram

Parmi les nombreuses souches mutantes, le laboratoire a testé les deux mutants Eh et Ec conçus pour optimiser la production de lysine. Ces mutants sont présentés dans le **document 4**. Le **document 5** schématise la voie de biosynthèse de la lysine.

Q6. Expliquer pourquoi chacune des deux mutations génétiques aboutit à la surproduction de lysine.

Le mutant Yram, une autre souche hyperproductrice de lysine, présente une mutation qui augmente l'excrétion de l'acide aminé. L'effet de cette mutation passe par une diminution de la synthèse des acides mycoliques de la mycomembrane présentée dans le **document 1**.

Q7. Proposer une hypothèse pour expliquer l'augmentation de l'excrétion de la lysine en s'appuyant sur la structure de la lysine et de la mycomembrane.

2. Étude des conditions de croissance de la souche productrice

La souche M finalement retenue pour la bioproduction, est un mutant complexe combinant plusieurs mutations. Son utilisation industrielle nécessite la détermination des paramètres d'état de la croissance dans un milieu synthétique d'étude proche du milieu de production.

2.1. Composition du milieu synthétique d'étude

Le **document 6** indique la composition du milieu de Kiss et Stephanopoulos (K-S) couvrant les besoins nutritifs élémentaires et les besoins spécifiques de la souche. Il est utilisé au cours des essais de croissance menés à différentes températures entre 20 °C et 40 °C.

Q8. Classer sous forme de tableau les constituants du milieu K-S en deux catégories correspondant aux besoins élémentaires et spécifiques.
Préciser le rôle de chaque constituant.
Montrer qu'il s'agit d'un milieu synthétique.

La souche M est cultivée en tenant compte du fait qu'elle est hétérotrophe et auxotrophe.

Q9. Proposer une définition de ces deux types trophiques et justifier l'utilisation du milieu K-S.

2.2. Essai de croissance du mutant M en milieu non renouvelé

Le **document 7** présente les points expérimentaux de suivi de croissance à pH 7 et 30 °C, dans un milieu agité et aéré pendant une durée de 28 heures en bioréacteur de volume total 2 L.

BTS BIOANALYSES ET CONTRÔLES		Session 2020
U32 - Microbiologie et technologies d'analyse	Code : 20-BAE3MT	Page : 3/13

Q10. Déterminer la vitesse spécifique maximale de croissance $Q_{x_{\text{expo}}}$ et le temps de génération G en exposant la démarche de détermination.

Données : $\ln 2 = 0,7$; $Q_{x_{\text{expo}}}$ également appelé $\mu_{x_{\text{expo}}}$.

Q11. La valeur de G calculée étant relativement élevée, proposer, à l'aide du **document 7**, une modification d'un paramètre de culture pour diminuer cette valeur.

3. Optimisation du procédé de production de la lysine

Les aptitudes technologiques de la souche M (rendements élevés et bonne séparation de la biomasse) sont testées sur une installation pilote selon un diagramme de production présenté dans le **document 8**.

3.1. Étude du procédé de production

Après revivification, une préculture est réalisée dans le milieu de production.

Q12. Dégager l'intérêt de la préculture. Rappeler le rôle de la mélasse et préciser l'avantage de son utilisation en production industrielle.

Le **document 9** présente les trois principaux procédés de fermentation industrielle.

Q13. Identifier les trois procédés technologiques A, B et C présentés dans le **document 9** en justifiant la réponse.

3.2. Analyse des courbes de production

Le **document 10** présente la consommation du saccharose et l'apparition de la L-lysine tout au long du procédé de l'essai pilote.

Q14. Calculer la productivité volumique horaire maximale (P_m) et la productivité volumique horaire finale (P_f) en g de lysine $\cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$.

Données : formule générale de la productivité volumique horaire $P = \frac{\Delta P}{\Delta t}$
avec : P = concentration massique du produit et t = temps

Q15. Analyser les courbes et les résultats de productivité pour déduire la durée de fermentation la plus adaptée à une productivité finale optimale.

Q16. Calculer le rendement global $Y_{L/S}$ de conversion du saccharose en lysine en g de lysine $\cdot g^{-1}$ de saccharose puis conclure sur l'intérêt de la souche mutée.

Données :
$$Y_{L/S} = \frac{[P]_f - [P]_0}{[S]_0 - [S]_f}$$

avec :

$[P]_0$ et $[P]_f$ = concentrations massiques initiale et finale en produit

$[S]_0$ et $[S]_f$ = concentrations massiques initiale et finale en substrat

Rendement de la souche sauvage dans les conditions de l'étude : 0,088 g de lysine $\cdot g^{-1}$ de saccharose.

BTS BIOANALYSES ET CONTRÔLES	Session 2020
U32 - Microbiologie et technologies d'analyse	Code : 20-BAE3MT Page : 4/13

4. Les contrôles en cours de production

La conduite d'un procédé de fabrication se déroulant sur plusieurs jours et utilisant une souche mutante est toujours délicate. La multiplication d'agents de contamination ou de bactéries présentant des mutations réverses sont des incidents causant une baisse de productivité.

L'opérateur de production réalise un isolement du moût extrait du fermenteur. Après incubation, la lecture du milieu montre une abondance de petites colonies bactériennes et quelques grands thalles filamenteux. L'examen microscopique d'un thalle a donné le résultat schématisé dans le **document 11**.

Q17. Identifier sur la copie les éléments numérotés et préciser le genre de ce mycète.

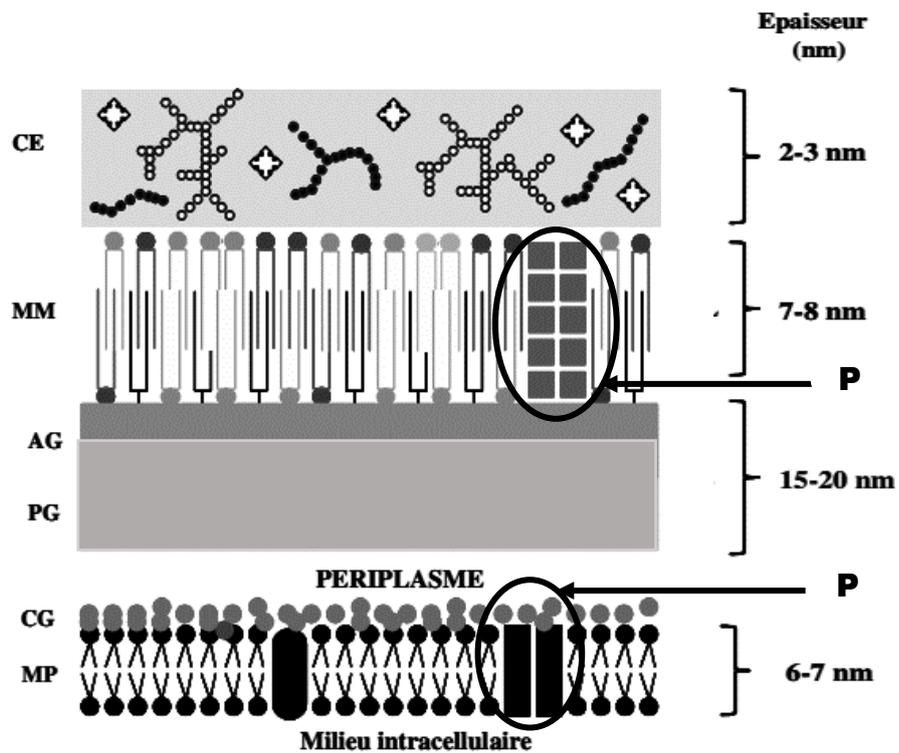
Q18. Proposer une adaptation du milieu K-S permettant d'éliminer le contaminant en cours de production.

Afin de déterminer le taux de mutants réverses, l'opérateur utilise ensuite la technique des répliques présentée dans le **document 12**. Deux répliques sont effectuées, l'une sur milieu K-S (boîte n° 1) et l'autre sur milieu K-S sans homosérine (boîte n° 2). Après incubation, l'opérateur dénombre les colonies de mutants réverses sur la boîte n° 2 et compare avec le nombre de colonies total de la boîte n° 1.

Q19. Expliquer pourquoi les mutants réverses sont capables de se développer sur la boîte n° 2. Calculer le taux de révertant en pourcentage pour conclure sur la stabilité de la mutation.

Document 1 : Schéma de la paroi particulière de *Corynebacterium glutamicum*.

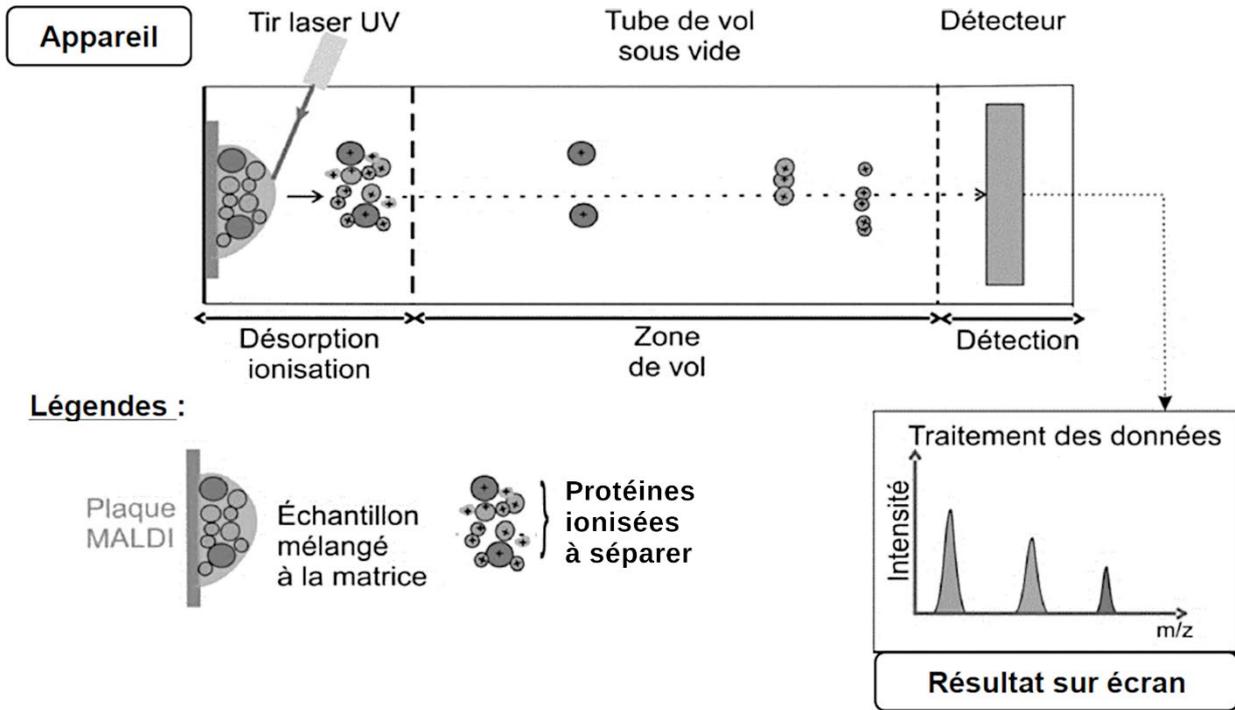
Le schéma n'est pas présenté à l'échelle, tenir compte de l'indication de l'épaisseur des couches.



Légende :

- MP** = membrane plasmique
- CG** = couche de protéines
- PG** = peptidoglycane
- AG** = arabinogalactane (enchainements d'oses)
- MM** = mycomembrane hydrophobe (membrane externe contenant des lipides particuliers, les acides mycoliques)
- CE** = couche externe (enchainements d'oses et de protéines)
- P** = porines

Document 2 : Principe de la spectrométrie de masse par MALDI-TOF.

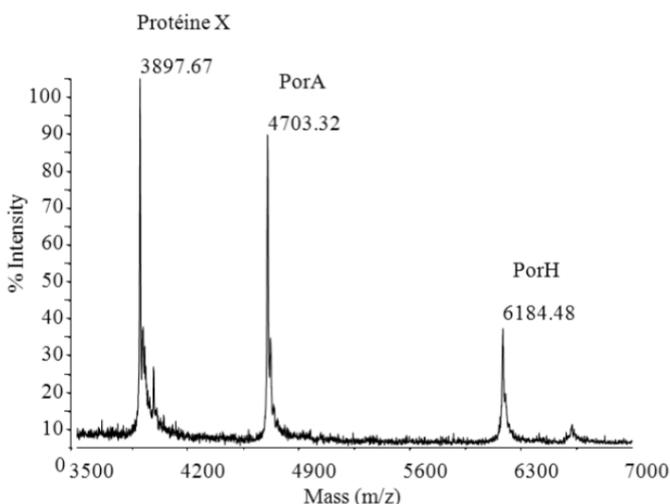


m/z = rapport masse sur charge

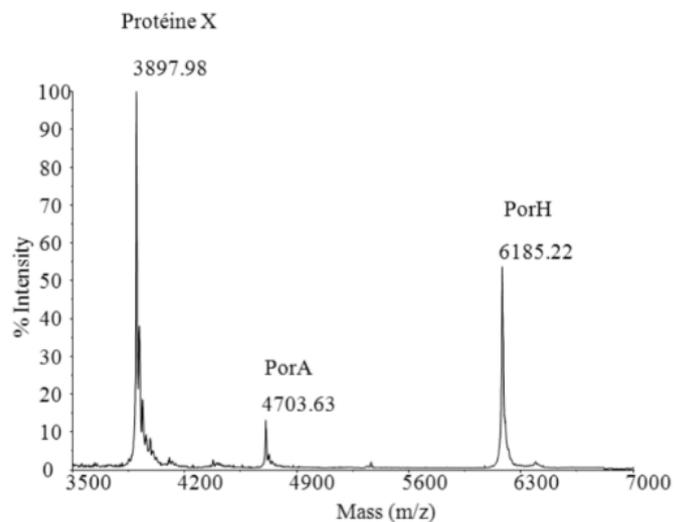
The target slide is prepared and introduced to a high-vacuum environment. A precise laser burst ionizes the sample. A “cloud” of proteins is released and accelerated by an electric charge. After passing through the ring electrode, the proteins’ Time of Flight is recorded using a formula from the time recorded. Proteins are detected with a sensor to create a spectrum that represents the protein makeup of each sample.

Document 3 : Spectres de masse de la souche sauvage (spectre a) et du mutant PorA (spectre b) obtenus à partir des extraits protéiques de la mycomembrane

Spectre a



Spectre b



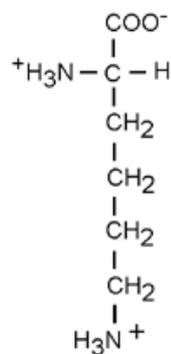
Légende : Por A = signal de la porine A, Por H = signal de la porine H

Document 4 : Caractéristiques de deux souches mutantes de *C. glutamicum*.

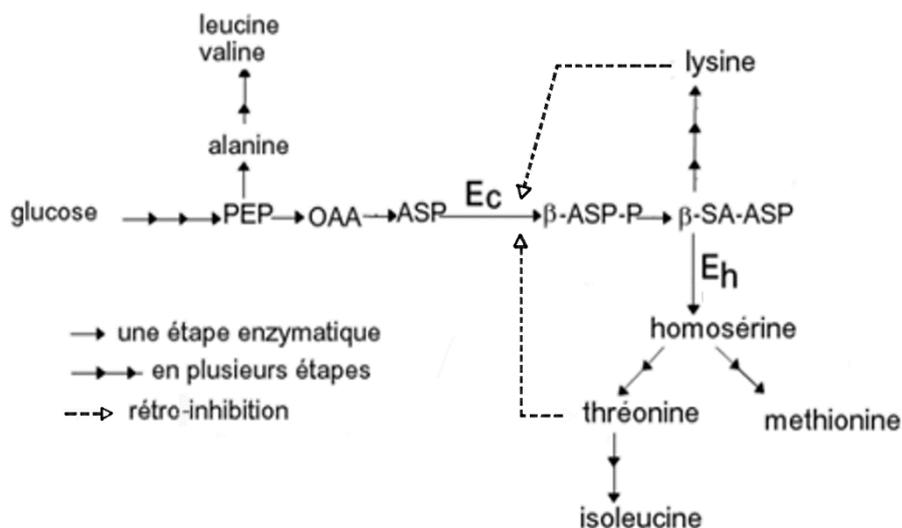
Mutant	Mutation génétique	Conséquence fonctionnelle
Souche Eh	Déficiencia du gène de l'enzyme homosérine déshydrogénase Eh	Besoin absolu en homosérine pour la croissance
Souche Ec	Modification du gène de l'enzyme aspartokinase Ec	Absence de rétro-inhibition par la lysine et la thréonine

Document 5 : Schéma simplifié de la voie de biosynthèse de la lysine chez *Corynebacterium glutamicum* de type sauvage

Formule semi-développée de la lysine :



Voie de biosynthèse de la lysine :



Légendes :

PEP = phosphoénolpyruvate, OAA = oxaloacétate, ASP = aspartate, ASP-P = aspartyl phosphate, SA-ASP = semialdéhyde-aspartate

Ec = aspartokinase, **Eh** = homosérine déshydrogénase

Document 6 : Composition du milieu d'étude de Kiss et Stephanopoulos (K-S).

Constituants	Quantité
Glucose	20 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	15 g
NaCl	1 g
KH ₂ PO ₄	1 g
K ₂ HPO ₄	8 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	200 mg
Solution ionique (*)	10 mL
L-homosérine	200 mg
Biotine	1 mg
Thiamine	1 mg
H ₂ O désionisée	Qsp 1 L
pH 7,2	

(*) La solution ionique contient, pour un litre :

- 200 mg MnSO₄ H₂O,
- 200 mg FeCl₃ 6H₂O,
- 50 mg ZnSO₄ 7H₂O,
- 20 mg Na₂B₄O₇ 10H₂O,
- 20 mg CuCl₂ 2H₂O,
- 10 mg (NH₄)₆Mo₇O₂₄ 4H₂O,
- 50 mg CaCl₂ 2H₂O,
- 25 mg FeSO₄ 7H₂O.

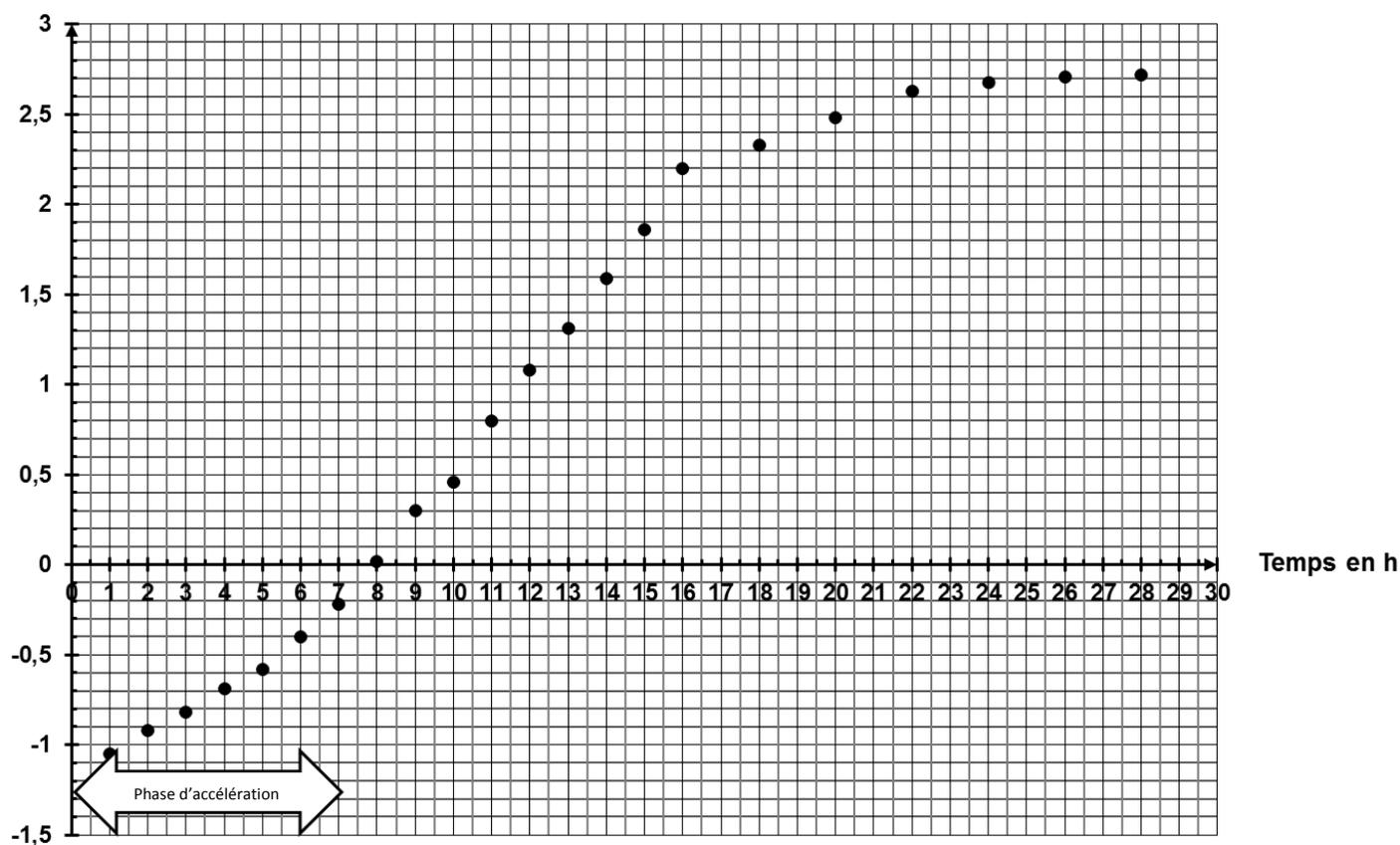
Document 7 : Croissance en bioréacteur batch de 2 L, 50 rpm, 1 vvm d'air, T = 30°C.

rpm : rotations par minute

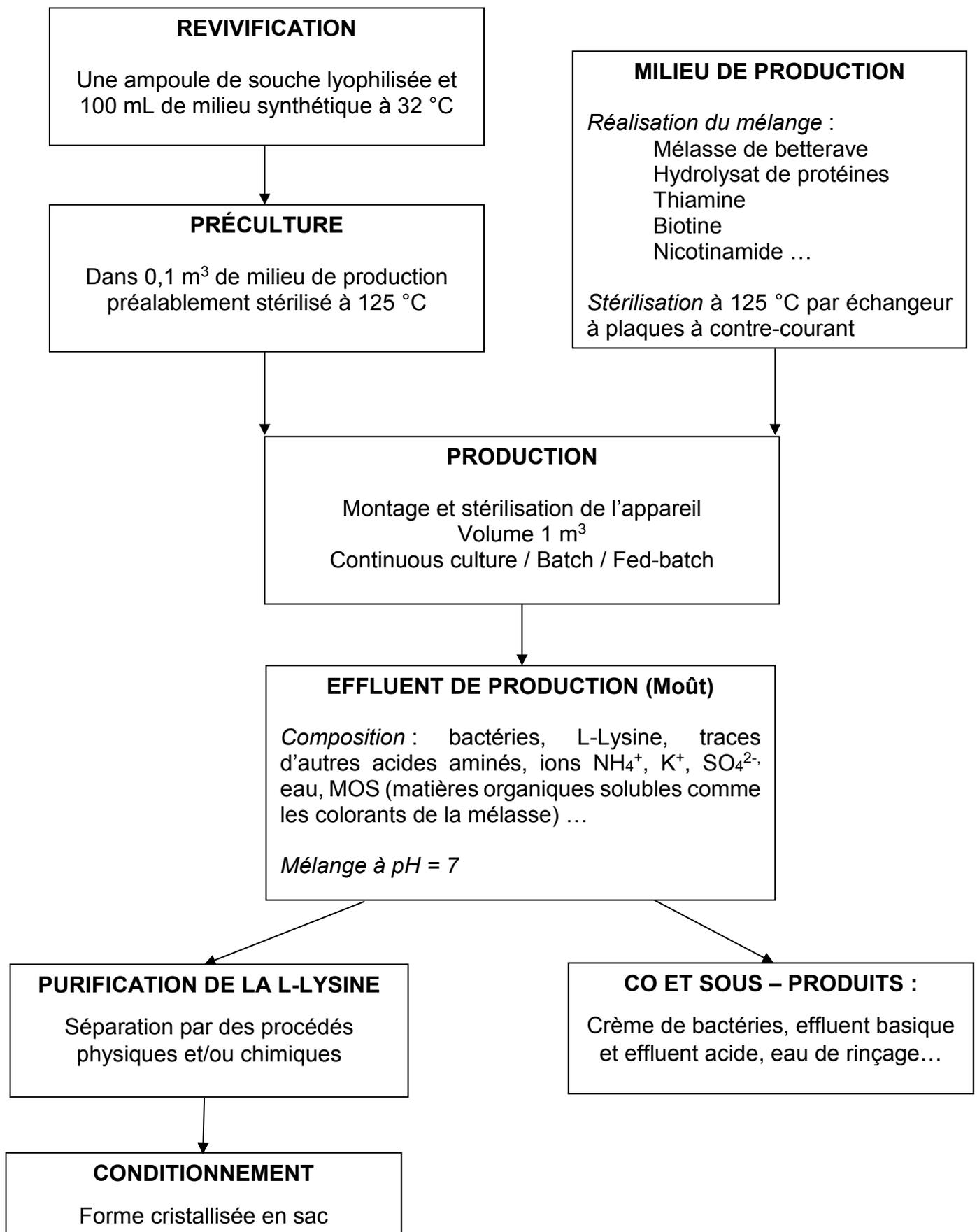
vvm : volume par volume par minute

Temps (h)	Biomasse X (g·L ⁻¹)	ln X	Temps (h)	Biomasse X (g·L ⁻¹)	ln X
1	0,350	-1,05	12	2,94	1,08
2	0,400	-0,920	13	3,70	1,31
3	0,440	-0,820	14	4,90	1,59
4	0,500	-0,690	15	6,42	1,86
5	0,560	-0,580	16	9,02	2,20
6	0,670	-0,400	18	10,3	2,33
7	0,800	-0,220	20	11,9	2,48
8	1,00	0,0200	22	13,9	2,63
9	1,35	0,300	24	14,6	2,68
10	1,60	0,460	26	15,0	2,71
11	2,23	0,800	28	15,2	2,72

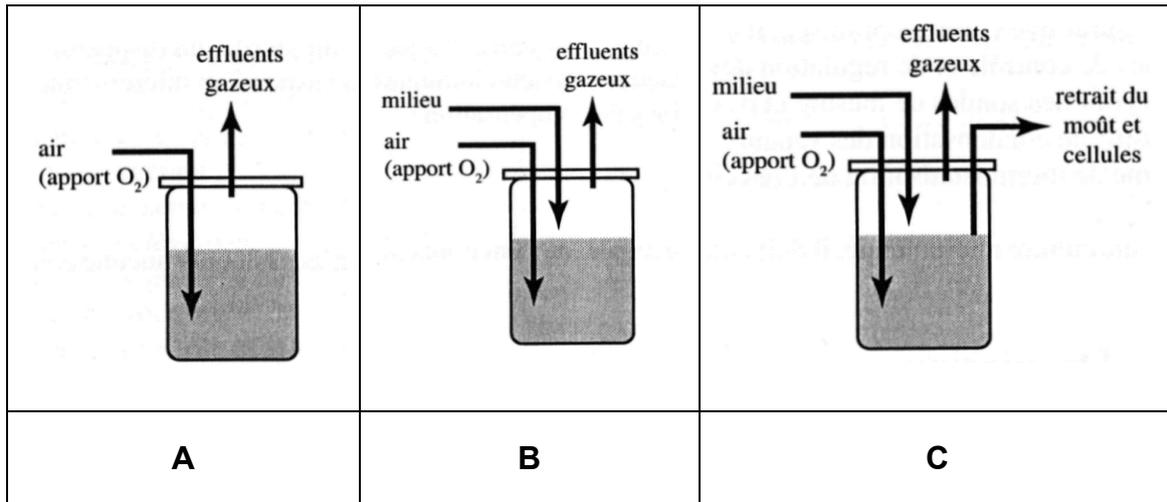
Biomasse lnX



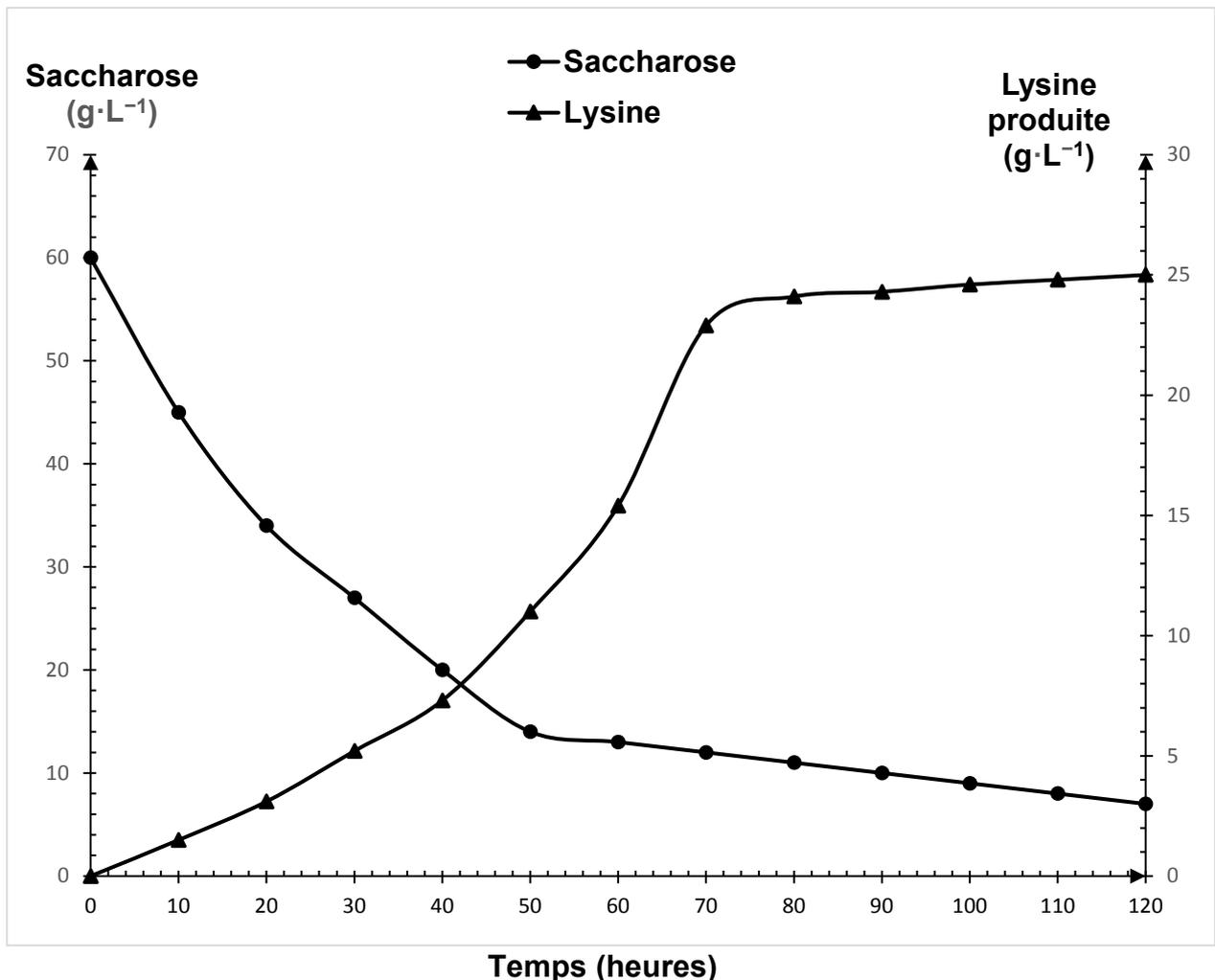
Document 8 : Schéma simplifié du diagramme de production.



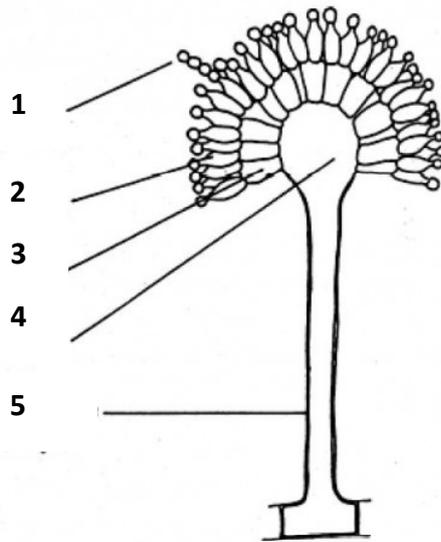
Document 9 : Schémas des trois procédés technologiques de fermentation.



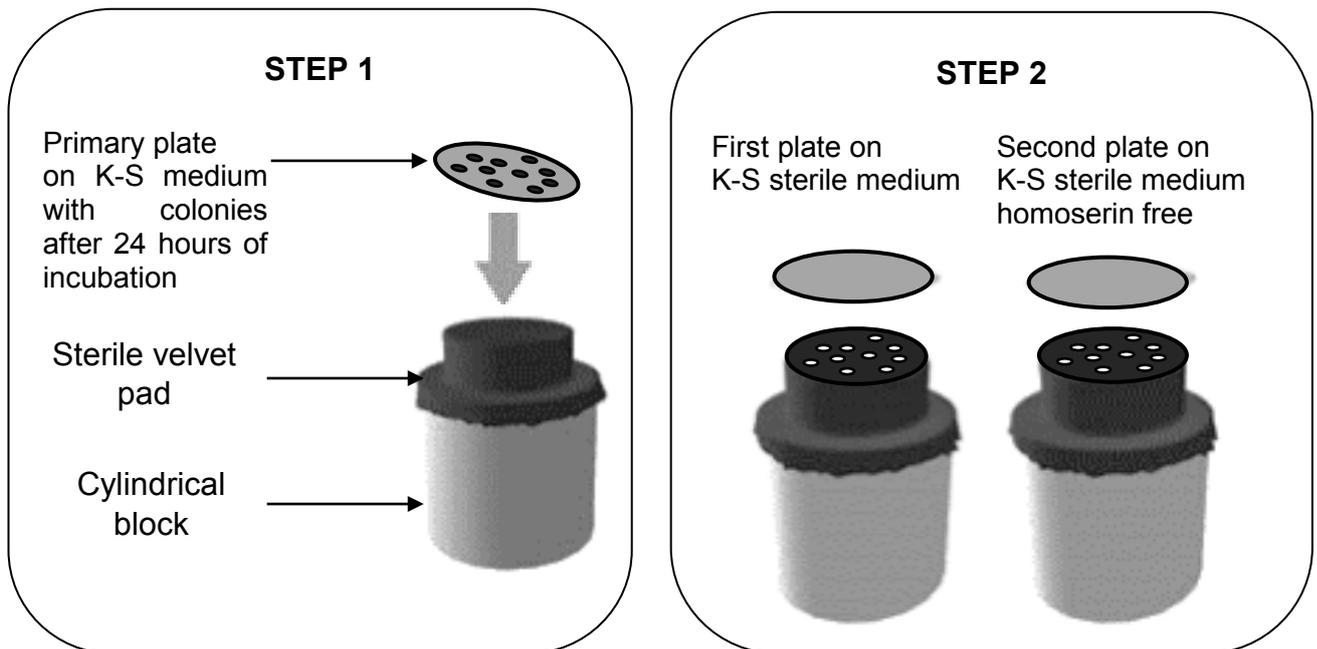
Document 10 : Évolution des concentrations de substrat et de produit au cours d'une fermentation en batch.



Document 11 : Aspect schématique du contaminant mycélien.



Document 12 : Replica Plating Technique



Protocol

- take an imprint of the initially isolated colonies (Primary plate) using the velvet pad
- transfer this imprint onto different media.

Results

