

# BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR

## BIOTECHNOLOGIES

### *MICROBIOLOGIE ET GÉNIE FERMENTAIRE*

Durée de l'épreuve : 2 heures  
Coefficient : 1

**Le sujet comporte 5 pages numérotées de 1/5 à 5/5**  
*L'usage d'un dictionnaire anglais/français et d'une calculatrice est autorisé*

**Remarque importante :**

Il sera tenu compte de « **la clarté et la rigueur de l'expression écrite et de la composition** » par une bonification maximale de deux points.

## Production d'acide lactique par *Kluyveromyces lactis*

L'acide L-(+)-lactique est généralement produit par des microorganismes industriels appartenant aux genres *Lactobacillus*, *Bacillus* et *Rhizopus* par fermentation.

Lors d'une fermentation lactique classique, la chute du pH, due à la production de cet acide, a un effet inhibiteur sur les souches productrices.

Lors de fermentations industrielles, il est courant de réguler le pH par ajout de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , de  $\text{CaCO}_3$ , de  $\text{NaOH}$  ou de  $\text{NH}_4\text{OH}$ , afin de neutraliser l'acide lactique.

Ces ajouts ont pour inconvénient d'induire des opérations industrielles supplémentaires pour régénérer, après fermentation, d'une part l'acide lactique non ionisé à partir de ses sels et d'autre part les cations régulateurs pour des fermentations ultérieures.

### 1. Acide lactique et pH des milieux de production (3,5 points)

- 1.1. Indiquer les principales caractéristiques morphologiques microscopiques du genre *Bacillus*.
- 1.2. Expliquer pourquoi la chute du pH, due à la production d'acide lactique, a un effet inhibiteur sur la croissance des souches productrices.
- 1.3. Réaliser un schéma légendé d'une boucle de régulation du pH dans un bioréacteur de laboratoire dans le cas de cette production. Indiquer les rôles des différents éléments et préciser le sens de parcours de cette boucle.

### 2. Voies fermentaires des souches de levures utilisées (10 points)

Pour éviter ces étapes chimiques, les industriels s'intéressent à des microorganismes qui ne sont pas sensibles à la baisse du pH, tels que les levures.

La levure *Kluyveromyces lactis*, KA1, a été modifiée génétiquement par transformation avec le gène de la lactate déshydrogénase (*LDH*).

Dans un premier temps la fermentation de la souche recombinante a donné les résultats résumés dans le **document 1**.

- 2.1. Nommer le type fermentaire de la souche de *Kluyveromyces lactis* KA1. Justifier la réponse.
- 2.2. Déterminer sur les courbes les valeurs nécessaires et estimer par rapport au glucose, en indiquant une formule littérale de calcul :
  - le rendement global de croissance ( $R_{X/S}$  ou  $Y_{F_{X/S}}$ ) en g de biomasse par g de glucose ;
  - le rendement global de conversion en acide lactique ( $R_{LA/S}$  ou  $Y_{F_{LA/S}}$ ) ;
  - le rendement global de conversion en éthanol ( $R_{ET/S}$  ou  $Y_{F_{ET/S}}$ )

Dans un second temps, le gène *LDH* a été introduit dans une autre souche de *Kluyveromyces lactis*, KB2, dont l'activité d'une enzyme clé du métabolisme glucidique a été supprimée par mutagenèse aléatoire.

La fermentation de cette deuxième souche KB2 est résumée dans le **document 2**.

Les résultats obtenus, exprimés dans les mêmes unités qu'en 2.2., sont les suivants :

$R_{X/S}$ ou $Y_{F_{X/S}}$	$R_{LA/S}$ ou $Y_{F_{LA/S}}$
0,14 g biomasse / g glucose	0,24

- 2.3. Nommer le type fermentaire de la souche de *Kluyveromyces lactis* KB2. Justifier la réponse.

## BOE 4 MGF

- 2.4. Comparer les rendements globaux de croissance et interpréter à l'aide des réponses aux questions 2.1. et 2.3.
- 2.5. Comparer les rendements globaux de conversion en acide lactique et en éthanol de ces deux fermentations.  
Interpréter ces résultats, à l'aide du **document 3** : l'enzyme ❶ est l'enzyme clé dont l'activité a été supprimée dans la souche KB2.
- 2.6. Citer les enzymes ❶, ❷ et ❸ impliquées dans les fermentations alcoolique et lactique ainsi que le(s) coenzyme(s) d'oxydoréduction des réactions catalysées par les enzymes ❷ et ❸.
- 2.7. Donner la définition d'un coenzyme.

Les coenzymes d'oxydoréduction retrouvés dans les voies fermentaires décrites dans le **document 3** sont ceux que l'on trouve également dans le métabolisme énergétique de type respiratoire.

- 2.8. Indiquer la localisation cellulaire précise où les coenzymes réduits sont réoxydés en aérobiose par les levures.

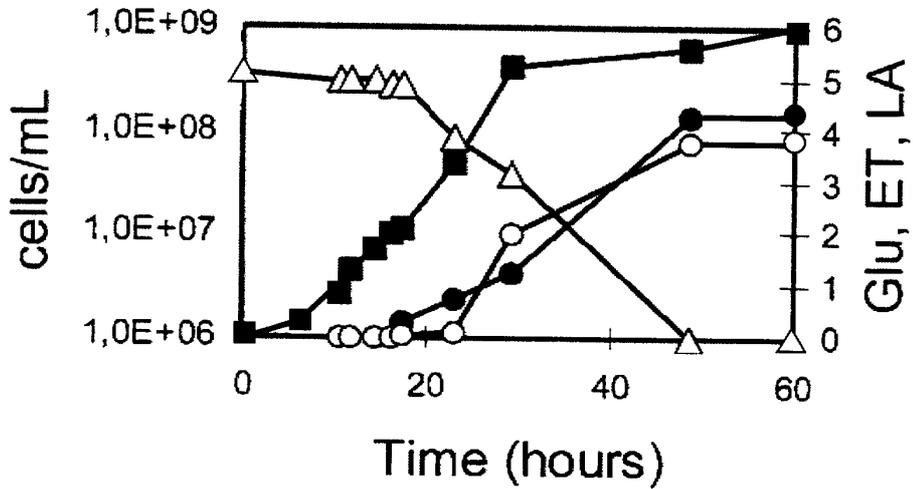
### 3. Milieux de culture et conditions de production (6,5 points)

Lors de la culture en bioréacteur, les levures réalisent les deux métabolismes énergétiques (respiratoire et fermentaire) simultanément.

Le texte du **document 4** précise les conditions nécessaires à la culture des levures étudiées.

- 3.1. Le milieu « yeast nitrogen base » est un milieu synthétique minimum.
  - 3.1.1. Donner la définition d'un milieu minimum.
  - 3.1.2. Compte tenu de la nature de certains composants du milieu, proposer un type trophique pour les souches KA1 et KB2. Justifier la réponse.
- 3.2. Donner la définition de la  $pO_2$ .
- 3.3. Présenter sous forme de graphe, l'évolution de la  $pO_2$  et de X au cours d'un batch non régulé d'une culture de levure.
- 3.4. À l'aide du **document 4**, expliquer quel effecteur intervient dans la régulation de la  $pO_2$ . Expliquer comment cet effecteur agit sur la  $pO_2$ .
- 3.5. Proposer un type de mobile d'agitation à utiliser. Justifier le choix.
- 3.6. Indiquer le débit d'air insufflé dans le bioréacteur exprimé en litres par heure.

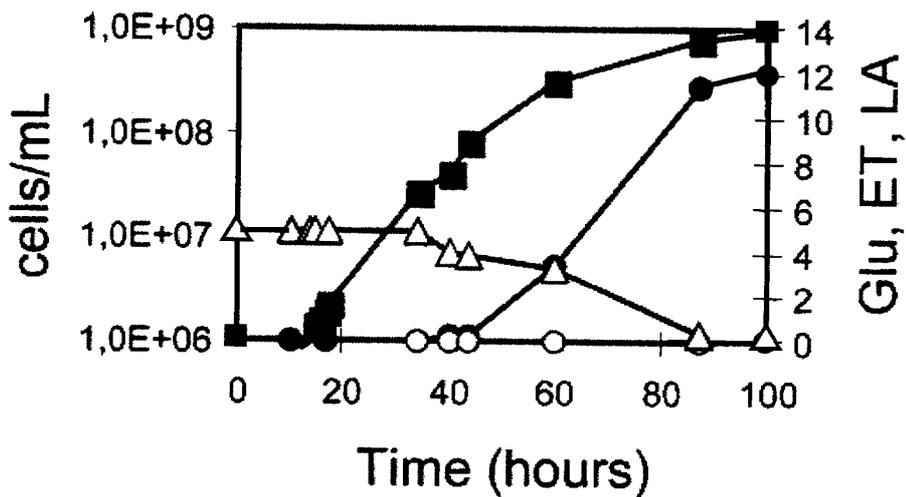
Document 1



Fermentation of *Kluyveromyces lactis* KA1, transformed by *LDH*. ■ cells per milliliter ; ○ ethanol (ET) production, grams per liter ; ● L-(+)-lactic acid (LA) production, grams per liter ; and Δ percent (wt/vol) residual glucose (Glu).

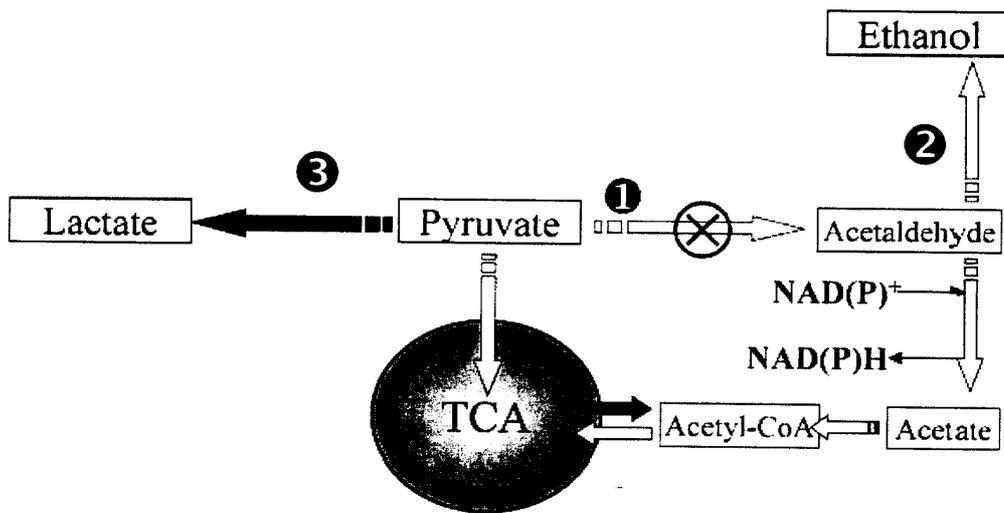
Donnée : la masse moyenne d'une cellule est  $7 \cdot 10^{-12}$  g

Document 2



Fermentation of *Kluyveromyces lactis* KB2, transformed by *LDH*. ■ cells per milliliter ; ○ ethanol (ET) production, grams per liter ; ● L-(+)-lactic acid (LA) production, grams per liter ; and Δ percent (wt/vol) residual glucose (Glu).

Document 3



TCA : tricarboxylic acid cycle

Document 4

**“Stirred-tank cultures.** Growth on glucose medium of strains KA1 and KB2 was monitored in a 5-liter Biostat-B stirred-tank bioreactor (B-Braun). Cells were inoculated in 4 liters of yeast nitrogen base medium, containing 5% (wt/vol) glucose, and supplemented with  $\rho_{\text{adenine}} = 200 \text{ mg.L}^{-1}$  and of  $\rho_{\text{uracil}} = 100 \text{ mg.L}^{-1}$  final concentration. The bioreactor was kept at  $30^\circ\text{C}$  and  $\text{pH} = 5$  and air flowrate was  $2 \text{ L.min}^{-1}$ . A  $\text{pO}_2$  higher than 40 % was maintained throughout the process by controlling the stirring rate.”