

# BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR BIOTECHNOLOGIE

Durée : 4 h 00

Coef. : 4

SESSION 2002

L'usage d'un dictionnaire anglais-français est autorisé.  
L'usage d'une calculatrice est autorisé.  
1 feuille de papier millimétré.

## EPREUVE : ETUDE DE PROJET

### Production industrielle d'acide glutamique

La production annuelle d'acide glutamique par *Corynebacterium glutamicum*, utilisant diverses mélasses comme substrat, dépasse 400 000 tonnes. Les deux tiers de cette production sont destinés à l'industrie agro-alimentaire où l'acide glutamique est utilisé comme agent de sapidité dans de nombreuses préparations (sauces, soupes, plats cuisinés).

#### 1. Les bactéries productrices d'acide glutamique (7 points)

Un mode d'amélioration des procédés de production repose sur la sélection de souches bactériennes présentant une synthèse et/ou une excrétion améliorée. La sélection de bactéries productrices peut être simple.

- 1.1. *A l'aide du document I, décrire chaque étape du protocole de sélection de souches productrices.*
- 1.2. *Préciser leur rôle respectif.*

#### 2. Les procédés de culture des bactéries productrices d'acide glutamique (28 points)

Plusieurs substrats sont utilisables pour produire de l'acide glutamique. Le document II décrit un procédé fondé sur l'utilisation de l'acide acétique.

- 2.1. *Quel est le type de procédé de culture mis en oeuvre ? Justifier la réponse.*
- 2.2. *Dans le cas présent, quel est l'intérêt de ce procédé ?*
- 2.3. *Analyser la courbe de production par rapport à la courbe de croissance.*

- 2.4. L'excrétion de l'acide glutamique est un point clé de la fermentation glutamique. Les premiers procédés de production étaient fondés sur une limitation en biotine.
- 2.4.1 *A partir du tableau du document III, décrire et interpréter l'effet de la biotine sur la production de biomasse, d'une part et sur la production d'acide glutamique d'autre part.  
Conclure quant à l'opportunité de la présence de biotine dans le milieu de culture.*
- 2.4.2 *Pour une concentration en biotine de 1 µg/L, calculer le rendement global de production d'acide glutamique par rapport à la source de carbone, sachant que celle-ci est totalement consommée.*
- 2.5 La mélasse de canne à sucre a été utilisée en remplacement du glucose dans le milieu de culture. La mélasse étant riche en biotine, les procédés s'appuyant sur sa limitation ne sont pas applicables. D'autres procédés ont été proposés, comme l'induction d'excrétion de l'acide glutamique par l'addition d'antibiotiques (pénicilline...), de surfactants (tweens...). Pour étudier cette induction, on met en regard la composition membranaire (nature des phospholipides et des acides gras, quantité d'acide oléique, rapport  $\frac{\text{acides gras saturés}}{\text{acides gras insaturés}}$ ) et la quantité d'acide glutamique produit (document IV).
- 2.5.1 *Quel est l'effet du POEFE et de la pénicilline sur le taux d'acide glutamique produit ?*
- 2.5.2 *La pénicilline et le POEFE agissent-ils selon un même mécanisme sur l'excrétion de l'acide glutamique ? Justifier la réponse et en déduire le mécanisme probable dans le cas du POEFE.*
- 2.6 D'autres études, ont mis en évidence que l'excrétion de l'acide glutamique par des protoplastes bactériens dépend de la pression osmotique. Le document V présente l'effet de la pression osmotique en présence de pénicilline ou de POEFE.
- 2.6.1 *Donner le mode d'obtention d'un protoplaste.*
- 2.6.2 *Définir la pression osmotique. Comment varie-t-elle en fonction de la concentration extra-cellulaire en nitrate de sodium ?*
- 2.6.3 *Quel est le mode d'action de la pénicilline (antibiotique de la classe des β-lactamines) sur une cellule bactérienne en croissance et sur un protoplaste ?*
- 2.6.4 *Analyser le document V.*
- 2.6.5 *Proposer une interprétation des résultats obtenus en présence de pénicilline .*

### 3. Amélioration des souches et génie génétique (23 points)

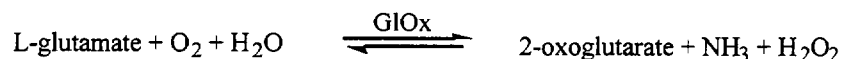
L'augmentation de la production d'acide glutamique peut résulter d'une expression plus forte d'un gène clé dans la synthèse de ce métabolite. Dans ce but le gène peut être cloné dans un vecteur adapté à *C. glutamicum*.

- 3.1. Un tel vecteur a été construit à partir de deux plasmides (pCG4 et de pCG1). Justifier le rôle des marqueurs présents dans ces deux plasmides. (Document VI).
- 3.2. Le vecteur pCG4 a été incubé en présence des enzymes *Eco RI* et *Pst I*. Les résultats d'électrophorèse en gel d'agarose sont présentés dans le document VII.
  - 3.2.1 Regrouper dans un tableau les résultats obtenus pour le marqueur, tracer la courbe d'étalonnage.
  - 3.2.2 Déterminer précisément la taille des différents fragments de restriction.
  - 3.2.3 En déduire la carte de restriction de pCG4.
  - 3.2.4 Préciser sur un schéma la connexion du gel au générateur et nommer les électrodes.

### 4. Dosage de l'acide glutamique (22 points)

L'optimisation de la production d'acide glutamique nécessite des dosages en cours de culture.

- 4.1. Citer deux méthodes permettant de doser l'acide glutamique.
- 4.2. Parmi les méthodes de dosage en cours de développement reviennent souvent les sondes à L-glutamate oxydase (GLOx ; EC 1.4.3.11.). Les performances des méthodes utilisées avec différents biocapteurs sont présentées dans le document VIII. La réaction catalysée par la GLOx est la suivante :



- 4.2.1 Dans cette réaction, préciser quels sont les composés utilisables pour générer des signaux électriques, ainsi que les transducteurs permettant de les capter. ?
- 4.2.2 Rappeler le principe du dosage ampérométrique.
- 4.2.3. Déduire du document VIII la gamme de tensions applicable à une électrode ampérométrique permettant la mesure de  $[\text{O}_2]$  d'une part et de  $[\text{H}_2\text{O}_2]$ , d'autre part.
- 4.2.4. Comment établir la corrélation entre la concentration en glutamate et le signal détecté ?
- 4.2.5. Citer deux avantages et deux inconvénients des deux méthodes d'immobilisation : inclusion dans la gélatine et co-réticulation avec la SAB par le glutaraldéhyde.

4.3 Le document IX présente les résultats des mesures obtenus pour 17 acides aminés différents à l'aide d'un biocapteur utilisant la GlOx. Pour chaque acide aminé, la mesure a été effectuée pour une même concentration molaire.

4.3.1 *Qu'entend-on par réponse relative ?*

4.3.2 *En utilisant le résultat obtenu pour l'acide aspartique, justifier l'intérêt de ces mesures.*

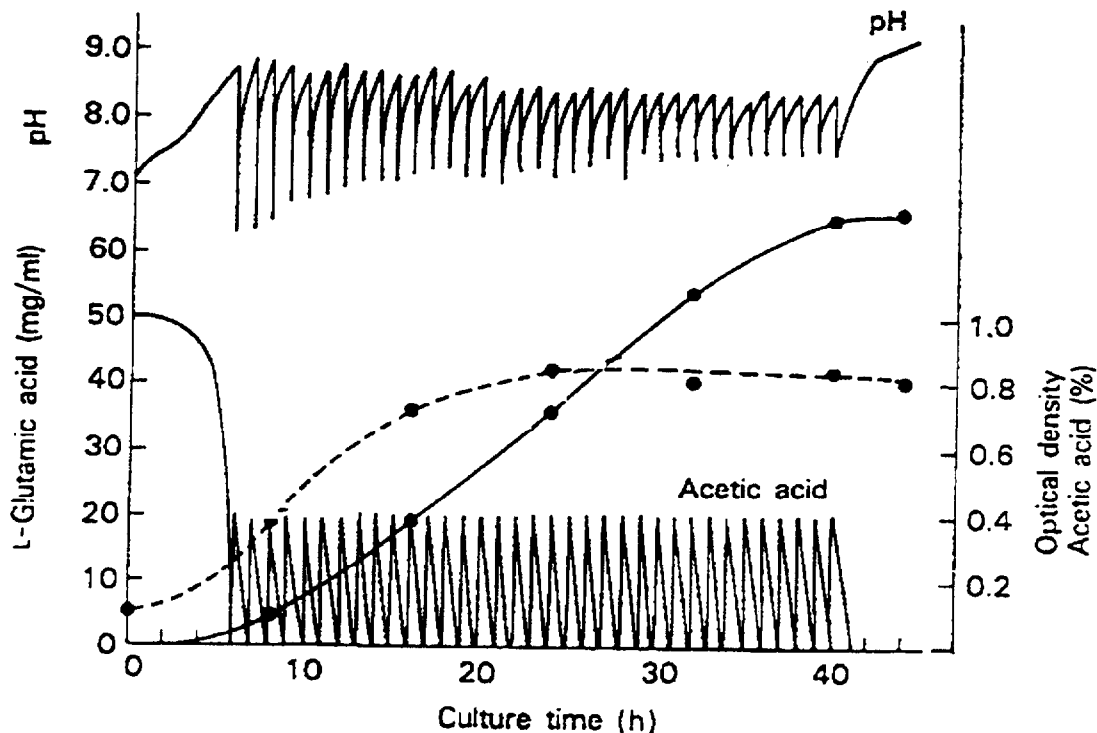
4.3.3 *Pour un mélange équimolaire de ces 17 acides aminés le biocapteur est-il utilisable ? Justifier la réponse par un calcul.*

## Document I

In the case of bacteria, a simple but efficient method was borrowed from Udaka for the selection of glutamic acid-producing strains. Bacteria to be tested are spread over the plate agar containing the production medium and allowed to grow to small colonies. After they are replicated on another agar plate for preservation, the bacteria on the original plate are killed by UV-irradiation. A second agar medium containing *Leuconostoc mesenteroides* and the same ingredients as used for the bioassay of glutamic acid is then poured into the original plate and solidified. After incubation, the glutamic acid productivity of the bacteria on the first agar layer is estimated by the size of the haloes of *Leuconostoc mesenteroides* developing around them.

## Document II

Acetic acid was also suggested as an available carbon substrate for the production of glutamic acid and many strains belonging to genera of *Brevibacterium* and *Corynebacterium* were found to be glutamic acid producing organisms. The disadvantage is that a yield of glutamic acid declines markedly because acetic acid itself prevents microbial growth. Work to improve the technique concentrated on this point and intermittent additions of acetic acid during fermentation resulted in success in industrial production.



A typical pattern of L-glutamic acid fermentation with acetic acid by *Brevibacterium thiogenitalis* D-248.<sup>45)</sup>

●—● L-glutamic acid, ●----● optical density

**Document III**

Différents milieux de concentration variable en biotine sont utilisés pour conduire les fermentations produisant de l'acide glutamique. Le milieu de culture contient 36 mg/mL de glucose, 1,0 mg/mL de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,4 mg/mL de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2 ppm d'ions ferreux et manganés, 2,0 mg/mL d'urée et 5  $\mu\text{L/mL}$  d'hydrolysate protéique de soja. Le milieu est ensemencé avec la souche *Brevibacterium lactofermentum* N° 2256 (ATCC N° 13869) et incubé à 31,5° C pendant 24 heures sous agitation.

Le pH est maintenu voisin de 7,5 – 8,2 par addition d'une solution alcaline.

Concentration en biotine dans le milieu ( $\mu\text{g/L}$ )	Biomasse (g matière sèche/L)	Concentration d'acide L <sup>-</sup> glutamique produit (mg/mL)	Taux intracellulaire en biotine ( $\mu\text{g/g}$ matière sèche)
0	0.4	-	-
1	2.2	19.8	0.5
3	5.0	19.4	0.5
5	7.1	15.5	0.5
10	8.4	0.72	1.1
20	10.7	0.70	1.4
50	10.8	0.72	2.2
100	10.7	0.68	7.6
200	10.9	0.68	13.0
300	11.0	0.70	17.8

**Document IV**

**Relation entre la composition en lipides des membranes cellulaires et le taux d'acide glutamique accumulé lors de différentes expérimentations.**

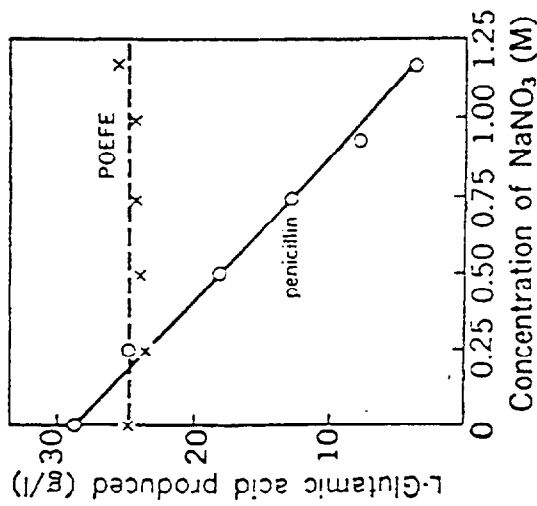
Source de carbone	Additifs	Taux d'Ac glutamique produit		Taux d'acide gras (mg/g matière sèche)				Rapport AG saturés AG insaturés	Taux de phospholipide (mg/g matière sèche)
		12 heures	final	C16	C16 <sup>1=</sup>	C18	C18 <sup>1=</sup>		
Glucose	Biotine 2,5 $\mu\text{g/L}$	16,3	66,3	5,01	0,45	0,26	4,76	1,10	13,1
	Biotine 20 $\mu\text{g/L}$	3,9	5,2	7,11	1,03	0,31	11,20	0,66	22,2
Mélasses	Néant	3,8	5,2	7,37	1,21	0,45	8,79	0,85	24,5
	POEFE 1,5 g/L	20,5	73,7	5,85	0,75	1,06	4,61	1,37	14,6
	Pénicilline 5000 U/L	23,6	69,2	6,55	1,08	0,73	8,11	0,89	23,3

POEFE : Poly Oxy Ethylene sorbitan Fatty acid Ester = Tween

AG = acide gras

### Document V

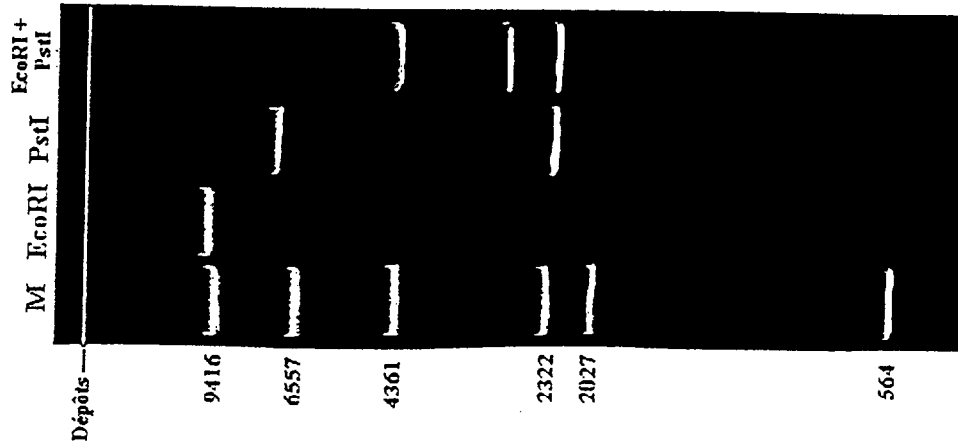
Effet de la pression osmotique extracellulaire sur le taux d'acide L-glutamique excreté.



### Document VI

To increase glutamic acid yield, a recombinant DNA molecule was constructed in a *C. glutamicum* consisting of a plasmid pCG4, encoding streptomycin resistance (Str<sup>r</sup>) and spectinomycin resistance (Sp<sup>r</sup>), and a high copy number plasmid pCG1. pCG1 et pCG4 were isolated from *C. glutamicum*.

### Document VII Résultats pCG<sub>4</sub>



M : marqueur de taille (lambda Hind III)  
La taille des fragments est exprimée en pb.

## DOCUMENT VIII

Exemples, relevés dans la littérature, de biocapteurs ampérométriques utilisant la L-glutamate oxydase (GIOx) ; électrode de référence Ag/AgCl.

	enzyme	transducteur	Tension de Mesure	Immobilisation	domaine de linéarité ( $\mu\text{mol/L}$ )
1	GIOx	platine	O <sub>2</sub> : - 600 mV ou H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> : + 600 mV	inclusion dans la gélatine	10 - 1 000
2	GIOx	platine	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> : 500 mV	co-inclusion avec de la SAB dans une membrane de nylon	0,002 - 10
3	GIOx	membrane de platine silanisée	cellule à circulation H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> : 500 mV	co-réticulation par le glutaraldéhyde avec de la SAB et fixation sur le support silanisé	5 - 1 000
4	GIOx	membrane de la triacétate de cellulose	O <sub>2</sub>	co-réticulation par le glutaraldéhyde et des espaceurs	120 - 840
5	GIOx	feuille de carbone recouverte de platine	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> : > + 400 mV	couplage par divers carbodiimides	0 - 25
6	GIOx	platine	cellule à circulation O <sub>2</sub> : - 650 mV ou H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> : + 650 mV	membrane d'Immobilon -P®	0,05 - 500
7	GIOx	pâte de carbone	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> : + 150 mV	co-réticulation avec la SAB par le glutaraldéhyde	2,6 - 800
8	GiOx	feuille de carbone recouverte de platine	cellule à circulation, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> : + 600 mV	couplage par un carbodiimide	jusqu'à 100 000
9	GIOx	platine	cellule à circulation, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> : + 600 mV	mousse de SAB et de glutaraldéhyde	2 - 100

SAB = sérumalbumine bovine

Immobilon-P® : membrane Millipore™ hydrophobe de fluorure de polyvinylidène (PVDF)

Silanisé = revêtu de groupements silanols.



**Document IX**

Réponse relative d'une sonde ampérométrique enzymatique à GlOx à 17 L-aminoacides.

<b>aminoacide</b>	<b>réponse relative</b>
acide L-glutamique	100,0
acide L-aspartique	18,2
L-sérine	9,9
L-asparagine	8,8
L-valine	8,8
L-glutamine	8,3
L-proline	8,3
L-thréonine	8,3
glycine	7,8
L-leucine	7,8
L-méthionine	7,8
L-histidine	7,8
L-phénylalanine	7,8
L-alanine	0
L-arginine	0
L-lysine	0
L-tryptophane	0