

# BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR

## BIOTECHNOLOGIE

Durée : 4 h 00

Coef. : 6

SESSION 2002

Calculatrices non autorisées

### ÉPREUVE : SCIENCES BIOLOGIQUES FONDAMENTALES ET GÉNIE BIOLOGIQUE

#### L'AMIDON ET SA TRANSFORMATION

L'amidon est la principale forme de réserve carbonée chez les végétaux. Il peut être extrait en grandes quantités des céréales (blé, maïs, riz en particulier) ou d'autres plantes cultivées comme la pomme de terre.

Ce composé est très utilisé dans l'industrie agro-alimentaire en tant que matière première et comme épaississant et agent texturant. En effet, sous l'action de diverses enzymes ( $\alpha$ -amylase par exemple), il génère des molécules entrant en jeu dans la fabrication de la bière à basses calories (sans dextrans), des farines précuites pour enfants et des sirops sucrés comme le sirop de glucose ou de maltose.

En France, de nombreux micro-organismes (bactéries, levures) sont utilisés pour produire industriellement de l' $\alpha$ -amylase, dont *Bacillus subtilis* qui produit cette enzyme sur un milieu contenant des pelures de pommes de terre.

#### 1. Structure, métabolisme et bioconversion de l'amidon (30 points)

- 1.1. Représenter la structure de l'amidon en décrivant l'ose qui le constitue et les différentes liaisons osidiques présentes.
- 1.2. S'agissant d'un polysaccharide de réserve, expliquer quelles sont les relations entre la structure et la fonction de cette molécule.
- 1.3. Les  $\alpha$ -amylases sont des endoglucanases très largement répandues chez les animaux, les plantes, les bactéries et les champignons. Elles catalysent la dépolymérisation de l'amidon et des poly- ou oligo-saccharides apparentés, par hydrolyse sélective des liaisons  $\alpha$ -1,4 glycosidiques. Leur numéro d'ordre est E.C. 3.2.1.1. Rappeler la signification des initiales " E.C. " ainsi que du chiffre " 3 " dans le numéro d'ordre.
- 1.4. L'hydrolyse de l'amidon produit entre autres molécules du maltose ou D glucopyrannosyl  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) D glucopyrannose. Ecrire sa formule développée.
- 1.5. Le maltose est lui-même hydrolysé en oses simples. Ecrire l'équation de cette réaction en précisant le nom des oses libérés ainsi que le nom de l'enzyme responsable de cette hydrolyse.

- 1.6. L'hydrolyse totale de l'amidon produit du sirop de glucose. Le glucose peut être converti en fructose par la glucose isomérase immobilisée par co-réticulation avec de la gélatine.
  - 1.6.1. Indiquer l'intérêt de produire du glucose à partir de l'amidon.
  - 1.6.2. L'isomérisation du glucose est une bioconversion.  
Définir une bioconversion et donner son intérêt dans ce cas précis.
  - 1.6.3. Exposer un autre exemple de bioconversion industrielle.
  - 1.6.4. Rappeler le principe de l'immobilisation par co-réticulation.
  - 1.6.5. Quel est l'avantage de la co-réticulation par rapport à la réticulation simple de l'enzyme ?
  - 1.6.6. Cette bioconversion aboutit à un équilibre où sont en présence 58 % de glucose et 42 % de fructose. Que proposeriez-vous pour améliorer ce rendement ?

## 2. Clonage du gène de l' $\alpha$ -amylase dans des bactéries et des levures (44 points)

- 2.1. Le gène de l' $\alpha$ -amylase de *Bacillus amyloliquefaciens* a été cloné dans un plasmide porteur de la résistance à l'érythromycine et introduit dans *Lactobacillus plantarum*.
  - 2.1.1. Définir un plasmide.
  - 2.1.2. Décrire les trois conformations possibles d'un plasmide.
  - 2.1.3. Préciser les autres vecteurs classiquement employés en génie génétique.
- 2.2. Des enzymes de restriction sont utilisées pour cloner un insert tel que le gène de l' $\alpha$ -amylase dans un plasmide.
  - 2.2.1. Définir une enzyme de restriction.
  - 2.2.2. Quelles sont les particularités des sites reconnus par les enzymes de restriction ?
  - 2.2.3. Dans un tableau, indiquer le principe, les contraintes techniques et les avantages d'un clonage non directionnel et d'un clonage directionnel avec des sites cohésifs dans les deux cas.
- 2.3. Citer deux techniques d'introduction d'un plasmide dans une bactérie et en expliquer le principe.
- 2.4. Indiquer le milieu de sélection à utiliser pour ne sélectionner que les bactéries ayant été transformées avec le plasmide recombinant exprimant l'insert  $\alpha$ -amylase.
- 2.5. L' $\alpha$ -amylase peut être également produite chez une levure. Ainsi, l'acide désoxyribonucléique complémentaire (ADNc) codant pour l' $\alpha$ -amylase d'*Aspergillus oryzae* a été placé sous le contrôle d'un promoteur fort, puis introduit au sein du locus des ADN ribosomiques de la levure de boulanger.
  - 2.5.1. A l'aide de schémas, représenter une technique permettant la fabrication d'un ADNc.
  - 2.5.2. Quel est l'intérêt d'introduire un ADNc dans un locus ribosomique?

- 2.5.3. Pourquoi les levures sont-elles parfois préférées, comme cellules hôtes, aux bactéries ?
- 2.5.4. Schématiser, en mettant en évidence les organites impliqués, le parcours d'une glycoprotéine sécrétée, depuis sa traduction jusqu'à sa sécrétion, dans une cellule eucaryote.

### **3. Production de l' $\alpha$ -amylase en fermenteur (46 points)**

- 3.1. Les souches utilisées pour cette production sont toutes chimio-organotrophes.
  - 3.1.1. Définir le terme de chimio-organotrophe.
  - 3.1.2. Exposer les autres types trophiques énergétiques.
  - 3.1.3. Présenter sous forme d'un tableau les principaux composants d'un milieu de culture pour ce type de microorganisme, à l'échelle du laboratoire et à l'échelle industrielle. Quels sont les avantages et les contraintes liés aux milieux utilisés à l'échelle industrielle ?
  - 3.1.4. Dans le cas particulier de la production d'amylase, quel composant important doit être présent dans le milieu de culture ? Justifier.
- 3.2. Citer un autre micro-organisme producteur d'amylase.
- 3.3. Toute production par fermentation nécessite la sélection d'une souche, l'optimisation et le choix d'un procédé.
  - 3.3.1. Citer les critères retenus pour choisir une souche "bonne productrice" d'enzymes.
  - 3.3.2. Définir l'optimisation de la production et citer les différentes méthodes de régulation et de modélisation utilisées pour optimiser un procédé.
  - 3.3.3. Le procédé choisi est un procédé continu de type chemostat.
    - 3.3.3.1. Schématiser l'appareillage.
    - 3.3.3.2. Expliquer précisément le mécanisme de fonctionnement.
    - 3.3.3.3. Définir le taux de dilution d'une culture continue. Donner un exemple.
- 3.4. L' $\alpha$ -amylase peut être détectée par une technique ELISA :
  - 3.4.1. Décrire, à l'aide de schémas, la structure des différentes immunoglobulines.
  - 3.4.2. Donner le principe général des méthodes de dosages immunoenzymatiques.
  - 3.4.3. Proposer un protocole de détection de l' $\alpha$ -amylase dans un moût de fermentation par une technique ELISA.