

**BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR
BIOTECHNOLOGIE**

Durée : 4 H 00

Coef. : 6

SESSION 2003

Calculatrices non autorisées.

**EPREUVE : SCIENCES BIOLOGIQUES FONDAMENTALES ET GÉNIE
BIOLOGIQUE****Production d' α -amylase thermostable par *Bacillus* et son utilisation en glucoserie**

Les industries agroalimentaires et pharmaceutiques utilisent des millions de tonnes de glucose ou dérivés de glucose. Ces produits n'existent qu'en faible quantité à l'état naturel mais en grande quantité sous forme de glucides de réserve (amidon, cellulose).

Il est donc nécessaire de mettre en œuvre des moyens de transformation de ces réserves. Il s'agit là d'une des principales activités des industries de glucoserie.

Ces transformations sont fondées essentiellement sur l'utilisation d'enzymes hydrolytiques dont l' α -amylase.

Il faut donc produire cette enzyme, le plus souvent par voie microbiologique, puis définir les conditions de son utilisation.

1. Sélection et amélioration d'une souche de *Bacillus* productrice d' α -amylase (45 points)**1.1. Sélection de souches productrices d' α -amylase.**

- 1.1.1. Indiquer les caractères distinctifs du genre *Bacillus* et citer l'espèce toujours pathogène.
- 1.1.2. Présenter une méthode de traitement d'un échantillon de sol permettant une présélection du genre *Bacillus*.
- 1.1.3. Un milieu de culture est utilisé pour sélectionner les souches possédant l'activité α -amylasique.
Donner la nature de la (des) source(s) de carbone et d'azote. Justifier les réponses.
- 1.1.4. Expliquer le principe de la mise en évidence de l'activité de l' α -amylase.
- 1.1.5. Le milieu de culture ne contient pas de glucose. Quel mécanisme de régulation veut-on ainsi éviter ?
- 1.1.6. La régulation de l'expression du gène codant l' α -amylase est soumise à un contrôle du type opéron lactose. Décrire, à l'aide de schémas, le fonctionnement de cet opéron.

1.2 Amélioration des souches sélectionnées.

Les souches bactériennes précédemment sélectionnées révèlent une production d' α -amylase insuffisante.

On cherche à augmenter la synthèse et l'excrétion de l'enzyme par génie génétique.

Pour ce faire on utilise un vecteur d'expression.

- 1.2.1. Définir le terme vecteur d'expression.
- 1.2.2. Donner les caractéristiques essentielles d'un vecteur d'expression.
- 1.2.3. On introduit dans un vecteur d'expression une séquence d'ADN codant un peptide signal.

- 1.2.3.1. Quel est l'intérêt de rajouter cette séquence dans la stratégie de production d' α -amylase ?
- 1.2.3.2. Décrire le mode d'action du peptide signal. Justifier ce mode d'action par la composition du peptide signal.
- 1.2.4. Présenter (éventuellement sous forme de schémas) les principales étapes du clonage d'un gène de l' α -amylase jusqu'à l'obtention d'un clone d'intérêt et ce, en utilisant un plasmide comme vecteur d'expression.

2. Production industrielle de l' α -amylase (30 points)

2.1 La souche recombinée a été utilisée pour une production à grande échelle en fermenteur aéré de type « batch » (bioréacteur à milieu non renouvelé).

Proposer un schéma annoté de ce type de fermenteur. Schématiser les dispositifs permettant l'enregistrement en ligne des principaux paramètres.

2.2. Certains de ces paramètres sont régulés. Cette régulation s'effectue par l'intermédiaire de « boucles de régulation ».

Schématiser une boucle de régulation en indiquant les divers éléments qui la constituent et leurs interrelations.

2.3. Le dioxygène dissous est un paramètre critique tant d'un point de vue métabolique que d'un point de vue technologique.

Expliciter son rôle dans la réoxydation des coenzymes réduits.

2.4. En quoi le dioxygène est-il un paramètre critique d'un point de vue technologique ?

2.5. Le $K_L a$ est un paramètre lié à l'aération du fermenteur. Quel est l'intérêt de la détermination de ce paramètre ? Quelle en est l'unité ? Comment le détermine-t-on en présence d'une culture bactérienne ?

3. Utilisation industrielle de l' α -amylase (16 points)

L'enzyme produite est utilisée en glucoserie pour transformer du lait d'amidon.

3.1. A quelle classe de glucide l'amidon appartient-il ?

Donner la composition et la structure complète de l'amidon sous forme de schéma.

Indiquer la structure de(s) monomère(s) et le type de liaisons qui les relient entre eux.

Identifier les extrémités réductrices et non réductrices des molécules d'amidon sur le schéma. Justifier la réponse.

3.2. L' α -amylase est une α (1 \rightarrow 4) D glucane hydrolase.

A l'aide de formules semi-développées, écrire la réaction d'hydrolyse que catalyse cette enzyme. Indiquer, sur le schéma de l'amidon précédemment réalisé, les sites de coupure reconnus par l' α -amylase et citer les produits et les sous-produits d'hydrolyse obtenus.

3.3. L' α -amylase est active sur le glycogène mais pas sur la cellulose. Expliquer ces deux observations.

4. Valorisation du lait d'amidon (29 points)

- 4.1. Le lait d'amidon est traité dans un premier temps par l' α -amylase à 88°C pendant 1 h 30 min. La courbe du document 1 représente l'activité d'une α -amylase en fonction de la température.
 - 4.1.1. Interpréter cette courbe.
 - 4.1.2. Certaines enzymes industrielles sont dites « thermostables » ; préciser le sens de ce terme. Indiquer l'intérêt de leur utilisation.
 - 4.1.3. Tracer sur le graphe du document 1 la courbe représentant l'activité d'une α -amylase thermostable en fonction de la température. Justifier.
 - 4.1.4. Proposer deux démarches générales permettant l'obtention d'enzymes thermorésistantes.

- 4.2. Une des utilisations majeures du sirop de glucose obtenu consiste à le soumettre à l'action d'une glucose isomérase immobilisée.
 - 4.2.1. Écrire la réaction catalysée par la glucose isomérase (formules non demandées).
 - 4.2.2. Quel est le nom classiquement donné au produit obtenu et sa principale propriété.
 - 4.2.3. Préciser l'intérêt de l'immobilisation d'une enzyme dans le cadre d'une production industrielle.
 - 4.2.4. Indiquer les deux grands types d'immobilisation d'enzymes et préciser en le justifiant, le procédé qui est a priori le plus adapté dans le cadre de l'utilisation présentée ici.

DOCUMENT 1 (à rendre avec la copie)

Activité d'une α -amylase en fonction de la température

