

upbm-édilion

ANNALES

B.T.S

BIOTECHNOLOGIE



ANNALES

Brevet de Technicien Supérieur

BIOTECHNOLOGIE

sessions 1986 - 1987



PUBLICATIONS DE L'UPBM

Diffusion : UPBM - ÉDILION, Lycée Technique
« La Martinière », 4^e avenue, La Duchère,
69338 Lyon Cedex 9.

B.T.S. Biotechnologie

Sommaire

- 4 ---- Règlement d'examen
- 5 ---- Définition de la nature des épreuves
 - Epreuves de la session 1986
 - Epreuves de la session 1987

Annales réalisées par Gérard COUTOULY
professeur au LEGTP Jean Rostand
à Strasbourg

**Union des Professeurs
de Physiologie
Biochimie et Microbiologie**

Lycée Technique « La Martinière »
La Duchère
69338 LYON CEDEX 9
C.C.P. LYON 5785-38 U

Création et conditions de délivrance du brevet de technicien supérieur Biotechnologie

R.L.R. : 544-4

Arrêté du 29 mai 1986

(Education nationale : bureau DL 5)

Vu code de l'enseignement technique ; code du travail, not. livre IX ; L n° 71-577 du 16-7-1971 ; L n° 75-620 du 11-7-1975 ; L n° 84-52 du 26-1-1984 ; L de programme n° 85-1371 du 23-12-1985 ; D n° 59-57 du 6-1-1959 ens., D n° 62-216 du 26-2-1962 ; D n° 76-1304 du 28-12-1976 ; avis de la commission professionnelle consultative de la chimie exprimé le 17-10-1985 ; avis du conseil de l'enseignement général et technique du 27-2-1986.

Article premier. — Il est créé un brevet de technicien supérieur Biotechnologie. Le brevet de technicien supérieur Biotechnologie est délivré aux candidats ayant subi avec succès un examen dont le règlement est fixé par le présent arrêté et ses deux annexes.

Art. 2. — Pour se présenter à l'examen, les candidats doivent :

a) soit justifier de deux années d'études spécialisées dans un lycée ou un établissement assurant la préparation à ce brevet de technicien supérieur ;

b) soit, à la date de la session d'examen, justifier avoir suivi une formation sanctionnée par un diplôme classé au niveau IV des formations dans la nomenclature utilisée par la commission d'homologation des titres et diplômes de l'enseignement technologique et exercer dans la profession à plein temps depuis trois ans au moins au-delà de la période légale d'apprentissage ;

c) soit, à la date de la session d'examen, avoir suivi assidûment des actions de formation continue préparant à cet examen pendant trois années consécutives ou pendant mille deux cents heures.

Art. 3. — Une seule session d'examen est organisée chaque année. La date des épreuves, les dates d'ouverture et de clôture des registres d'inscription sont fixées par le ministre de l'Education nationale. La liste des pièces à fournir lors de l'inscription est fixée par les recteurs.

Art. 4. — L'examen comprend un seul groupe d'épreuves. Le brevet de technicien supérieur Biotechnologie est délivré à tous les candidats ayant obtenu d'une part une moyenne générale égale ou supérieure à 10/20 à l'ensemble des épreuves affectées de leur coefficient et d'autre part une note égale ou supérieure à 10/20 à l'épreuve professionnelle de synthèse.

Lorsque la moyenne des notes obtenues se situera à un niveau inférieur mais proche de celui qui détermine l'admission, le jury procédera à l'examen du livret scolaire des candidats ayant suivi une préparation à l'examen : si cet examen met en évidence une disparité importante entre la moyenne obtenue et les résultats consignés dans le livret scolaire, le jury pourra décider de relever la moyenne atteinte en attribuant une note plus élevée à telle épreuve orale ou à telle composition écrite après en avoir délibéré avec le ou les correcteurs de l'épreuve incriminée.

Le relèvement global des points obtenus ne devra être adopté que dans des cas exceptionnels, sur proposition du président du jury.

Un candidat éliminé peut, sur sa demande, conserver pendant deux sessions le bénéfice d'un résultat favorable obtenu soit à l'épreuve professionnelle de synthèse, soit à l'ensemble des autres épreuves de l'examen.

Lorsque ce candidat se représente à une session ultérieure, le diplôme lui est délivré s'il obtient une moyenne égale ou supérieure à 10/20 calculée en fonction des notes des épreuves dont il a demandé à conserver le bénéfice et des notes des épreuves à nouveau subies.

Art. 5. — Le diplôme de technicien supérieur Biotechnologie est délivré par le recteur d'académie.

Art. 6. — La première session du brevet de technicien supérieur Biotechnologie organisée conformément aux dispositions du présent arrêté aura lieu en 1986. Ces dispositions sont applicables aux sessions 1986, 1987 et 1988.

Art. 7. — Le directeur des Lycées est chargé de l'exécution du présent arrêté qui sera publié au *Journal officiel* de la République française. (1)

Pour le ministre et par délégation :

Le directeur des Lycées,

P. ANTONMATTEI.

(J.O. du 11 juin 1986)

(1) Le présent arrêté et ses deux annexes seront diffusés par le Centre national de documentation pédagogique, 29, rue d'Ulm, 75230 Paris Cedex 05.

ANNEXE 1

Règlement d'examen

Epreuve	Forme	Durée max.	Coef.
Français	Ecrit	3 h	2
Anglais	Ecrit Oral	2 h 30 min	2

Mathématiques et Sciences physiques	Ecrit	4 h	4
Sciences biologiques fondamentales et génie biologique	Ecrit	4 h	6
l'étude de projet et réalisation pratique d'opérations de génie biologique	Ecrit TP	4 h 8 h	4 8
Soutenance du rapport de stage	Oral	1 h	4*
	Total	26h30mn	30
Epreuve facultative : LV II	Oral	30 min	1

* Le coefficient 4 attribué à la soutenance du rapport de stage se décompose en :

- 2 pour les compétences scientifiques, technologiques et professionnelles ;
- 1 pour les compétences en français ;
- 1 pour les compétences en économie et gestion.

ANNEXE II

Définition des épreuves

1. Epreuve de français

Modalités de l'épreuve :

- Epreuve écrite
- Durée : 3 heures
- Coefficient : 2

Objet et contenu de l'épreuve

L'épreuve a pour but de vérifier l'aptitude du candidat, d'une part à saisir dans un texte les idées essentielles et leur organisation logique, d'autre part à s'exprimer correctement et avec simplicité.

On proposera un texte de cinquante à cent lignes dactylographiées qui offre par lui-même un sens assez complet, qui soit clair et bien composé et qui se prête à une analyse d'idées.

Le texte proposé portera sur les problèmes de la vie moderne, problèmes de culture personnelle et de relations sociales qui peuvent intéresser un futur technicien. On tiendra compte dans le choix du texte des caractéristiques particulières du domaine professionnel auquel le candidat se destine.

Le candidat devra :

- a) résumer le texte en un nombre limité de mots ;
- b) répondre à quelques questions destinées à lui faire préciser et expliquer le sens de notions et de mots importants du texte en témoignant de la culture générale qu'il a reçue ;
- c) exprimer dans un commentaire succinct et composé ses vues personnelles sur l'ensemble ou sur un aspect particulier du texte.

2. Epreuve d'anglais

- Ecrit : durée = 2 heures
- Oral : durée maximale = 30 min
- Coefficient : 2.

L'épreuve écrite entrera pour deux tiers et l'épreuve orale pour un tiers.

Partie écrite

L'épreuve doit permettre de vérifier les capacités du candidat à :

- lire une lettre à caractère technique et en rendre compte ;
- comprendre des articles de revues spécialisées ;
- utiliser des notices, modes d'emploi, diagrammes et schémas en anglais concernant des matériels étrangers.

Cette épreuve comprendra d'abord la traduction ou le compte rendu d'un texte extrait d'un document technique ; lui fera suite la rédaction d'un texte se rapportant au sujet étudié précédemment.

Partie orale

L'épreuve consistera en un entretien avec le jury, destiné à vérifier la maîtrise des structures essentielles de la langue.

Epreuve facultative

Langue vivante II

Epreuve orale : durée maximale : 30 min

Coefficient : 1

Seuls les points au-dessus de 10 seront pris en compte pour le total obtenu par le candidat.

L'épreuve doit permettre d'apprécier les capacités du candidat :

- à lire, analyser et commenter succinctement un document se rapportant au domaine professionnel et écrit dans la langue choisie ;

-- à s'exprimer convenablement dans les domaines de ses futures activités, dans cette langue.

Cette épreuve, qui pourra être précédée par une préparation de 30 minutes au maximum, consistera en un entretien avec le jury et pourra comporter la lecture et le résumé du texte par le candidat et une conversation sur ce texte.

3. Epreuve de mathématiques - Sciences physiques

- Epreuve écrite
- Durée = 4 heures
- Coefficient = 4

L'épreuve comporte deux parties obligatoires, organisées en continuité.

Première partie : Mathématiques (coefficient = 1,5)

Objectifs :

L'enseignement des mathématiques a pour triple objectif de fournir un outil efficace pour les sciences physiques et biologiques et la technologie, de développer la formation scientifique et de contribuer à la formation personnelle et relationnelle. Par suite, cette première partie d'épreuve doit permettre :

- d'apprécier la solidité des connaissances des candidats et leur capacité à les utiliser dans des situations variées ;
- de vérifier leur aptitude au raisonnement et leur capacité à analyser correctement un problème, à justifier les résultats obtenus et à apprécier leur portée ;
- d'apprécier leurs qualités dans les domaines de l'expression écrite et de l'exécution soignée de tâches diverses (tracés graphiques, calculs à la main ou sur machine).

Nature de cette partie d'épreuve :

Cette partie d'épreuve écrite est prévue pour une durée de deux heures.

Les sujets comportent deux exercices de mathématiques recouvrant une part très large du programme. Les thèmes mathématiques qu'ils mettent en œuvre portent principalement sur les chapitres les plus utiles pour les sciences et techniques biologiques.

L'épreuve porte sur des applications directes des connaissances de cours.

Il convient d'éviter toute difficulté théorique et toute technicité mathématique excessive.

La longueur et l'ampleur du sujet doivent permettre à un candidat moyen de traiter le sujet et de le rédiger posément dans le temps imparti.

Les deux points suivants doivent être rappelés en tête des sujets :

— La clarté des raisonnements et la qualité de la rédaction interviendront pour une part importante de l'appréciation des copies.

— L'usage des instruments de calcul et du formulaire officiel de mathématiques est autorisé.

Deuxième partie : Sciences physiques (physique et/ou chimie - coefficient : 2,5)

Cette seconde partie de l'épreuve doit permettre d'apprécier le niveau des connaissances en sciences physiques du candidat et son aptitude à les utiliser dans des situations concrètes proches du domaine technique où il est appelé à intervenir.

Elle comporte plusieurs questions indépendantes ou exercices indépendants.

Les questions posées se rapportent à des applications concrètes dont la compréhension ne doit faire appel qu'à des notions fondamentales du programme.

Cette épreuve doit permettre de vérifier que le candidat :

- analyse convenablement un problème posé en utilisant judicieusement ses connaissances scientifiques ;
- prend en compte l'ensemble des données et des hypothèses ;
- propose une solution justifiée par un raisonnement logique, élaborée en faisant appel au contenu du programme.

4. Epreuve de sciences biologiques fondamentale et génie biologique

- Epreuve écrite
- Durée : 4 heures
- Coefficient : 6

Cette épreuve doit permettre d'apprécier le niveau des connaissances du candidat dans les domaines de la biochimie, de la biologie cellulaire et moléculaire, de la microbiologie et du génie biologique. Elle doit avoir un caractère pluridisciplinaire.

Elle comporte plusieurs questions indépendantes.

5. Epreuve professionnelle de synthèse : étude de projet et réalisation pratique d'opérations de génie biologique

- Epreuve écrite et pratique
- Durée maximale : 12 heures
- Coefficient : 12

Cette épreuve comporte deux parties obligatoires.

Première partie : Etude de projet

- Partie écrite
- Durée : 4 heures
- Coefficient : 4

Cette partie a pour but de vérifier les capacités de réflexion en vue de la résolution d'un problème biotechnologique simple pouvant relever des domaines de la biochimie, de la biologie cellulaire et moléculaire, de la microbiologie et du génie biologique.

Elle doit permettre d'apprécier :

- les capacités :
- d'analyse du problème ;
- de conception d'un simple projet et de définition d'une stratégie expérimentale ;
- d'utilisation de documents, éventuellement, de langue anglaise ;
- de prise en compte des aspects concernant la sécurité, la législation et la gestion ;
- d'utilisation des techniques et du matériel, notamment informatique ;
- l'esprit d'initiative.

Deuxième partie : Réalisation pratique d'opérations de génie biologique

- Partie pratique
- Durée maximale : 8 heures
- Coefficient : 8

Cette partie a pour but de vérifier les savoir-faire en biotechnologie, notamment dans les domaines de la biochimie, de la biologie cellulaire et moléculaire, de la microbiologie et du génie biologique.

Elle est pluridisciplinaire.

Elle doit permettre de vérifier les capacités :

- de mise en œuvre d'un protocole opératoire dans des conditions satisfaisantes de sécurité et d'efficacité ;
- d'organisation ;
- de rigueur et de précision dans l'exécution ;
- d'exploitation des résultats.

Elle peut se dérouler en plusieurs parties.

Elle comporte plusieurs questions liées ou indépendantes.

Elle a un caractère essentiellement pratique.

Elle donne lieu à un compte rendu et peut, éventuellement, faire appel aux techniques de l'informatique.

6. Epreuve de soutenance du rapport de stage ou d'activité professionnelle

- Epreuve orale
- Durée maximale = 1 heure
- Coefficient = 4 (2 pour les compétences scientifiques, technologiques et professionnelles.
1 pour les compétences en français
1 pour les compétences en économie et gestion).

L'épreuve a pour but de vérifier :

1. en ce qui concerne la connaissance professionnelle et humaine de l'entreprise, si le candidat est capable de :

- saisir les données constitutives d'une entreprise ou d'un laboratoire ;
- comprendre le fonctionnement d'une entreprise ou d'un laboratoire sur les plans de la technique et de l'organisation ;
- présenter les activités d'un stage en analysant les problèmes techniques rencontrés et les démarches adoptées.

2. en ce qui concerne la communication et l'expression, si le candidat est capable de :

- dégager, ordonner et mettre en valeur les points essentiels d'un document à caractère technique ;
- maîtriser les techniques de la communication orale devant un auditoire non familier ;
- utiliser la langue française correctement et avec clarté.

Le candidat présentera et soutiendra oralement le rapport qu'il aura établi à l'issue de son stage de deuxième année en entreprise, s'il s'agit d'un candidat scolarisé ou un rapport sur son activité professionnelle s'il s'agit d'un candidat dispensé de stage en raison d'un emploi salarié.

Il devra notamment faire apparaître le caractère spécifique de l'entreprise où il aura effectué son stage ou exercé son activité professionnelle, rendre compte de la visée, du déroulement et de l'aboutissement du stage lui-même ou de l'activité professionnelle, exposer les réflexions en particulier d'ordre technique que le stage ou l'activité professionnelle lui aura inspirées.

La présentation n'excédera pas 20 minutes.

La seconde partie de l'épreuve pourra être consacrée à un dialogue entre le jury et le candidat.

Le rapport de stage ou d'activité professionnelle de dix à vingt pages dactylographiées (ou quinze à trente pages manuscrites), sans compter les documents techniques, comprendra :

- une présentation schématique de l'établissement de stage et du déroulement du stage de deuxième année ou de l'activité professionnelle exercée dans le domaine de la biotechnologie ;

- le compte rendu d'un travail personnel ;
- une réflexion personnelle concernant l'activité professionnelle et un bilan sur ce stage ou sur cette activité professionnelle.

Ce travail devra prendre en compte les problèmes de sécurité et de législation.

Les documents indispensables à la compréhension de ce rapport pourront figurer en annexe.

Pour les candidats scolarisés, la fiche de stage sera jointe.

L'évaluation des aspects scientifiques, techniques et professionnels se fera selon la répartition suivante :

- dossier écrit : coefficient 1 ;
- présentation orale et entretien : coefficient 1.

La commission de jury pour cette épreuve doit comprendre :

- un professeur de français ;
- un professeur d'économie et gestion ou de sciences et techniques économiques ;
- un professeur chargé d'enseignement technologique.

Les candidats autorisés ayant échoué à l'examen peuvent :

- soit présenter de nouveau le rapport soutenu lors de la session à laquelle ils ont échoué ;
- soit, s'ils le jugent nécessaire, modifier celui-ci dans le sens qu'ils estiment opportun ou refaire un nouveau stage et rédiger un nouveau rapport qui tient compte des situations rencontrées au cours de ce second stage et qui peut reprendre des observations rassemblées au cours du premier stage.

EPREUVES DE LA SESSION 1986

SCIENCES BIOLOGIQUES FONDAMENTALES ET GENIE BIOLOGIQUE

Durée : 4 h

Coef. : 6

REMARQUES PRELIMINAIRES

- 1 – Le sujet proposé est, à l'image des biotechnologies, nécessairement pluridisciplinaire : le candidat devra veiller à répondre d'une manière concise aux différentes questions posées.
- 2 – On peut suggérer au candidat de consacrer impérativement à chaque question un temps prenant en compte le nombre de points attribués.

L'INSULINE : STRUCTURE ET PROPRIETES BIOLOGIQUES DOSAGE DANS LE PLASMA ET PRODUCTION INDUSTRIELLE

En 1921, à Toronto, BANTING et BEST ont isolé du pancréas du chien un polypeptide sécrété par les îlots de Langerhans : l'insuline.

Cette substance est constituée de 2 chaînes peptidiques nommées A et B reliées par des ponts disulfure.

1. RELATIONS ENTRE STRUCTURE ET PROPRIETES BIOLOGIQUES (30 points)

- 1.1. Préciser les différents niveaux d'organisation structurale d'un polypeptide ou d'une protéine. (5 points)
- 1.2. Indiquer en quoi la structure d'un polypeptide ou d'une protéine détermine ses propriétés biologiques. (25 points)

2. PROPRIETES BIOLOGIQUES ET DOSAGE DE L'INSULINE (30 points)

- 2.1. L'insuline agit au niveau de la membrane cellulaire en augmentant la perméabilité au glucose, ceci au niveau d'un récepteur spécifique dont le fonctionnement est encore mal connu.
Dégager les principaux problèmes posés par la composition et la structure de la membrane cytoplasmique pour ce qui est de la perméabilité aux substances non électrolytiques.
Quels mécanismes de modification de cette perméabilité peuvent être mis en jeu ?
Les récepteurs membranaires hormonaux ne jouent-ils que ce rôle ? Exemple.

- 2.2. Le diabète insulino-dépendant constitue la manifestation pathologique fréquente d'un défaut de production d'insuline par le pancréas. Le dosage de cette substance s'avère donc un test biologique fondamental.
- Donner les principes des techniques de dosage de l'insuline faisant appel à ses propriétés antigéniques.

3. PRODUCTION INDUSTRIELLE D'INSULINE (60 points)

Si les diabètes sont connus depuis l'antiquité en tant que maladies se traduisant par l'émission de grandes quantités d'urine, ce n'est qu'au début du XIXème siècle que DOBSON mit en évidence un excès de sucre dans le sang et les urines (d'où le nom de diabète sucré). Le rôle du pancréas fut mis en évidence en 1868 et en 1916; Sir Edward SHARPY-SCHAFFER attribua le diabète sucré à un déficit de sécrétion par les îlots de Langerhans d'une substance hypothétique qu'il nomma "insuline".

En fait, le traitement de 10 % des malades atteints de diabète sucré relève d'un apport d'insuline : il s'agit d'un diabète "insulino-dépendant". Le nombre de personnes concernées dans le monde est néanmoins énorme.

Ainsi, en 1979, on estimait à 60 millions le nombre de malades atteints de diabète sucré ; parmi ceux-ci 4 millions ont besoin d'insuline.

En France, pour la même période, on comptait 1 million de diabètes dépistés ; parmi ceux-ci, seuls, 100 000 sont insulino-dépendants.

Le taux d'accroissement de la population diabétique mondiale s'accroît davantage que celui de la population générale. C'est dire la nécessité d'une production d'insuline à l'échelle industrielle.

3.1. Divers modes d'obtention de protéines à l'échelle industrielle. (5 points)

Préciser les divers modes d'obtention possibles et, à propos de chacun d'eux, indiquer les avantages et les inconvénients tant des points de vue scientifique que technologique et économique

3.2. Production par procédé mettant en jeu les biotechnologies. (50 points)

On réalise successivement :

- l'introduction, grâce aux techniques du génie génétique, de la séquence codant pour l'insuline dans une cellule hôte ;
- la culture en bioréacteur de la cellule recombinée ;
- l'extraction et la purification de l'insuline formée.

3.2.1. Génie génétique (20 points)

3.2.1.1. Obtention de la séquence d'ADN codant pour une protéine donnée. (5 points)

Préciser, sous forme de schémas, les diverses techniques permettant l'obtention de la séquence d'ADN codant pour une protéine donnée.

3.2.1.2. Insertion de la séquence dans un vecteur. (10 points)

3.2.1.2.1. Définir le terme de vecteur ; préciser les propriétés caractéristiques des vecteurs et les principaux types de vecteurs.

3.2.1.2.2. Schématiser et expliquer une technique d'insertion d'une séquence d'ADN donnée, dans un plasmide ; comment contrôler que l'insertion s'est effectuée dans le bon sens ?

3.2.1.3. Expression de la séquence d'ADN introduite dans la cellule hôte. (5 points)

Préciser les types de séquences régulatrices à inclure à la séquence codant pour la protéine afin de permettre l'expression dans une cellule hôte telle que *Escherichia coli*. Quels seraient les changements à apporter si la cellule hôte était une cellule eucaryote ?

3.2.2. Génie fermentaire (30 points)

On considérera que dans ce qui suit que la cellule hôte est *Escherichia coli*.

3.2.2.1. Schéma d'un bioréacteur classique (type PORTON) à agitation par le haut ; on fera figurer les divers dispositifs permettant le suivi d'une fermentation. (10 points)

3.2.2.2. Culture d'*Escherichia coli*. (20 points)

A propos de cette culture industrielle, montrer l'importance des différents paramètres nutritifs influençant la croissance. (10 points)

Énumérer les divers paramètres physico-chimiques en les commentant brièvement. (10 points)

3.2.3. Extraction et purification (5 points)

L'hormone est ensuite extraite et purifiée. Étant destinée à être injectée dans le corps humain, la purification doit être maximale. Pour la contrôler, on a recours à divers critères de pureté.

3.2.3.1. Citer les principales techniques utilisées comme critère de pureté biochimique.

3.2.3.2. Quels sont les autres types de critères de pureté à considérer lors d'une production par biotechnologie d'une substance injectable ?

MATHEMATIQUES ET SCIENCES PHYSIQUES

Durée : 4 h

Coef. : 4

Le candidat traitera les deux parties du sujet sur des copies distinctes qui seront relevées séparément.

PREMIERE PARTIE : MATHEMATIQUES (Coef. : 1,5)

La clarté des raisonnements et la qualité de la rédaction interviendront pour une part importante dans l'appréciation des copies.

L'usage des instruments de calcul est autorisé.

EXERCICE I

1 - Intégrer l'équation différentielle (1)

$$(1) \quad \frac{dy}{dt} = \frac{-ay}{b+y}$$

où y est une fonction numérique de la variable réelle t .

Déterminer la solution particulière de cette équation telle que pour $t = 0$, $y = y_0$.

Pour la suite de cette partie I, nous prendrons les valeurs numériques suivantes :

$$a = 10^3 \quad b = 5 \cdot 10^4 \quad y_0 = 10^{-3}$$

2 - Soit f la fonction qui à y réel fait correspondre le nombre réel t défini par :

$$t = f(y) = \frac{-1}{a} \left[b \ln \left(\frac{y}{y_0} \right) + y - y_0 \right]$$

Le symbole \ln désigne la fonction logarithme Népérien.

a. Etudier les variations de la fonction f .

b. Tracer sa courbe représentative (C) dans un repère orthogonal, pour les valeurs de y dans l'intervalle $]0, y_0[$.

unités sur l'axe des abscisses : 2 cm pour 0,0001

unités sur l'axe des ordonnées : 1 cm pour 0,0000001

c. Démontrer que f est une application bijective de $]0, y_0[$ dans $]0, +\infty[$.

d. Soit f^{-1} la fonction réciproque de f .

Démontrer que f^{-1} est solution de l'équation différentielle (1).

e. Tracer la courbe (G) représentant f^{-1} .

f. Calculer la valeur t_1 de la variable t pour laquelle $y = \frac{y_0}{10}$.

EXERCICE II : CINÉTIQUE ENZYMATIQUE

1 – Dans la relation (2) suivante :

$$(2) \quad V = \frac{V_m \cdot S}{K + S}$$

On pose $X = \frac{1}{S}$ et $Y = \frac{1}{V}$

a. Démontrer qu'il existe deux nombres réels A et B tels que si V et S vérifient la relation (2), Y et X sont liés par la relation (3) :

$$(3) \quad Y = AX + B$$

b. Calculer A et B en fonction des constantes V_m et K.

c. Calculer V_m et K en fonction de A et B.

2 – Les mesures de V en fonction de S ont donné le tableau suivant :

S_i :	0,0001	0,0002	0,0003	0,0004	0,0005	0,0006	0,0007	0,0008	0,0009	0,001
V_i :	171	294	386	461	512	572	615	636	676	701

a. Etablir le tableau des valeurs X_i et Y_i obtenues par :

$$X_i = \frac{1}{S_i} \quad Y_i = \frac{1}{V_i}$$

b. Représenter les points de coordonnées X_i et Y_i dans le plan rapporté à un repère orthogonal
(unités sur l'axe des abscisses : 2 cm pour 1000 ;
unités sur l'axe des ordonnées : 2 cm pour 0,001)

c. Calculer les moyennes des valeurs de X et Y ainsi obtenues.

Calculer la variance de X ainsi que la covariance du couple (X, Y).

d. Déterminer les coefficients de la droite de régression linéaire de Y par rapport à X.
(Méthode des moindres carrés).

e. Déterminer les valeurs des constantes K et V_m de cette expérience.

DEUXIEME PARTIE : SCIENCES PHYSIQUES (Coef. : 2,5)

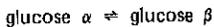
Les trois questions A, B et C sont indépendantes.

A – Etude d'une application de la polarimétrie (20 points)

1 – Énoncer la loi de Biot dans le cas d'une substance optiquement active en solution dans un solvant inactif, puis dans le cas d'un mélange.
Quelle est l'origine du pouvoir rotatoire ?

2 – Cinétique de la mutarotation du glucose

Il existe deux isomères stables du glucose : le glucose α et le glucose β . Les cristaux de glucose sont formés par le composé α . Lors de la dissolution, il se produit une transformation de glucose α en glucose β .



Le composé α ayant un pouvoir rotatoire spécifique différent de celui du glucose β , la cinétique peut être étudiée par polarimétrie.

On a obtenu les résultats suivants :

temps t min	0	6	8	13	15	20	Equilibre
angle A (degré)	24,75	23,50	23,15	22,25	21,90	21,10	11,50

2.1. Montrer que, dans cette réaction réversible, on est ramené à une cinétique d'ordre 1 et que la constante de vitesse K peut s'écrire :

$$K = \frac{1}{t} \ln \frac{C_{2e}}{C_{2e} - x}$$

Notations : x = concentration en glucose β au temps t

C_{2e} = concentration en glucose β à l'équilibre

C_{10} = concentration en glucose α à t = 0

2.2. Exprimer A_0 , A_t et A_e en fonction de l , a , b , c_{10} , c_{2e} et x .

A_0 = angle à t = 0

A_t = angle au temps t

A_e = angle à l'équilibre

l = longueur du tube polarimétrique

a = pouvoir rotatoire spécifique du glucose α

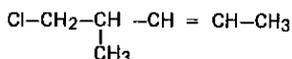
b = pouvoir rotatoire spécifique du glucose β

Montrer que
$$\frac{c_{2e}}{c_{2e} - x} = \frac{A_0 - A_e}{A_t - A_e}$$

2.3. Calculer la valeur moyenne de K.

B – Chimie organique (15 points)

- 1 – Ecrire des formes mésomères possibles pour les molécules de benzophénone et de benzaldéhyde (aldéhyde benzoïque).
- 2 – Donner un exemple d'addition nucléophile et un exemple de substitution électrophile. Expliquer le mécanisme de la réaction dans chacun des cas.
- 3 – Représenter et nommer les stéréoisomères de formule semi-développée :



- 4 – Donner l'allure des spectres de résonance magnétique nucléaire des molécules suivantes :
a) éthylbenzène ; b) butanone ; c) méthyl-2 propanal.

C – Thermochimie (15 points)

On donne les enthalpies standard de formation et les entropies standard des composés suivants :

Composés	H ₂ (g)	CO ₂ (g)	H ₂ O(g)	CO(g)
$\Delta H^\circ_{f,300\text{K}}$ (en kJ.mol ⁻¹)		-393,50	-241,80	-110,50
$S^\circ_{300\text{M}}$ (en J.mol ⁻¹ . K ⁻¹)	130,4	213,7	188,8	197,9

- 1 – Calculer la variation d'enthalpie libre standard, à 300 K, pour la réaction :
$$\text{CO(g)} + \text{H}_2\text{O(g)} \rightleftharpoons \text{CO}_2\text{(g)} + \text{H}_2\text{(g)}$$
- 2 – En déduire la constante d'équilibre, à 300 K. ($R = 8,31 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$).
- 3 – Dans quel sens est déplacé l'équilibre lorsque la température augmente ?
- 4 – On mélange, à 300 K 1 mol de CO(g) et 1 mol de H₂O(g), sous une pression totale égale à 1 bar. Quelles seront les pressions partielles des différents gaz à l'équilibre ?

FRANÇAIS

Durée : 3 h

Coef. : 2

PASSION DE JUSTICE ET PASSIONS MALEFIQUES

Et d'abord la passion de justice, démarche superbe et incongrue, surgissant avec l'homme dans la longue histoire du monde. La vie de millions d'espèces, depuis trois milliards d'années, n'avait trouvé son équilibre que dans une amoralité universelle. Le sentiment moral est humain, exclusivement humain. Si l'homme avait aujourd'hui l'idée saugrenue d'appliquer un jugement moral aux lois biologiques qui permirent, avant son arrivée sur la terre, l'incroyable développement du monde vivant et sa propre apparition, il y trouverait de belles marques d'inégalités, d'injustices et d'implacable cruauté. Le principe même de la sélection naturelle est fondé sur la disparition du faible et du mal-adapté, au point que quelques sociobiologistes, fascinés par le succès de cette histoire amorale, ont osé qualifier de recommandation malfaisante le respect du faible et du mal-adapté, inventé par la morale des hommes. C'était, me semble-t-il, ne rien comprendre à l'aventure humaine. Le pied de nez que l'élan de nos passions morales fait à la cruauté naturelle est cette aventure et, une fois encore, une manière de sortir de notre cage. C'est la preuve que notre univers spirituel nous ouvre des horizons illimités, contrastant avec les frontières où nous enferment nos capacités de connaissance du monde extérieur. Notre rêve de justice n'est pas bridé en nous, même si la réalité de chaque jour nous chuchote que c'est un rêve impossible. La passion de la justice, les passions morales apportent le premier exemple de passions-révoltes. Libre à certains biologistes de les déclarer malsaines. Certes, il nous appartient d'être, comme on dit, réalistes ; si, au nom de la justice, nous confondions aveuglément l'égalité des droits de tous avec un égalitarisme sordide interdisant à chacun de dépasser son voisin, nous casserions la merveille d'une autre aventure humaine, celle qui nous donne la chance d'avoir, dans l'espèce animale à laquelle nous appartenons, des Jean-Baptiste Poquelin, des Rembrandt Van Rijn, des Louis Pasteur, des Albert Einstein ou des Mère Térésa. Mais ce serait déviation de l'idée de justice, et non limitation. Pour nous, qui cherchons désespérément à donner un sens à notre vie, le moindre abandon de nos impératifs moraux serait l'abandon d'une chance inespérée que seul l'homme possède, dans l'immensité indifférente de l'univers.

Bien entendu, le monde spirituel de l'homme est aussi possédé par ce qu'on pourrait appeler les passions maléfiqes : la passion de puissance, l'égoïsme, l'agressivité, la tentation de malveillance et parfois même la passion de détruire. Ici encore, point de limites, point de logique, et un mélange trouble qui peut prendre chez l'homme de désastreuses dimensions, désastreuses pour la communauté.

On ne peut terminer cette brève incursion dans l'univers des passions humaines sans parler de leur prix. Bien davantage que le patient travail de la raison, elles colorent notre vie des émotions qui lui donnent sa saveur, fortifient notre appétit de vivre, effacent la mort, offrent enfin à l'hom-

me cette idée de non-fini que la raison lui refuse. Qu'importe alors si elles violent parfois les frontières logiques de notre droit à la connaissance ? La nostalgie de l'absolu est respectable, comme est respectable tout ce qui est inspiration humaine. Mais cette respectabilité requiert une condition préalable : il s'agit de ne pas mélanger les genres, d'annoncer clairement la vraie couleur du jeu, de ne pas mettre le masque de la logique sur le visage de la passion. La farce commence si l'on prétend être encore dans la cage de la connaissance factuelle alors qu'on s'en est évadé.

Jean HAMBURGER

La Raison et la Passion

Edition du Seuil, septembre 1984, pp. 136-138

QUESTIONS

- 1 - Résumez ce texte en 120 mots, avec une marge de tolérance de 10 %.
Indiquez le nombre de mots à la fin du résumé.
- 2 - Expliquez :
 - amoralité
 - ne pas mettre le masque de la logique sur le visage de la passion
- 3 - Expliquez et commentez en vous appuyant sur des exemples précis : «Notre rêve de justice n'est pas bridé en nous, même si la réalité de chaque jour nous chuchote que c'est un rêve impossible».

BAREME

Question 1	8 points
Question 2	2 points
Question 3	10 points

ANGLAIS

Durée : 2 heures

Coef. : 2

A Realistic View on Biotechnology.

Biotechnology is a cooperative effort between the bio-sciences and the engineering disciplines to achieve technological applications. Over its long historical development biotechnology has diversified into a large area of industrial and environmental applications. This was made possible by the gradual evolution of biological sciences and technologies over the centuries from largely empirical activities to more quantitative disciplines. Increased understanding has progressively led to better levels of control.

Recent discoveries are leading to a broader biotechnology with very wide implications, particularly for agriculture and medicine.

The public perception of biotechnology is nowadays highly influenced by widespread early publicity of successes in research based on new and elegant genetic methods. This had led to overoptimism that biotechnology is a panacea for many of the world's problems and to a wrong identification of biotechnology with genetic engineering. On the other hand, the hypothetical risks of applied genetics have led to exaggerated fears in the minds of some members of the public, though public apprehension appears to be at a lower level now than it was in the late seventies.

The dichotomy between optimism and fear has characterised many technological innovations in the past. The new biotechnologies are no exception.

How should we view a biotechnologist today ? Should he be a generalist with a modest knowledge of a large number of disciplines ? Not at all ! He should, just like a chemical technologist, be a trained scientist in one of the basic sciences of biotechnology who also has a sound knowledge of some other disciplines. This will bring him to bear real specialist knowledge, to communicate with scientists from disciplines other than his own and, as he gains experience, to manage applied research projects aimed at practical and economic results

Such a concept of "Biotechnology" which emerged in the fermentation industry during the seventies and early eighties is now reflected in university courses and scientific organisations such as the European Federation of Biotechnology.

Nowadays senior biotechnologists in industry are mostly chemists, microbiologists or process engineers experienced in multidisciplinary teamwork. Postgraduate biotechnology courses have increasingly been developed for biologists, bio-chemists and engineers making a start in biotechnology.

E.H. Houwink, European Federation of Biotechnology.

Sept; 84

QUESTIONS

1. Translate from : "The dichotomy between optimism and fear ..."
to the end of the text.
2. Should biotechnology be considered as a source of fear or as a source of hope ? (Justify your opinion.)
3. How do you personally view your future work as a biotechnician ?

EPREUVE PROFESSIONNELLE DE SYNTHÈSE

A - ETUDE DE PROJET

Durée : 4 heures

Coef. : 4

Remarques préliminaires :

- 1 - L'usage d'un dictionnaire "Anglais-Français" est autorisé.
- 2 - La lecture préalable de l'ensemble des documents n'est pas nécessaire avant d'aborder le sujet. Des précisions, quant à leur utilisation, sont fournies pour chaque question.

PRODUCTION INDUSTRIELLE DE TRYPTOPHANE

- 1 - A l'aide du document 1 fourni, dégager l'intérêt de la production industrielle de L-tryptophane (L-Trp) et présenter sous forme d'un tableau les divers procédés de production envisagée en mettant en évidence les avantages et inconvénients de chacun. (20 points).
- 2 - Parmi ces procédés, on choisit d'étudier le procédé de bioconversion utilisant la tryptophanase. Les documents fournis envisagent l'obtention de l'activité tryptophanase, (documents 1 et 2), la bioconversion (document 3) et la séparation du L-tryptophane (document 4).

2.1. Obtention de l'activité tryptophanase et milieu de culture. (10 points).

A l'aide des diverses données fournies dans les documents 1 et 2 ci-joints, choisir parmi les milieux de culture (n° 1 à 9 du document 5) celui (ou ceux) qui paraît (paraissent) le(s) plus approprié(s) à la production de tryptophanase par *Escherichia coli*. Justifier ce(s) choix.

2.2. Bioconversion (échelle laboratoire). (25 points).

2.2.1. Inclusion de *Escherichia coli* dans un gel de polyacrylamide

Indiquer quelle est l'influence de :

- la concentration en monomère (acrylamide),
- la concentration en agent réticulant (bisacrylamide),
- la concentration en cellules incluses,

sur la synthèse du L-tryptophane

2.2.2. Bioconversion

2.2.2.1. Déterminer l'influence :

- . du pH,
- . de la température,
- . de la concentration en phosphate de pyridoxal,
- . de la concentration en pyruvate,
- . de la concentration en indole,

sur la production du L-tryptophane.

2.2.2.2. En déduire les conditions optimales de réaction.

Conclure sur la rentabilité d'un tel processus.

Quelles améliorations proposer pour l'améliorer ?

2.3. Séparation du L-tryptophane (échelle industrielle) (document 4). (25 points).

Déterminer les caractéristiques de la solubilité du complexe L-tryptophane - inosine et les conditions optimales de pH, température.

Préciser l'effet des concentrations résiduelles en tryptophane et inosine, pH et température sur le rendement de précipitation.

Le précipité de L-tryptophane - Inosine est filtré et remis en solution à pH acide. Par traitement sur résine échangeuse d'ions, on peut récupérer le L-tryptophane.

Documents fournis :

- Document 1 : Etude d'un procédé de production en continu de L-tryptophane (pages 5 à 19)
Thèse Université Technologique de Compiègne
Commissariat à l'Energie atomique soutenue par Bernard Besnalnou
le 25 janvier 1985 : Interêt, méthodes de production.
- Document 2 : Etude d'un procédé de production en continu de L-tryptophane (pages 1 et 2)
Thèse Université Technologique de Compiègne
Commissariat à l'energie atomique soutenue par Bernard Besnalnou
le 25 janvier 1985 : Obtention d'activité tryptophanase.
- Document 3 : P. Decottignies - Le Marchal, R. Galderon - Seguin,
J.P. Vandecasteele, R. Azerad (pages 33 à 44)
Synthesis of L-tryptophan by Immobilized Escherichia coli Cells European.
J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 7, 33-44 (1979) Article adapté
- Document 4 : Etude d'un procédé de production en continu de L-tryptophane (pages 123 à 135)
Thèse Université Technologique de Compiègne
Commissariat à l'Energie atomique soutenue par Bernard Besnalnou
le 25 janvier 1985 : Séparation du tryptophane
- Document 5 : Milieux de culture (4 pages).

CHAPITRE I

*LE L-TRYPTOPHANE
INTERET - METHODES DE PRODUCTION*

I - ROLES METABOLIQUES :

Le L-Tryptophane* ou acide amino 3 indole propionique (figure 1) est un acide aminé essentiel. Il n'est pas synthétisé par les organismes supérieurs et sa présence dans leur alimentation est donc indispensable. Il apparaît comme étant un des acides aminés les plus limitants lors d'une diète [MAJUMDAR 1982]. A ce titre, il est classé au troisième rang des acides aminés essentiels derrière la L-lysine et la DL-méthionine [TERUI 1962].

Outre ce caractère essentiel, le Tryptophane est l'acide aminé qui présente la plus grande diversité dans ses fonctions métaboliques [MAJUMDAR 1982 - WURFMAN 1982 - BANG 1983 a] :

- c'est un précurseur de la sérotonine (neuromédiateur). Il régit ainsi des états physiologiques tels que le sommeil, l'humeur, l'appétit,
- il stimule la sécrétion d'insuline et celle de l'hormone de croissance,
- il affecte la synthèse protéique dans de nombreux tissus et plus particulièrement dans le foie,
- son métabolisme permet de satisfaire les besoins nutritionnels en acide nicotinique (niacine).

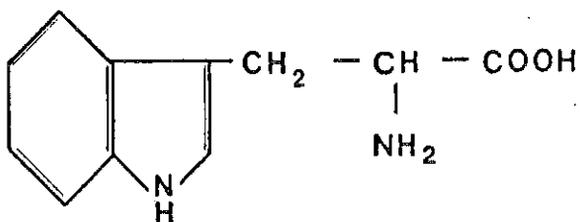
Il est envisagé de l'utiliser en médecine pour traiter l'hypertension, certaines formes de dépression, la maladie de Parkinson, l'alcoolisme, les troubles de la mémoire chez les personnes âgées et plus généralement comme reconstituant et fortifiant.

2 - TENEUR DANS DIFFERENTES MATIERES PREMIERES - CONSEQUENCES POUR LE MARCHE DE L'ALIMENTATION ANIMALE :

L'importance et la diversité de ses fonctions métaboliques font du Tryptophane un des éléments à prendre en considération dans la formulation des aliments pour animaux.

Le tableau 2 présente les teneurs en Tryptophane de différentes matières premières végétales. Les teneurs recommandées sont fonction du type d'animal, de son stade de croissance, de la disponibilité du Tryptophane dans les matières premières utilisées. En ce qui concerne l'alimentation des porcs cette recommandation se situe à un niveau de 0,16 %.

* Le Tryptophane existe également sous forme dextrogyre. D'un point de vue biologique, seule la forme lévogyre présente un intérêt. Dans la suite du texte, la dénomination "Tryptophane" correspondra à la forme lévogyre.



POIDS MOLECULAIRE :	204,23
pK (COOH) :	2,38
pK (NH ₂) :	9,39
POINT ISOELECTRIQUE :	5,89

FIGURE 1 : Le L-TRYPTOPHANE

Dans le tableau 3, nous avons calculé l'apport en Tryptophane de différents tourteaux pour une ration protéique de 12 %.

Seul le tourteau de soja permettrait de satisfaire les besoins nutritionnels en Tryptophane.

En Europe, la substitution, dans la composition des aliments, du tourteau de soja par des tourteaux de productions locales (pois, fèverolles, maïs) nécessiterait donc une supplémentation par du Tryptophane (et également par de la L-Thréonine, l'ajout de L-lysine et de DL-méthionine étant déjà fréquemment utilisé).

Une expérience effectuée par la Société SANDERS, productrice d'aliments pour animaux [PALISSE-ROUSSEL 1984], pour le compte de la Société MITSUI TOATSU, situe bien l'intérêt d'une telle supplémentation. Cette société a testé le remplacement du soja par du pois d'hiver sur 4 lots de 28 porcins chacun. Le lot témoin avait un régime à base de soja, les trois autres à base de pois, sans apport de Tryptophane pour l'un (teneur en Tryptophane 0,12 %), supplémentés à 0,15 % et à 0,18 % pour les 2 autres. Il est apparu que le remplacement du soja par du pois, sans supplémentation en Tryptophane, se traduisait par une baisse de la consommation du lot de porcins (rôle du Tryptophane sur l'appétit) conduisant à une réduction sensible des performances zootechniques des animaux. L'ajout de 0,03 % de Tryptophane pour atteindre une teneur de 0,15 % permet le rattrapage par rapport au témoin soja et à 0,18 % on a même observé des résultats très légèrement supérieurs.

3 - MARCHE :

Les données précédentes situent bien les potentialités du marché du Tryptophane. Si l'on se base sur l'expérience effectuée par SANDERS, où le remplacement du tourteau de soja par du pois nécessite l'ajout de 0,03 % de Tryptophane, un rapide calcul montre, par exemple, que les 26,5 millions de tonnes d'aliments pour porcs produites par année par la CEE conduiraient à une demande de 8000 tonnes/an en Tryptophane. On peut signaler que le Tryptophane pourrait également intéresser l'alimentation des volailles (5,7 millions de tonnes en France en 1982).

Le marché du Tryptophane (et plus généralement celui des acides aminés) semble donc très dépendant de l'utilisation ou de la non utilisation du tourteau de soja dans la composition des aliments pour animaux. On peut rappeler qu'en 1981 la France a acheté à l'étranger (USA, pays d'Amérique du Sud) 2,5 millions de tonnes de soja représentant une sortie de devises de 5 milliards de francs.

CEREALES	%	TUBERCULES	%	TOURTEAUX	%
Avoine.....	0,15	Manioc.....	0,03	Soja *	0,69
Blé tendre.....	0,12	Pomme de terre...	0,07	Tournesol **	0,45
Blé dur.....	0,16	Betterave (pulpe)...	0,09	Colza.....	0,45
Maïs.....	0,09	Tapioca.....	0,03	Féverolle.....	0,23
Orge.....	0,12			Pois fourrager.....	0,23
Riz.....	0,10				
Seigle.....	0,11				
Sorgho.....	0,12				

* 45 % de matière protéique - ** 37 % de matière protéique

**TABLEAU 2 : TENEUR EN TRYPTOPHANE DE DIFFERENTES MATIERES
PREMIERES VEGETALES - (D'après tables A E C)**

DIFFERENTS TOURTEAUX	%
Soja.....	0,18
Arachide.....	0,09
Colza.....	0,15
Coprah.....	0,09
Coton.....	0,13
Féverolle.....	0,11
Maïs.....	0,06
Lin.....	0,15
Palmiste.....	0,06
Pois.....	0,11
Tournesol.....	0,15

**TABLEAU 3 : APPORT EN TRYPTOPHANE DE DIFFERENTS TOURTEAUX POUR
UNE RATION PROTEIQUE DE 12 % - (Teneur recommandée 0,16 %)**

On sait également que le colza, le tournesol, le pois, le lupin..., qui sont des productions européennes pourraient être des substituts du soja. La mise sur le marché de Tryptophane à un prix compétitif serait un atout supplémentaire dans cette bataille contre le soja.

Une enquête de la société américaine ELDIB-ENGINEERING and RESEARCH, parue dans le Chemical Marketing Reporter (numéro du 25 juillet 1983), prévoit un marché du Tryptophane de l'ordre de 11000 tonnes/an en 1990. Cette évaluation est obtenue en considérant que l'augmentation de la consommation de L-lysine s'accompagnera d'une demande parallèle en Tryptophane avec un coefficient de proportion de 1/5 à 1/6. On peut rappeler qu'aux USA, par exemple, la consommation de L-lysine est passée de 6800 tonnes/an en 1978, à 13200 tonnes/an en 1982 et que l'on estime qu'elle doublera à nouveau d'ici à 1987.

Signalons, de plus, que d'autres marchés seraient susceptibles de s'ouvrir pour des dérivés du Tryptophane présentant des activités hormonales du type auxinique (activation et régulation de productions végétales). Cette orientation devrait faire l'objet de recherches complémentaires dans la mesure où un Tryptophane à bas prix pourrait être mis sur le marché et devenir ainsi un nouveau produit intermédiaire pour la synthèse de molécules à plus haute valeur ajoutée (E. SEGARD, communication personnelle).

En raison de son coût très élevé (de 500 à 800 F/kg), les utilisations actuelles du Tryptophane se limitent à l'alimentation diététique et à la pharmacie (alimentation parentérale). Son marché reste donc confidentiel. Il a été estimé à 200 T/an en 1979 [METIVIER 1984] et il serait de 500 T/an en 1982.

4 - METHODES DE PRODUCTION :

4.1. - Méthodes chimiques

4.1.1. - Hydrolyse acide des protéines

Les acides aminés existent à l'état naturel dans les tissus vivants, soit libres, soit sous forme polymérisée en peptides et protéines. On pouvait donc envisager, comme pour d'autres acides aminés, d'obtenir le Tryptophane par hydrolyse acide des molécules protéiques. Malheureusement, les conditions les plus courantes d'hydrolyse provoquent la décomposition du Tryptophane. OHTA (1981) a notamment montré que ce traitement conduisait à la transformation du Tryptophane en oxy-indolyalalanine et dioxyindolyalalanine.

4.1.2. - Synthèse chimique

Plusieurs procédés ont été proposés pour la synthèse chimique du Tryptophane.

Signalons, en exemple, la synthèse de SHONO (1983) à partir de dérivés d'amines cycliques (figure 2). L'obtention de Tryptophane sous forme lévogyre (seule forme intéressante d'un point de vue biologique) nécessite des étapes supplémentaires d'extraction à partir du mélange racémique synthétisé. Pour éviter ces inconvénients, certains auteurs ont défini des procédés conduisant directement à la synthèse de Tryptophane lévogyre. MASUMI (1982), par exemple, obtient le L-Tryptophane à partir d'acide L-glutamique, mais avec un rendement n'excédant pas 26 % (figure 2). En raison de ces faibles rendements et des coûts des matières utilisées, il semble que ces synthèses ne puissent répondre aux exigences du marché et beaucoup pensent que l'on doit leur préférer les méthodes biologiques.

4.2. - Méthodes biologiques

Si le Tryptophane n'est pas synthétisé par les organismes supérieurs, il l'est en revanche par la plupart des microorganismes. Son métabolisme fait intervenir la voie dite "shikimique" avec comme principaux précurseurs : l'acide anthranilique, l'indole et la L-sérine (figure 3).

De nombreux auteurs ont cherché à exploiter cette possibilité de synthèse. On peut classer les divers procédés proposés en trois catégories :

- la fermentation directe à partir d'un substrat carboné,
- la fermentation à partir d'un précurseur du Tryptophane,
- la bioconversion.

4.2.1. - Fermentations directes

Ces méthodes qui mettent en oeuvre l'intégralité de la voie métabolique de synthèse du Tryptophane ont l'avantage de faire appel à des milieux de culture ne présentant aucune particularité. Mais les très faibles productivités obtenues, du fait des nombreuses régulations qui régissent la voie shikimique (une dizaine d'étapes), ont conduit les auteurs à rechercher des mutants pour lesquels les mécanismes régulateurs étaient moindres. [SHIIO 1977 - HAGINO 1975 - NIHONNOGEI KAGAKUKAI 1971 - NAKAYAMA 1976 - AIBA 1980].

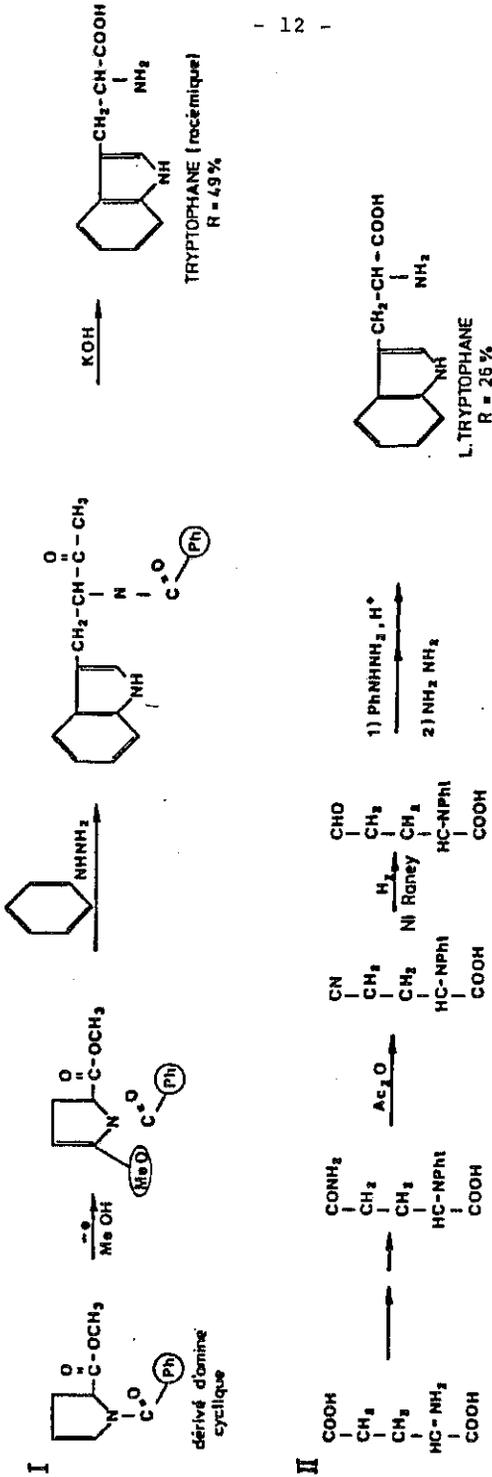


FIGURE 2 : SYNTHESES CHIMIQUES DU L-TRYPTOPHANE

I : SHONO 1983

II : MASUMI 1982

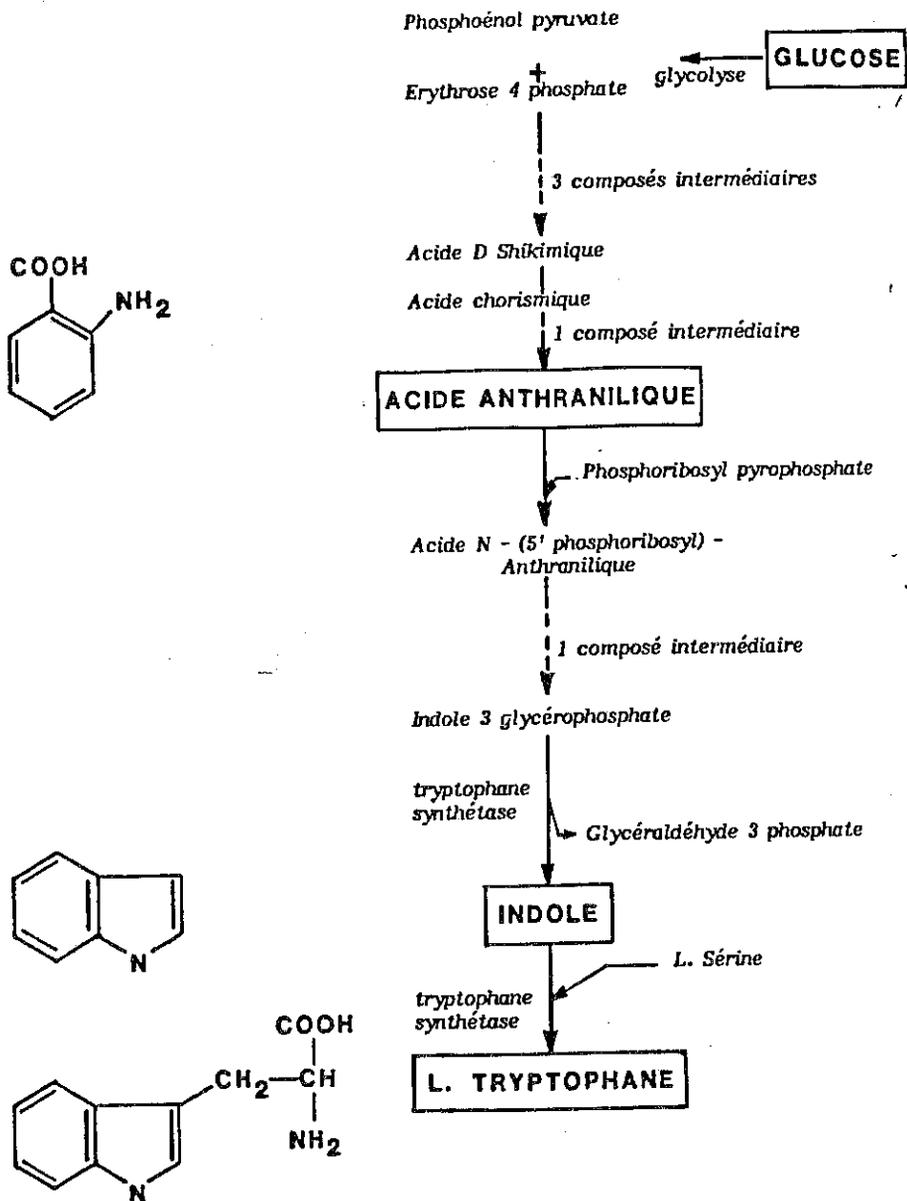


FIGURE 3 : VOIE "SHIKIMIQUE" DE BIOSYNTHESE DU L. TRYPTOPHANE CHEZ LES MICROORGANISMES.

C'est ainsi que la société KYOWA HAKKO [Brevet n° 2189510] a mis au point un mutant de *Corynebacterium glutamicum* (Trp-10-ATCC 21851) permettant d'obtenir, en 72 heures, 16,8 g/l de Tryptophane à partir de glucose 150 g/l.

Ce mutant est :

- phénylalanine et tyrosine dépendant,
- 4 méthyl tryptophane, 6 fluoro tryptophane, 4 amino phénylalanine, 4 fluorophénylalanine, hydroxamate de tyrosine et hydroxamate de phénylalanine résistant.

4.2.2. - Fermentations à partir de précurseurs

Dans l'optique de réduire les trop nombreuses rétro-inhibitions de la voie shikimique et d'augmenter les productivités en Tryptophane, certains auteurs ont pensé à introduire dans le milieu de culture des précurseurs de l'acide aminé. Il s'agit essentiellement de l'acide anthranilique et de l'indole. Mais là encore les effets inhibiteurs ont conduit les auteurs à rechercher des mutants.

On peut citer AKASHIBA [Brevet n° 2.483.947] qui a défini un mutant de *Bacillus subtilis* (5 fluorotryptophane et 8 azaguanine résistant) permettant de produire du Tryptophane 15,6 g/l, en 24 heures, à partir de glucose 100 g/l et d'acide anthranilique 10,5 g/l.

THIEMANN [Brevet n° 3700558] utilise également un mutant de *Bacillus subtilis* résistant à des antimétabolites du Tryptophane (ATCC 21-336). Il obtient du Tryptophane 10,4 g/l, en 96 heures, à partir de glucose 70 g/l et d'indole 6 g/l. On peut noter qu'un des inconvénients de ce procédé réside dans les effets inhibiteurs de croissance de l'acide anthranilique et de l'indole (ces composés doivent être ajoutés au milieu de culture en faible quantité et de manière continue).

4.2.3. - Bioconversions en batch

La bioconversion consiste en la mise en oeuvre d'une activité enzymatique déjà existante. La synthèse des enzymes concernées se situe en amont de cette mise en oeuvre et en est indépendante. Les deux systèmes enzymatiques les plus connus permettant la production de Tryptophane s'orientent sur des mécanismes de condensation sur le noyau d'indole,

- de la L-sérine pour la Tryptophane synthétase,
- de l'acide pyruvique et de l'ammoniac pour la tryptophanase.

4.2.3.1. - Tryptophane synthétase

Diverses publications décrivent des procédés de bioconversion d'indole et de L-sérine par l'action de la Tryptophane synthétase, dernière enzyme de la voie shikimique [Brevets n° 1207437, 2263302 - BANG 1983a].

La synthèse de cette enzyme subit des mécanismes de régulation et notamment une répression par le Tryptophane. L'enzyme n'est de ce fait que peu abondante chez la plupart des microorganismes [DECOTTIGNIES - LE MARECHAL 1977]. Les divers procédés proposés font donc appel à des mutants auxotrophes pour le Tryptophane chez lesquels la synthèse de la Tryptophane synthétase n'est plus inhibée.

BANG (1983a) par exemple, observe une production de 142 g/l (cristaux) de Tryptophane en incubant, pendant 60 heures, 50 g/l de cellules d'*Escherichia coli* B10 dans un milieu réactionnel contenant de la L-sérine 78 g/l et de l'indole 87 g/l. Signalons également les travaux de ANDERSON (Biofutur, février 83) qui est parvenu à introduire chez *E. coli* des plasmides portant l'opéron Tryptophane synthétase. La souche ainsi modifiée synthétiserait de fortes quantités d'enzyme (jusqu'à 20 % des protéines cellulaires). La mise au point de procédés mettant en oeuvre cette souche serait à l'étude.

4.2.3.2. - Tryptophanase

Chez un certain nombre de microorganismes, la régulation de la concentration intracellulaire en Tryptophane, fait appel à une seconde enzyme, la tryptophanase, dont la fonction est de dégrader le Tryptophane en indole, pyruvate et ammoniac.

Les travaux de WOOD (1947) mais surtout ceux de NEWTON et SNELL (1964) ont montré que la tryptophanase, dans des conditions d'excès de pyruvate et d'ammoniac, pouvait à l'inverse, synthétiser le Tryptophane. La synthèse de cette enzyme ne subit pas les mêmes mécanismes régulateurs que celle de la Tryptophane synthétase. En effet, dans certaines conditions de culture, de nombreux microorganismes sauvages sont capables de synthétiser des quantités importantes de tryptophanase [GARTNER 1963]. Le recours à des souches mutées n'est donc pas indispensable.

Cette nouvelle voie de production du Tryptophane a dès lors fait l'objet de diverses expérimentations [NAKAZAWA 1972 - Brevets n°s 2119018, 2256243, 4360594].

La Société AJINONOTO [Brevet 2119018], a par exemple obtenu 56 g/l de Tryptophane en incubant pendant 20 heures des cellules d'*Aerobacter aerogenes* (récoltées à partir de 1 litre de bouillon de culture) dans un mélange réactionnel contenant de l'indole 30 g/l, du pyruvate de sodium 40 g/l et de l'acétate d'ammonium 40 g/l.

4.2.4. - Bioconversions avec activité enzymatique immobilisée

Les avantages de l'immobilisation sur support d'une activité enzymatique sont maintenant bien connus. Nous les rappellerons un peu plus loin. De tels modèles d'immobilisation ont été proposés pour la production de Tryptophane.

4.2.4.1. - Immobilisation de l'activité Tryptophane synthétase

Plusieurs auteurs ont travaillé sur l'immobilisation de l'activité Tryptophane synthétase.

Citons DINELLI [Brevet n° 2.133.923] qui a immobilisé l'enzyme purifiée sur fibres d'acétate de cellulose. Il a obtenu une productivité de 78 g de Tryptophane par heure et pour 180 g d'enzyme immobilisée avec une stabilité de six mois.

D'autres auteurs ont choisi d'immobiliser les microorganismes producteurs de la Tryptophane synthétase sans passer par l'étape d'extraction et de purification de l'enzyme. C'est le cas par exemple de BANG (1983 b) qui en immobilisant des cellules d'*Escherichia coli* B10 dans un gel de polyacrylamide obtient 0,07 g de Tryptophane par heure et pour 5 g de cellules (stabilité 80 % après 50 jours). LANGRENE (1984) a testé l'immobilisation d'*E. coli* (ATCC 9637) sur différents supports (polyacrylamide, sérum-albumine de boeuf, alginate et K-carraghenane. Elle a sélectionné le gel de K-carraghenane qui permet une productivité de 0,69 g de Tryptophane par jour et pour 150 mg de cellules mais avec une perte totale d'activité après 7 jours.

4.2.4.2. - Immobilisation de l'activité tryptophanase

Peu de modèles ont été proposés pour l'immobilisation de cette activité [IKEDA 1973 - FUKUI 1975]. Citons celui de DECOTTIGNIES LE MARECHAL (1979), qui a immobilisé des cellules d'*E coli* K12 dans un gel de polyacrylamide. Elle a obtenu 0,1 g de Tryptophane par heure et par gramme de cellules mais avec une perte d'activité de 60 % après 10 jours de fonctionnement en continu avec recyclage des réactifs.

4.2.5. - Récapitulatif

Le Tableau 4 récapitule les différentes méthodes de production de Tryptophane par voie biologique. Il nous a paru intéressant d'y faire figurer, quand cela était possible, les productivités exprimées en grammes de Tryptophane par heure et par gramme de cellules et en grammes de Tryptophane par heure et par litre de réacteur, que nous avons calculées à partir des données fournies.

4.2.6. - Remarque : Isolement du Tryptophane

La plupart des publications décrites ci-dessus évoque une séparation du Tryptophane par des procédés classiques tels que l'adsorption sur charbon actif ou l'échange d'ions. Cependant peu de résultats expérimentaux quantitatifs sont fournis. Il semble en fait que cette étape pose un certain nombre de problèmes.

Dans le cas de procédés par fermentation, le Tryptophane est produit dans un milieu "pollué" par les microorganismes et par un certain nombre de métabolites (et notamment des acides aminés tels que l'alanine et la valine) [Brevet n° 2133923]. Le traitement de ces milieux complexes sur charbon actif ou sur résine échangeuse d'ions ne permet pas une extraction spécifique directe du Tryptophane. La Société KYOWA HAKKO [Brevet n° 2189510] signale d'ailleurs qu'elle n'obtient des cristaux purs de Tryptophane qu'après des traitements successifs sur résine échangeuse d'ions et sur charbon actif. Le rendement d'extraction n'est plus alors que de l'ordre de 50 %.

Dans le cas de procédés par bioconversion, les difficultés sont moins importantes mais certains points restent mal définis. Peu de données sont fournies sur les rendements de séparation obtenus et sur le niveau de pureté du Tryptophane cristallisé. Dinelli [Brevet n° 2.133.923] signale par exemple les problèmes posés par l'adsorption parallèle du PLP (cofacteur de la tryptophanase et de la Tryptophane synthétase) lors d'un traitement sur charbon actif.

D'autres voies de séparation ont été proposées. Il s'agit par exemple de la cristallisation directe du Tryptophane par concentration du milieu [Brevet n° 2.256.243] et par précipitation avec un tiers composé (l'inosine) [Brevet 2.119.-018]. Mais là encore peu d'informations sont fournies. Une étude particulière semble donc nécessaire.

PROCEDE	Trp (g/l)	Trp(grammes) heures.l réacteur	Trp(grammes) heures-g cellules	DUREE	REFERENCE
Fermentation <i>C. glutamicum</i> Glucose 150 g/l	16,8	0,23	-	72 h	Brevet 2.189.510.
Fermentation Précurseur <i>B. subtilis</i> Glucose 100 g/l ac. anthranilique 10,5 g/l	15,6	0,55	-	24 h	Brevet 2.463.947
Fermentation Précurseur <i>B. subtilis</i> Glucose 70 g/l Indole 6 g/l	10,4	0,11	-	96 h	Brevet 3.700.556
Bioconversion Batch <i>E. coli</i> Tryptophane synthétase Indole 87 g/l	142	2,34	0,047	60 h	[BANG 1983 a]
Bioconversion Batch <i>A. aerogius</i> Tryptophanase Indole 30 g/l	56	2,8	-	20 h	Brevet 2.119.016
Bioconversion Immob. <i>Tryptophanase synthétase</i> Indole 1,7 g/l	2,6	4,26	0,43 [*] (par g d'enz.)	6 mois (100 %)	Brevet 2.133.923
Bioconversion Immob. <i>E. coli</i> Tryptophane synthétase Indole 1,3 g/l	2,3	0,64	0,14	50 jours (80 %)	[Bang 1983 b]
Bioconversion Immob. <i>E. coli</i> Tryptophanase Indole 1,2 g/l	0,9	2,5	0,1	10 jours (40 %)	[DECOTTIGNIES 1979]

* 0,002 g Trp
h⁻¹g⁻¹cellules

TABLEAU 4 : RECAPITULATIFS DES DIFFERENTS PROCEDES DE PRODUCTION DE L TRYPTOPHANE PAR VOIE BIOLOGIQUE

Les productivités exprimées en g Trp/l.l. réacteur et en g Trp/h-gcellules ont été extrapolées.

5 - CONCLUSION

Le Tryptophane est un acide aminé indispensable dont les rôles métaboliques sont très importants.

Son obtention à un prix compétitif pourrait lui ouvrir le marché de l'alimentation animale. Son prix d'intérêt sur ce marché fait actuellement l'objet de nombreuses controverses et il semble que des études rationnelles restent à réaliser. Il est établi cependant que les coûts de production du Tryptophane doivent conduire à un prix de vente nettement inférieur aux valeurs actuellement proposées (de 500 à 800 F/kg).

La littérature fournit de nombreux exemples de voies de synthèse du Tryptophane (synthèses chimiques, fermentations, bioconversions). Il semble cependant qu'en l'état actuel, leur mise en oeuvre dans des procédés de production ne permette pas de répondre aux exigences du marché.

2.1. - Souche

2.1.1. - Définition La souche que nous avons utilisée est une entérobactérie, *Escherichia coli* K12, Hfr 3000, auxotrophe pour la vitamine B1 (source Institut Pasteur). Cette souche se caractérise par sa capacité de synthèse d'une quantité élevée de tryptophanase. Elle doit cette propriété à la localisation de l'opéron Tryptophane, situé très près du point d'initiation de la réplication de l'ADN [TAYLOR 1972 - CARO 1972].

3 - PRODUCTION D'UNE BIOMASSE RICHE EN ACTIVITE TRYPTOPHANASE

3.1. - Répression catabolique

Le mécanisme de cette régulation a été étudié par de nombreux auteurs [BOYD 1955 - COHN 1953 - NEIDHARDT 1956 - NAKADA 1964] notamment sur le modèle β -galactosidase. BEGGS (1965), BOTSFORD (1971) et DEELEY (1982) se sont plus particulièrement intéressés à la synthèse de la tryptophanase.

3.1.1. - Mécanisme

La chaîne de synthèse protéique comporte dans une première étape la transcription des gènes de structure de l'ADN en ARN_m par l'action de la RNA polymérase (Figure 8). Pour agir, cette enzyme doit reconnaître un site de fixation localisé en amont des gènes de structure, au niveau du gène promoteur. L'affinité de la RNA polymérase pour ce site est favorisée par la fixation au niveau du gène promoteur d'un complexe AMP_C-CAP (3',5', Adenosine Monophosphate Cyclique - Catabolite gène Activator Protein).

Le catabolisme de substrats rapidement assimilables du type glucose conduit à l'excrétion de l'AMP_C et donc à une réduction de sa concentration intracellulaire. Il n'y a plus alors formation du complexe AMP_C-CAP avec en conséquence inhibition de l'action de la RNA polymérase.

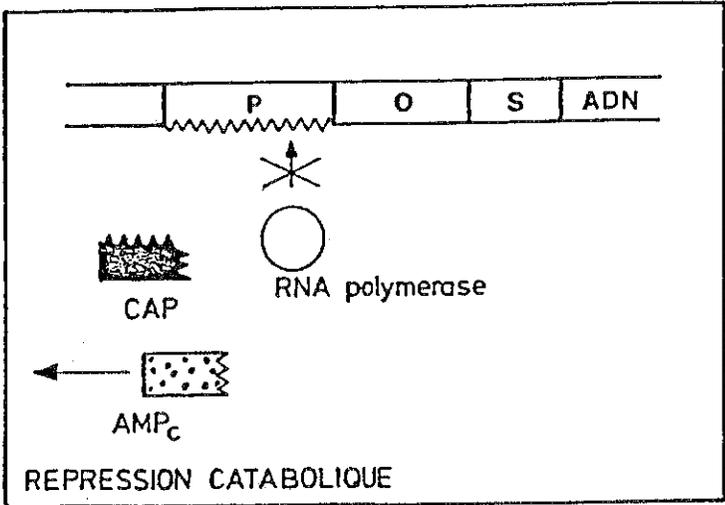
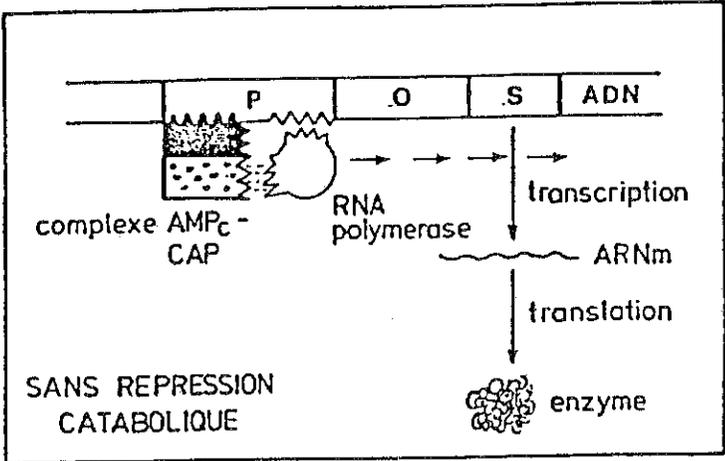


FIGURE 8 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU MECANISME DE LA REPRESSION CATABOLIQUE

European J. Appl. Microbiol.
Biotechnol. 7, 33-44 (1979)

European Applied
Journal of Microbiology and
Biotechnology

© by Springer-Verlag · 1979

Synthesis of L-tryptophan by Immobilized *Escherichia coli* Cells

P. Decottignies-Le Maréchal¹, R. Calderón-Seguín^{1*}, J.P. Vandecasteele², R. Azerad¹

¹Institut de Biochimie, Université Paris XI, F-91405 Orsay, France

²Institut Français du Pétrole, F-92500 Rueil-Malmaison, France

Summary. Enzymatic production of L-tryptophan has been studied in a system containing *Escherichia coli* cells (induced for tryptophanase) entrapped in a polyacrylamide gel, indole and excess pyruvate and ammonia. The influence of pH, substrate concentration and temperature on L-tryptophan production, in batch and flow reactor conditions, was investigated. In flow reactor conditions, inhibition of the reaction by indole resulted in a multi steady-state pattern characteristic of substrate inhibited reactions. Any increase in flow rate at indole concentrations higher than 17 mM resulted in a dramatic decrease in the conversion rate of indole to tryptophan.

A device for the practical production of L-tryptophan, which involves feeding a limiting concentration of indole to a reactor, adsorption of the synthesized tryptophan and recycling of excess pyruvate and ammonium ions was tested.

Introduction

L-tryptophan, an essential amino acid, is generally deficient in cereal proteins. No satisfactory large-scale process has been described for L-tryptophan production. Watanabe and Snell (1972) have shown that tryptophanase, a widely distributed microbial inducible enzyme, is able to synthesize L-tryptophan in the presence of indole, excess ammonia and pyruvate. Nakazawa et al. (1972) have shown that *Proteus rettgeri* cells, previously induced for tryptophanase, are also able to utilize indole, pyruvate and ammonia to synthesize substantial amounts of L-tryptophan.

The potential of using an immobilized system in the production of L-tryptophan was illustrated in the similar cases of the synthesis of L-aspartase (Chibata et al., 1974; Tosa et al., 1974) and L-malate (Yamamoto et al., 1976), where the use of immobilized whole cells was shown to be advantageous over the use of an immobilized enzyme.

*Present address: Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Peru

In this paper, results concerning the entrapment of *Escherichia coli* cells having tryptophanase activity, the enzymatic properties of entrapped cells, and the production of L-tryptophan in a flow reactor containing immobilized *Escherichia coli* cells are reported.

Materials and Methods

Materials. Acrylamide monomer and N,N'-methylene-bis-acrylamide (BIS) were purchased from Eastman Kodak, fluorescamine from Hoffmann-La Roche, Sodium pyruvate was obtained from Société d'Etudes et Applications Chimiques, France.

Culture Conditions. *Escherichia coli* K₁₂ were cultured under aerobic conditions at 37°C in a medium (pH 7.2) containing 10 g pancreatic peptone (OSI, France), 5 g yeast extract, 5 g NaCl, 10 g Tween 80, and 1 g L-tryptophan per liter. The cells were harvested after 7 h by centrifugation, washed with cold 0.1 M potassium phosphate (pH 7.8) containing 5 mM mercaptoethanol, 2 mM EDTA and 50 µM pyridoxal phosphate (buffer A), and stored at 0°C.

Bacterial suspensions (1 g fresh weight/2 ml of buffer A) were ultrasonically treated for 10 min to obtain crude extracts. One mM dithiothreitol was added after sonication.

Preparation of Gel Entrapped *Escherichia coli* Cells. In 4 ml of 40 mM potassium phosphate pH 8.0 (buffer B) 1.8 g of freshly prepared cells were suspended. To the cell suspension were added acrylamide monomer (0.5 g), N, N'-methylene-bisacrylamide (40 mg), 5% β-dimethylaminopropionitrile (0.5 ml), 2.5% potassium persulfate (0.5 ml) and ordinary glass-beads (1 mm diameter). The mixture was left at 37°C for 15 min, after which the polymerized mixture was separated from beads by gentle dilaceration then rapidly washed with buffer B on a nylon cloth. The particle size was about 1 to 3 mm.

In some experiments, crude extract was immobilized using exactly the same procedure.

Assay of Tryptophanase Activity. Unless otherwise noted L-tryptophan was synthesized at 37°C in a 20 ml reaction mixture containing 30 mg of bacterial cells, or 100 mg of a polyacrylamide gel containing 30 mg of bacterial cells, 10 mmol of sodium pyruvate, 12 mmol of ammonium bicarbonate and 20 µmol of pyridoxal phosphate (PLP). The pH was adjusted to 9.0 by adding 3 M sodium carbonate. After 20 min at 37°C, the reaction was started by introducing 2 ml of a 0.1 M solution of indole in ethanol. The reaction was stopped after 1 or 2 h by cooling at 0°C and the cells removed by centrifugation or filtration. The L-tryptophan produced in the supernatant or the filtrate was measured spectrofluorimetrically after reacting with fluorescamine, following the procedure of Nakamura and Pisano (1976). In some cases, the residual indole was measured after extraction in toluene. To 1 ml of the solution in toluene were added 3.5 ml of a freshly prepared Ehrlich reagent (5 vol of paradimethylaminobenzaldehyde in 95% ethanol plus 12 vol of 5% H₂SO₄ in n-butanol). After 20 min at 37°C, the color intensity was read at 570 nm. Pyruvate was measured according to the method of Bücher et al. (1963).

Synthesis of L-tryptophan by Immobilized *Escherichia coli* Cells

35

Continuous Production of L-tryptophan. In some experiments, continuous production of L-tryptophan was studied at 37°C in a continuous stirred tank reactor, CSTR, (60 rpm) with a final volume of 20 ml obtained through continuous and separate additions of concentrated solutions of sodium pyruvate (0.5 M), ammonium bicarbonate (0.6 M) containing 1 mM PLP, and indole (8 to 18 mM) in ethanol (10%) in the presence of various amounts of immobilized cells (all final concentrations). The pH in the reactor was between 8.8 and 9.0. Ten milliliter fractions were collected at different flow rate, five to six reactor volumes were necessary to stabilize the new conversion metric measurement of L-tryptophan. After each change of indole concentration or flow rate, five to six reactor volumes were necessary to stabilize of the new conversion rate. As experiments were limited to 48 h periods, no significant correction accounting for the decrease of enzyme activity was necessary.

In some experiments, the same system was used, but the reactor effluent was percolated in a column containing a 1:2 mixture of diatomaceous earth (Celite) and activated charcoal (Norit) for adsorption of L-tryptophan and then continuously recycled to the reactor, after flowing through a stirred cell maintained at a definite temperature, containing solid indole dissolved to saturation (Fig. 1). It was found that an incubation medium with 10% ethanol contained 10 mM indole when saturated at 4-5°C. Any variation of the temperature of the saturation cell resulted in a definite variation of the concentration of indole fed to the reactor (30 mM at 37°C, 24 mM at 25°C). In these experiments, no sodium pyruvate or ammonium bicarbonate was added except when a change in the charcoal column was necessary; this corresponded to a change of approximately 90% of the total system volume. The pH of the reactor was continuously adjusted to 9.0-9.1 by adding small amounts of concentrated ammonia.

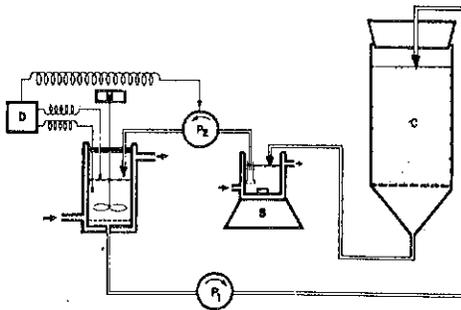


Fig. 1. Experimental device for tryptophan synthesis with recycling of excess reagents. The reaction vessel is equipped with a low-speed (60 rpm) motor-driven stirrer (M) and a liquid level sensor (D); P₁, P₂: circulation pumps; C: charcoal/celite column for tryptophan adsorption; S: magnetically stirred vessel for indole solubilization and pH readjustment

Results

Entrapment Into Polyacrylamide gel

Variations in the efficiency of tryptophan synthesis by entrapped cells were studied as a function of immobilization. Results reported in Table 1 show that the critical factor was the monomer concentration: activity decreased when the amount of acrylamide was increased. No influence of the reticulating agent (BIS) was found in the range 2.5-10%, but stability and mechanical properties of the gel deteriorated considerably when the BIS concentration was below 2.5%. Figure 2 shows that activity was linearly related to bacterial concentration in the gel up to 0.6 g/g. In this work

Table 1. Effect of acrylamide monomer and BIS concentrations on the synthesis of L-tryptophan by entrapped cells

BIS (mg)	Acrylamide (mg)	Acrylamide + BIS g of gel (%)	BIS Acrylamide + BIS (%)	L-Trip synthesized (μ mol/hour/ 100 mg of bacteria)
20	750	13	2.6	29
40	750	13	5.1	29
80	750	14	9.6	23
40	500	9	7.4	37
40	750	13	5.1	24
40	1000	17	3.8	12

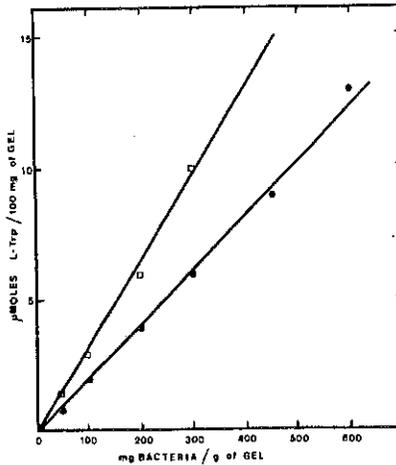


Fig. 2. Effect of the concentration of entrapped *Escherichia coli* cells on the synthesis of L-tryptophan. In standard conditions for 30 min (●—●) or 1 h (□—□) 100 mg of gel containing various amounts of bacteria were incubated

0.3 g/g was routinely used. As estimated by visual inspection, no significant loss of bacteria occurred during incubation periods of several days. Under the best conditions, more than 80% of the activity of the free cells was recovered in the immobilized cell preparation.

Enzymatic Properties of Escherichia coli Entrapped Cells

Enzymatic properties of immobilized preparations were investigated and compared to those of free cells and to the known properties of the purified enzyme.

1. *pH Effect.* The effect of pH on the synthesis of L-tryptophan from indole, ammonia and pyruvate by immobilized cells and by free cells is shown in Figure 3. The pH profiles for both preparations were very similar with a maximum value close to pH 9.0, identical to that measured for the synthetic reaction with purified tryptophanase (Watanabe and Snell, 1972).

2. *Temperature Effect.* The immobilized cell preparation presented a maximal activity between 35 and 40°C (Fig. 4). Activity was nearly abolished above 45°C. All subsequent experiments were made routinely at 37°C.

3. *Effect of Pyridoxal Phosphate.* A clear-cut increase in activity (ca. 50%) was observed when 1 mM pyridoxal phosphate was added to the immobilized cell preparation.

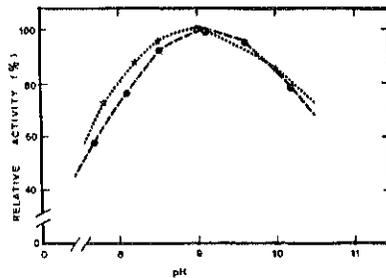


Fig. 3. Effect of pH on the synthesis of L-tryptophan by free (•••••) or entrapped cells (●—●)

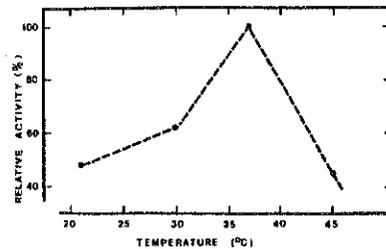


Fig. 4. Effect of temperature on the synthesis of L-tryptophan by entrapped cells

In continuous experiments, 1 mM PLP was always present in incubation mixtures. No attempt was made to optimize the concentration of added PLP. Lower concentrations would probably have been as efficient.

4. *Stability.* When the immobilized cell preparation was stored in 0.04 M phosphate buffer pH 8.0, a rapid loss of activity occurred (10% remaining after 3 days at 37°C). When the preparation was stored in the complete incubation mixture without PLP, activity was more stable (35% remaining after 3 days). Addition of PLP to the mixture stabilized the tryptophanase activity (80% remaining after 3 days, 70% after 5 days).

5. *Effect of Pyruvate Concentration.* Table 2 illustrates the production of L-tryptophan by an immobilized cell preparation compared to a free cell preparation for various concentrations of pyruvate. A maximum value was obtained in both cases with 0.5 M pyruvate. However, it was found that at alkaline pH values, in the presence of indole and ammonia, pyruvate disappeared rapidly in the reaction mixture (approximately 50% in 2 h at 37°C, pH 9.0) as estimated by reduction with NADH in the presence of lactate dehydrogenase. Imine formation with ammonia was probably the main reaction responsible for pyruvate decrease, but it cannot be excluded that further reactions of pyruvate occurred. Indole concentration also decreased slowly under the same conditions (approximately 50% in 2 days) with a bimolecular reaction pattern. Since indole utilization in L-tryptophan synthesis was much more rapid in most experiments, this reaction was neglected but it may explain that the maximal measured conversion rate of indole is lower than 100%.

6. *Effect of Indole Concentration.* The optimal indole initial concentration was found to be below 3 mM for entrapped or free bacterial cells in initial rate measurements. At such concentrations, free tryptophanase is fully inhibited (Watanabe and Snell, 1972). Under flow reactor conditions, the optimal indole concentration varied with the reactor flow rate. Figure 5 illustrates the synthesis of L-tryptophan as a function of the flow rate, expressed as space velocity SV (SV: number of reactor volumes/hour), for a 8 mM input concentration of indole and various amounts of bacterial cells. As expected, the highest conversion rates occurred for higher amounts of bacteria at lower SV-values. The specific productivity of such reactors calculated for a space velocity corresponding to 50% conversion or to a limit 100% conversion gave similar results (approximately 0.5 ± 0.1 mmol L-tryptophan/hour/g of bacteria) except for the lower amount of bacteria (0.8 ± 0.1 mmol L-tryptophan/hour/g of bacteria) (Table 3). A plug flow reactor containing 3 g of bacterial cells operating under the same conditions had a similar productivity (0.6 ± 0.1).

Table 2. Effect of pyruvate concentration on the synthesis of L-tryptophan by free or entrapped cells

Pyruvate concentration	L-tryptophan synthesized ($\mu\text{mol}/30 \text{ min}/100 \text{ mg}$ of bacteria)	
	free cells	entrapped cells
0.1 M	20	18
0.25 M	23	23
0.5 M	25	26
1 M	27	27

Synthesis of L-tryptophan by Immobilized *Escherichia coli* Cells

39

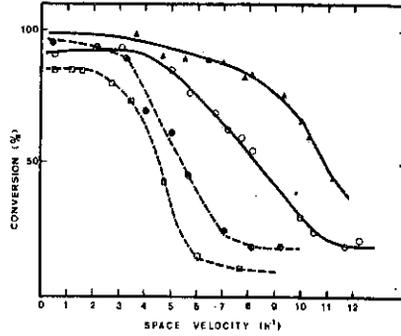


Fig. 5. Synthesis of L-tryptophan as a function of flow rate in a 20 ml CSTR containing various amounts of gel entrapped cells (30% w/w).
 □—□: 0.45 g; ●—●: 0.9 g;
 ○—○: 1.35 g; ▲—▲: 1.8 g. Indole input concentration, 8 mM

Table 3. Total and specific productivities in continuous stirred and plug flow reactors containing various amounts of immobilized bacteria, at SV values corresponding to 50% conversion (SV_{50}) and at maximal SV values corresponding to 100% conversion (SV_{100})

	Continuous stirred reactor					Plug flow reactor
	0.45	0.9	1.35	1.8	3	
Bacterial amount (g)	0.45	0.9	1.35	1.8	3	
SV_{50}	Total productivity (mmol L-Trp/hour)	0.36	0.44	0.68	0.90	2.0
	Specific productivity (mmol L-Trp/hour/g of bacteria)	0.8	0.49	0.5	0.5	0.66
SV_{100}	Total productivity (mmol L-Trp/hour)	0.38	0.50	0.65	1.01	1.7
	Specific productivity (mmol L-Trp/hour/g of bacteria)	0.84	0.56	0.48	0.55	0.57

A dramatic change in the reactor conversion rate was observed when the input concentration of indole was set to 18 mM (Fig. 6). At this concentration, a very small increase in SV values of approximately 2.5 h^{-1} resulted in an abrupt decrease in the conversion of indole to L-tryptophan giving a residual value of about 10%. This inhibition pattern was slowly reversible when the input concentration of indole was lowered. In addition, when the SV values was maintained at 2.5 h^{-1} , the conversion rate became strongly affected by very slight variations in indole concentration of approximately 17 mM (Fig. 7).

40

P. Decottignies-Le Maréchal et al.

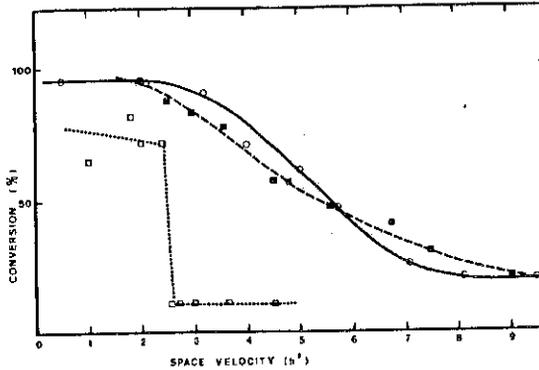


Fig. 6. Effect of flow rate on the synthesis of L-tryptophan in a 20 ml CSTR containing 0.9 g of gel entrapped cells (30% w/w). Indole input concentration: \circ — \circ : 8 mM; \blacksquare — \blacksquare : 15 mM; \square — \square : 18 mM

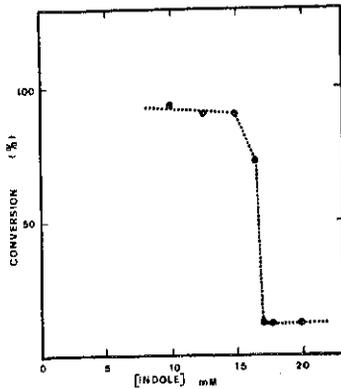


Fig. 7. Effect of indole concentration on the synthesis of L-tryptophan in a 20 ml CSTR containing 0.9 g of gel entrapped cells (30% w/w) SV: 2.5 h^{-1}

The kinetics of approach to a new steady-state following a small change in SV value at 18 mM indole is shown in Figure 8. A slow sigmoidal change in the conversion rate was observed, very different from the rapid exponential change occurring when indole concentration was 8 mM.

Figure 9 illustrates the production of L-tryptophan during a 10 day period in the recycling device described in Figure 1. The column containing 3 g of bacterial cells in

Synthesis of L-tryptophan by Immobilized *Escherichia coli* Cells

41

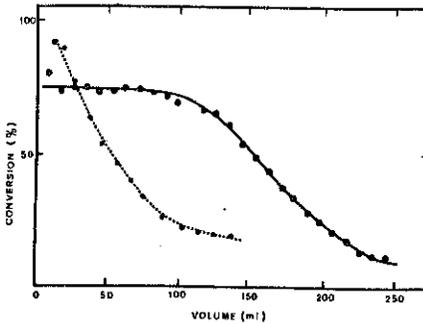


Fig. 8. Kinetics of approach to a stable steady state in a 20 ml CSTR containing 0.9 g of gel entrapped cells (30% w/w) after a change in flow rate from 2.5 SV to 2.65 SV. Indole input concentration: 18 mM. The approach to a new steady state after a similar change in SV values, at a 8 mM indole concentration, is illustrated (dotted line) for comparison

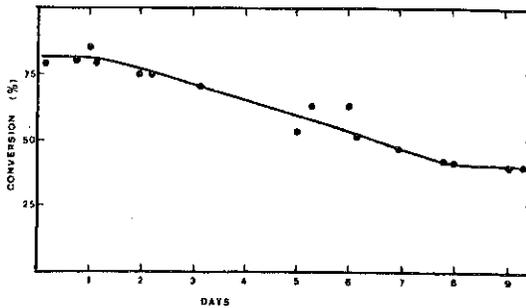


Fig. 9. Synthesis of L-tryptophan in a plug flow reactor containing 3 g of entrapped bacterial cells (30% w/w) with recycling of pyruvate and ammonia (see experimental part) at 54 ml.h⁻¹ (SV: 2.7 h⁻¹). Indole concentration: 10 mM; pH 9.1

10 g of total gel was operated at a 10 mM input concentration of indole, at 37°C and pH 9.1 (periodically adjusted with NH₄OH), at a SV value of 2.7 h⁻¹. After 10 days, the elution of charcoal allowed the recovery of 12 g of crystallised L-tryptophan (approximately 50% yield from indole).

No microbial contamination was observed in these experiments probably due to the presence of 10% ethanol (necessary for indole solubilization) in the reaction mixture.

Discussion

Several papers have been published concerning the immobilization of microbial cells by entrapment in a polyacrylamide gel lattice (Franks, 1971; Slowinski and Charm, 1973; Chibata et al., 1974; Yamamoto et al., 1976) and some data are available on the best conditions for immobilization and the properties of immobilized cells. When *Escherichia coli* cells maximally induced for tryptophanase activity were immobilized by the same technique, the L-tryptophan synthesising activity was efficiently recovered in the presence of indole, excess pyruvate and ammonia. The best preparations were obtained in polymerization conditions similar to those described by Chibata et al. (1974) for aspartate synthesis with immobilized cells of *Escherichia coli*. The optimum amount of monomer was slightly lower in this case (0.125 g/ml instead of 0.185 g/ml), but no significant change in activity occurred with noticeable changes in the BIS concentration. These results agree with previous studies indicating that the porosity of polyacrylamide gel is roughly dependent on the concentration of the monomer and independent of that of the reticulating agent (White, 1960; White and Dorion, 1961). It can be noted that the persulfate-induced polymerization procedure does not seem to result in any loss of enzymatic activity. Chibata et al. (1974) found a 2 pH U difference between the optimum pH of immobilized *Escherichia coli* cells containing aspartase activity and free cells. In the present results, no difference in pH effect was observed between the immobilized and the free cell activity. Chibata's results have been related to an activation process of aspartase activity by pH induced autolysis; it appears that such an activation does not take place in the tryptophanase system. On the contrary, the tryptophanase activity seems to be dependent on cellular integrity: high temperatures, which do not inactivate free tryptophanase (Raibaud and Goldberg, 1973), nearly abolish L-tryptophan production by immobilized (or free) cell preparations.

Of the three tryptophanase substrates, to shift the reaction towards L-tryptophan synthesis, pyruvate and ammonia must be present in large excess. Sodium pyruvate and ammonium bicarbonate were used routinely in this work. The concentration of pyruvate was most critical: a 0.25 M concentration was necessary for maximal activity, but chemical reactivity at the pH and temperature value employed, in the presence of ammonia, rapidly reduced the amount of available substrate. Utilization of pyruvamine, possibly formed in these conditions, remains questionable. The best results were obtained in flow reactor experiments with separate feeding of pyruvate, indole and ammonia buffer.

In all experiments, indole was used as the limitant reactant, since it inhibits free tryptophanase at very low concentrations. Surprisingly, when free or immobilized cells were used, the maximum concentration of indole (5-10 mM) permitting a reasonable reaction rate was higher by two orders of magnitude than that in the case of the free enzyme. Cell integrity, as previously shown by the temperature dependence of immobilized cells, is probably the main factor responsible for the beneficial behaviour of tryptophanase activity; its effect, perhaps, is to maintain a decreasing indole concentration gradient between the outside and the inside of the cell, such as tryptophanase may function in optimal conditions. No additional limitation for indole diffusion is introduced by the polyacrylamide gel lattice.

When flow reactors were fed with increasing indole concentrations, an abrupt decrease in conversion yield was observed between 15 mM and 18 mM indole, which depended on the flow rate and the bacterial amount and indicated the occurrence of a metastable steady-state reaction. Such a behaviour has been predicted, on theoretical grounds, by O'Neill (1971), O'Neill et al. (1971) and El Rifai et al. (1976), from kinetic equations of substrate inhibited reactions occurring in CSTR. For critical K_M , K_I and $[S]$ values, with small changes in concentration and/or flow parameters, three possible steady states can be obtained, two of them stable, the intermediate one unstable. The dramatic change observed in conversion yield for small increases in indole concentration or flow rate agrees very well with such a model and represents the first experimental example of multiple steady state behaviour. The kinetic equations developed for the model predict, in the metastable region, a sigmoidal approach to the new steady-state equilibrium in contrast to the usual exponential approach (O'Neill, 1971). Such a difference was clearly observed when the conversion rate was continuously monitored after any change in flow rate or indole concentration (above 15 mM) (Fig. 8).

From these results, it was considered that immobilized cells could be used for a continuous production of L-tryptophan from indole, pyruvate and ammonia. Owing to the large excess of the latter substrates necessary for optimal conversion, a recycling process was highly desirable. This was obtained by percolating the effluent from the reactor into an activated charcoal column which retained L-tryptophan and recycling it, after restoration of the initial indole concentration, into the reactor. Twelve g of L-tryptophan were recovered after a 10 day operation, at which time the conversion was lowered to ca. 40% (Fig. 9). The reasons for the decrease in conversion yield are not clear but may be a result of a decrease in cell activity or an inhibition by the products of a pyruvate alkaline reaction, which accumulate in the medium. In fact, a substantial increase in conversion rate was obtained when the recycled medium was replaced by a freshly prepared one.

The use of a column of entrapped *Escherichia coli* cells is thus an efficient method for the continuous synthesis of L-tryptophan. The process can be automatically controlled, for example, by adjusting the indole concentration or the flow rate to the conversion yield, measured at the outlet of the reactor.

Acknowledgments. This work was supported by the Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique (Grants N° 75-7-0265 and 77-7-0732).

References

- Bücher, T., Czok, R., Lamprecht, W., Lutzko, E. (1963). Methoden der enzymatischen Analyse, H.U. Bergmeyer, ed., pp. 253-259. Weinheim: Verlag Chemie
- Chibata, I., Tosa, T., Sato, T. (1974). Appl. Microbiol. 27, 878-885
- El-Rifai, M.A., Elnashaie, S.S., Gaber, A.H. (1976). Analysis and control of immobilized enzyme systems, D. Thomas and J.P. Kernevez, eds., pp. 227-235. Amsterdam: North Holland Publishing Company
- Franks, N.E. (1971). Biochim. Biophys. Acta 252, 246-254
- Nakamura, H., Pisano, J.J. (1976). Arch. Biochem. Biophys. Acta 252, 245-254
- Nakazawa, H., Enci, H., Okumura, S., Yamada, H. (1972). Agr. Biol. Chem. 36, 2523-2528

- O'Neill, S.P. (1971). *Biotechnol. Bioeng.* XIII, 493-502
- O'Neill, S.P., Lilly, M.D., Rowe, P.N. (1971). *Chem. Eng. Sci.* 26, 173-175
- Raibaud, O., Goldberg, M.E. (1973). *J. Biol. Chem.* 248, 3451-3455
- Slowinski, W., Charm, S.E. (1973). *Biotechnol. Bioeng.* XV, 973-979
- Tosa, T., Sato, T., Mori, T., Chibata, I. (1974). *Applied Microbiol.* 27, 886-889
- Watanabe, T., Snell, E.E. (1972). *Proc. Nat. Acad. Sci.* 69, 1086-1090
- White, M.L. (1960). *J. Phys. Chem.* 64, 1563-1565
- White, M.L., Dorion, G. (1961). *J. Polymer Science* 55, 731-740
- Yamamoto, K., Tosa, T., Yamashita, K., Chibata, I. (1976). *Eur. J. Appl. Microbiol.* 3, 169-183

Received November 3, 1978

DOCUMENT 4

- 123 -

CHAPITRE VI
SEPARATION DU TRYPTOPHANE

1 - INTRODUCTION

Dans les conditions de bioconversion que nous avons définies, le Tryptophane est produit dans un milieu réactionnel contenant :

- du pyruvate de sodium,
- de l'acétate d'ammonium,
- du PLP,
- de l'éthanol,
- du K_2HPO_4 ,
- et éventuellement de l'indole résiduel à une concentration maximale d'environ 5 mM.

En raison de leurs coûts, la réutilisation des réactifs (notamment celle du pyruvate et du PLP) est indispensable. Le procédé de séparation du Tryptophane doit donc tenir compte de ce recyclage des réactifs. C'est ainsi que la solution réactionnelle contenant le Tryptophane doit subir le moins possible de modifications (dilution, ajout d'espèces ioniques pour modification de pH, etc...).

De plus, compte tenu de la réaction parasite intervenant entre le pyruvate et les ions ammonium, le temps de séjour hors réacteur de bioconversion, doit être minimisé.

Ces contraintes imposent une séparation spécifique du Tryptophane permettant un recyclage rapide du milieu réactionnel.

Les données bibliographiques que nous avons pu recueillir envisagent des procédés de séparation du Tryptophane par cristallisation directe, échange d'ions, charbons actifs et précipitation par l'inosine. [Brevets n° 1601066 - 2119018 - 2256243 - 2379603]. En fait, comme nous l'avions signalé dans le chapitre I, très peu de données quantitatives et qualitatives permettant d'estimer l'efficacité de ces procédés ont été fournies.

La nécessité d'un recyclage rapide des réactifs ne permet pas d'envisager la cristallisation directe du Tryptophane par concentration.

De même, la concentration relative du Tryptophane par rapport aux autres espèces ioniques du milieu (K^+ , Na^+ , NH_4^+ , PO_4^{--} , pyruvate, acétate) écarte les possibilités de séparation du Tryptophane par échange d'ions.

Nous avons donc étudié l'adsorption du Tryptophane sur charbons actifs et sa précipitation par l'inosine.

2 - SEPARATION SUR CHARBON ACTIF

2.1. - Matériel et méthodes

2.1.1. - Mode opératoire

Les essais d'adsorption ont été effectués en bécher contenant 25 ml de solution et 1 g de charbon.

Nous avons étudié le comportement de divers constituants du mélange réactionnel :

- du Tryptophane introduit à une concentration de 10^{-2} M, pH9
- du PLP 10^{-4} M, pH9
- du pyruvate de sodium 0,5 M ; pH9
- de l'indole 5 mM, pH9.

Après 3 heures de contact sous agitation, la solution est filtrée.

L'éluotion est effectuée par remise en suspension du charbon dans diverses solutions.

Les charbons actifs essayés étaient les suivants :

- le TIG 1435, le PICAFLO 613 et le super CMA de la Société PICA
- l'HYDRAFIN A/N de la Société BAYER
- le BGP de la société CECA
- le LM 25 de la société ACTICARBONE
- le PKST 3-5, le TNW de la société NORIT.

2.1.2. - Analytique

Les dosages des différents composés étudiés ont été réalisés par spectrophotométrie :

- à 280 nm pour l'indole et le Tryptophane
- à 380 nm pour le PLP
- à 320 nm pour le pyruvate.

2.2. - Résultats

2.2.1. - Adsorption

Les résultats que nous avons observés sont présentés dans le tableau 17.

CHARBON ACTIF	Tryptophane %	PLP %	Pyruvate %	Indole %
TIG 1345 (PICA)	97	95	nd	nd
TNW (NORIT)	> 99	99	nd	nd
HYDRAFIN A/N (BAYER)	88	96	< 1	100
PICAFLO 613 (PICA)	99	97	< 1	100
LM25 (ACTOCARBONE)	56	80	< 1	100
PKST 3-5 (NORIT)	56	82	8	nd
BGP (CECA)	59	55	< 1	100
SUPER CMA (PICA)	98	> 99	8,7	nd

TABLEAU 17 : ADSORPTION DU TRYPTOPHANE, DU PLP, DU PYRUVATE ET DE L'INDOLE SUR DIFFERENTS CHARBONS ACTIFS (en % de la quantité initiale introduite).

- le PLP a à peu près le même comportement que le Tryptophane
- le pyruvate n'est pratiquement pas adsorbé
- l'indole est totalement adsorbé.

L'adsorption du PLP et de l'indole pose un certain nombre de problèmes :

- l'éluion du Tryptophane devra être spécifique
- le recyclage du PLP et de l'indole après une éventuelle éluion spécifique

du Tryptophane s'avère complexe du fait de leur dilution inévitable lors de l'éluion. Or si l'on peut adapter les conditions de bioconversion pour éviter la présence d'indole en sortie de réacteur, cela n'est pas possible pour le PLP (cf. chapitre V paragraphe 4.2.1.). Le non recyclage du PLP se traduirait, dans l'état actuel du procédé, par une dépense supplémentaire de l'ordre de 40 F par kilo de Tryptophane produit (prix du PLP qualité laboratoire 15 F/g).

2.2.2. - Eluion

En raison des observations faites précédemment nous n'avons pas expérimenté de manière systématique l'éluion des produits adsorbés. Les solutions testées (HCl de 10^{-3} N à 2 N, KOH de 10^{-3} N à 1N, solutions ammoniacales à diverses concentrations) n'ont pas permis l'éluion spécifique du Tryptophane. Ce type de procédé a donc été provisoirement écarté. Compte tenu de leurs utilisations dans diverses publications et bien qu'aucune donnée n'ait été fournie sur l'adsorption parallèle du PLP, il est possible que certains charbons permettent d'obtenir de meilleurs résultats. La concentration minimale en PLP nécessaire à la bioconversion en continu, déterminera par ailleurs, l'intérêt de cette séparation sur charbons actifs.

3 - PRECIPITATION DU TRYPTOPHANE PAR L'INOSINE

3.1. - Données bibliographiques

3.1.1. - L'inosine

L'inosine est un ribonucléoside entrant dans la composition des ARN. Elle résulte de la formation d'une liaison N glycosidique entre une base purique (l'hypoxanthine) et un sucre (le ribose) figure 49.

3 - PRECIPITATION DU TRYPTOPHANE PAR L'INOSINE

3.1. - Données bibliographiques

3.1.1. - L'inosine

L'inosine est un ribonucléoside entrant dans la composition des ARN. Elle résulte de la formation d'une liaison N glycosidique entre une base purique (l'hypoxanthine) et un sucre (le ribose) figure 49.

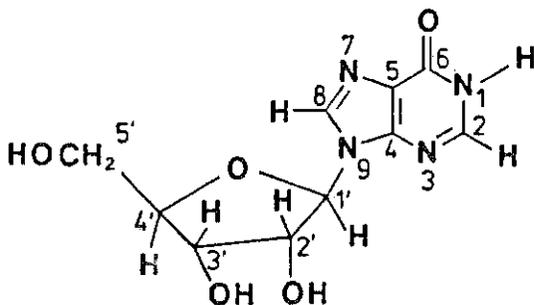


FIGURE 49 - L'INOSINE

L'inosine est utilisée en médecine comme stabilisant du sang conservé, agent physiologique d'activation des vitamines, tonique du foie et du coeur et dans l'industrie chimique comme accélérateur lors de la synthèse du 5'inosinate de sodium utilisé comme condiment [Brevet n° 1601066].

3.1.2. - Interaction avec le Tryptophane

C'est l'étude des interactions entre les acides nucléiques et les enzymes qui est à l'origine de la mise en évidence des associations entre le Tryptophane et divers nucléosides. Le Tryptophane interagit avec les différents nucléosides puriques et pyrimidiques. Le mécanisme moléculaire de ces associations est assez complexe et encore mal connu. Les travaux de PIEBER (1969a, 1969b) et ceux de MONTENAY-GARESTIER (1968), bien que contradictoires, suggèrent cependant une attraction dipôle-dipôle entre le noyau indole du Tryptophane et les bases azotées des nucléosides. Selon les cas, le Tryptophane serait donneur ou accepteur d'électrons.

3.2. - Matériel et méthodes

3.2.1. - Analytique

Les dosages du Tryptophane et de l'inosine ont été effectués par spectrophotométrie. Les spectres d'absorption de ces composés sont présentés figure 50. On remarque qu'ils se recouvrent sur la totalité de la gamme des longueurs d'onde. Un système d'équations de corrélation (figure 50) exploitées à l'aide d'un programme d'ordinateur permet d'obtenir les concentrations en Tryptophane et en inosine à partir des valeurs d'absorption à 250 et 288 nm. La précision de la mesure est de l'ordre de 2 %.

Dans certains cas, pour des mesures plus précises, les dosages ont été effectués par HPLC sur colonne C₁₈ (solvant : mélange eau-méthanol 85-15 ; débit 1,5 ml/min).

3.2.2. - Précipitation

Les essais de précipitation ont été effectués en béchers placés en baignoire de manière à assurer la régulation de la température et l'agitation des solutions.

Les solutions de Tryptophane et d'inosine, à différents pH, contenaient de l'éthanol 10 %.

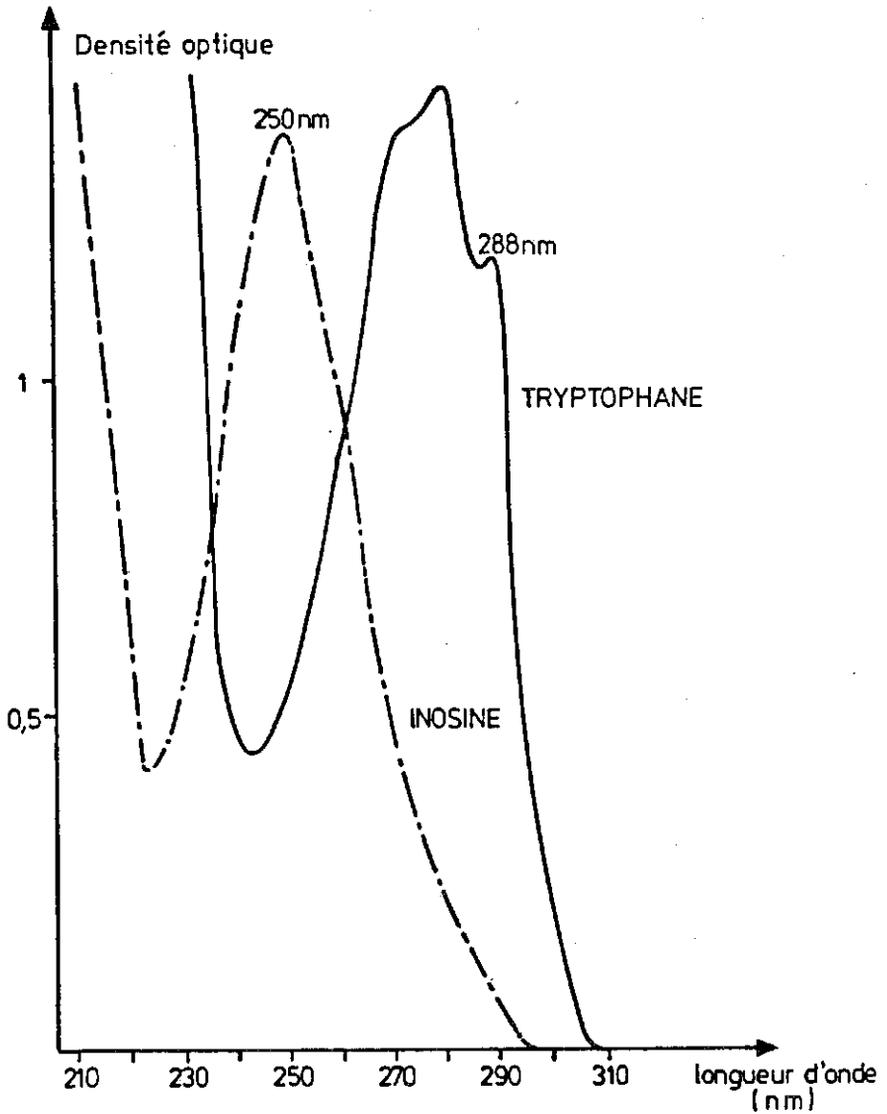


FIGURE 50 : SPECTRES D'ABSORPTION DU TRYPTOPHANE ET DE L'INOSINE

Equations de corrélation :

$$\begin{aligned}
 [\text{Inosine}] &= (0,802784 \cdot DO_{250} - 0,003981) \cdot 10^{-4} \text{ M} \\
 DO_{288} &= 0,0298685 \cdot DC_{250} - 0,001152
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 [\text{Tryptophane}] &= (2,19485 \cdot DO_{288} - 0,005116) \cdot 10^{-4} \text{ M} \\
 DO_{250} &= 0,483764 \cdot DO_{288} - 0,00074
 \end{aligned}$$

3.2.3. - Séparation Tryptophane-inosine

Les essais de séparation Tryptophane-inosine sur charbons actifs ont été réalisés dans des conditions analogues à celles décrites paragraphe 2.1.1. Les essais sur résines échangeuses d'ions ont été effectués soit en béchers, soit en colonnes thermostatées d'un diamètre de 1 et 2,5 cm et d'une hauteur réglable de 0 à 20 cm.

3.3. - Caractérisation

3.3.1. - Mise en évidence d'une réaction de précipitation

Le mélange de solutions hydroalcooliques (10 % d'éthanol) de Tryptophane et d'inosine se traduit par l'apparition rapide d'un important précipité. Le pH de la solution est alors de 6,6. Par modification du pH à une valeur inférieure à 4 ou supérieure à 10, le précipité se redissout. Les dosages effectués dans les surnageants et dans les solutions de reprise du précipité en pH acide par exemple, montrent que l'association Tryptophane-inosine est équimoléculaire et ceci quelles que soient les concentrations initiales (Tableau 18). On peut remarquer de plus, que la concentration en Tryptophane dans le surnageant diminue lorsque la quantité initiale d'inosine augmente.

3.3.2. - Spécificité de la réaction

3.3.2.1. - Spécificité pour le Tryptophane

La précipitation du Tryptophane par l'inosine est effective. Mais pour qu'elle puisse être envisagée dans le cadre du procédé étudié, l'absence d'une coprecipitation avec l'un des composés du mélange réactionnel est indispensable. Ce point a été vérifié par des essais de précipitation de ces composés (indole, pyruvate, PLP, acétate d'ammonium) par de l'inosine en excès. Aucune précipitation n'a été observée. SUZUKI (1974) a montré que cette réaction de précipitation était très spécifique du Tryptophane. C'est ainsi que l'indole et ses dérivés β substitués (acide β indolyl acétique, β indolyl propionique, β indolyl butyrique...) que la tryptamine, le tryptophol ou l'acétyl L Tryptophane ne réagissent pas avec l'inosine.

Composition de la solution initiale (mmoles)	TRYPTOPHANE	15,6	15,6	20,8	20,8	20,8	20,8	26	26
	INOSINE	14,7	19,6	24,5	19,6	24,5	29,4	24,5	29,4
Composition du surnageant (mmoles)	TRYPTOPHANE	8,1	5	4,2	8,1	7,2	5,1	8,7	5,8
	INOSINE	8,2	9,6	15	7,8	10,1	16,8	8,5	11,5
INOSINE/TRYPTOPHANE DANS LE PRECIPITE		1,04	1,05	1,09	1,02	1,08	1,07	1,06	1,09

TABLEAU 18 : COMPOSITION DU PRECIPITE TRYPTOPHANE - INOSINE ET DU SURNAGEANT POUR DIFFERENTES CONCENTRATIONS INITIALES

3.3.2.2. - Spécificité pour l'inosine

Nous avons testé le comportement du Tryptophane en présence d'autres nucléosides (adénosine, guanosine, cytosine). Aucune précipitation n'a été observée tout comme lors de mélanges Tryptophane-ribose et Tryptophane-hypoxanthine. Cette interaction moléculaire semble donc être très spécifique du Tryptophane et de l'inosine.

3.3.3. - Solubilité du complexe Tryptophane-inosine

On a vu que l'association Tryptophane-inosine est équimoléculaire et qu'un excès d'inosine augmente la quantité de précipité formé. La solubilité du complexe Tryptophane-inosine doit donc être exprimée en terme de produit de solubilité.

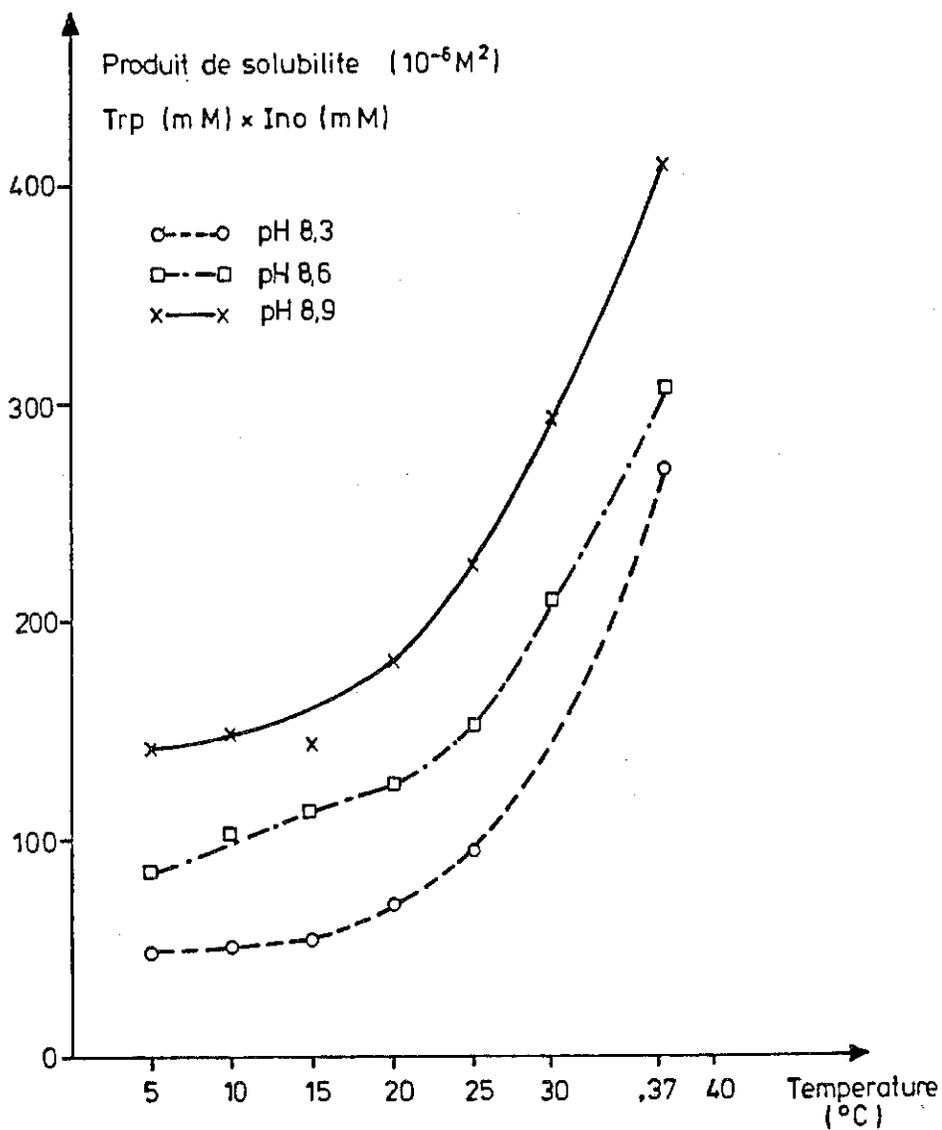


FIGURE 51 : INFLUENCE DE LA TEMPERATURE ET DU pH SUR LE PRODUIT DE SOLUBILITE TRYPTOPHANE-INOSINE.

3.3.4. - Conséquences

Influence des concentrations résiduelles en Tryptophane et inosine

On a vu (chapitre V paragraphe 4.2.5.) que la présence de Tryptophane dans le milieu entraînait un ralentissement de la vitesse de bioconversion. Le recyclage du Tryptophane non précipité semblait donc être un facteur limitant. De plus, l'inosine résiduelle pouvait représenter un "poison" pour l'enzyme.

Remarque : Dans cet essai, la concentration en inosine était de 12 mM. Il semble, dans ces conditions, que le Tryptophane ait peu d'effet inhibiteur jusqu'à une concentration de 20 mM.

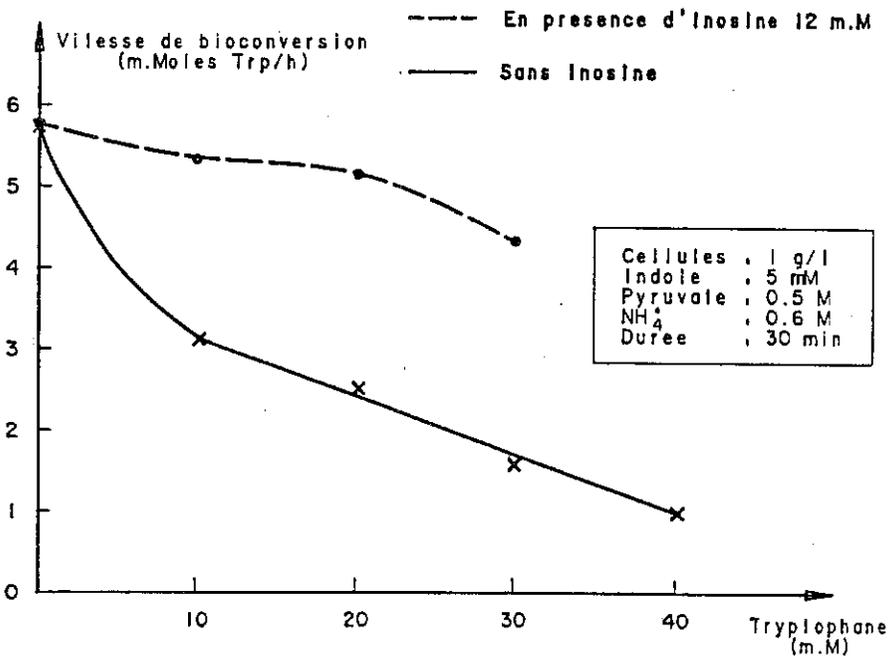


FIGURE 52 : INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN TRYPTOPHANE SUR LA VITESSE DE BIOCONVERSION, AVEC ET SANS INOSINE

① Bouillon nutritif Nutrient Broth

Prod. n° 5443

Milieux universels pour la culture des germes peu exigeants.

Composition g/litre

Extrait de viande 3,0 ; peptone de viande 5,0 ; agar-agar (manque dans le bouillon) 12,0 .

Préparation

Dissoudre 20 g/litre (agar) ou 8 g/litre (bouillon), autoclaver. Pour préparer l'agar au sang ajouter 7 g/litre de chlorure de sodium.
pH 7,0 ± 0,2.

Emploi et interprétation

Dépend du but pour lequel le milieu est utilisé.

Bibliographie

Standard Methods Examination of Water and Wastewater (13th Ed. 4^e Publ. Health Assoc., New York 1971)

②

MILIEU DE CULTURE (MILIEU LENNOX)

Bactotryptone.....	10 g
Extrait de levures.....	5 g
NaCl.....	5 g
H ₂ O.....	qsp. 1 l
pH (KOH).....	7,4

③

Bouillon nutritif

Ce milieu très clair permet la croissance des germes à partir d'un inoculum faible.

Formule (en grammes par litre d'eau distillée)	Peptone	10
	Extrait de viande	10
	Chlorure de sodium	5
	pH : 7,5 (environ)	

Préparation Verser 25 g de poudre dans un litre d'eau distillée. Bien mélanger et répartir en tubes. Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.

Présentation Milieu déshydraté :
Boîte de 450 g

code : 59 537

Conservation Conserver la boîte soigneusement fermée dans un endroit frais et sec. La date de péremption est indiquée sur chaque conditionnement.

④ Bouillon Cœur-Cerveau Brain Heart Broth

Prod. n° 10493

Composition g/litre

Infusat de cerveau 12,5 ; infusat de cœur 5,0 ;
protéose-peptone 10,0 ; D(+) glucose 2,0 ; sodium
chlorure 5,0 ; dihydrogénophosphate de sodium 2,5 ;
agar-agar (manque dans le bouillon) 15,0

Préparation

Dissoudre 52 g/litre pour l'agar ou 37 g/litre pour le
bouillon, autoclaver.

pH 7,4 ± 0,2.

Emploi et interprétation

Dépend du but pour lequel le milieu est utilisé.

⑤ Bouillon viande-foie glucosé

Le bouillon viande-foie glucosé à 0,2 % est un milieu liquide qui permet
la croissance de nombreux germes aérobies et anaérobies.

Formule (en grammes par litre d'eau distillée)	Base viande-foie	20,3
	Glucose	2
	Chlorhydrate de cystéine	0,5
	pH final = 7,4	

Préparation Mettre 32 g de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée. Chauffer
lentement en agitant fréquemment jusqu'à complète dissolution.
Ajuster, si nécessaire, le pH à 7,4. Répartir, puis stériliser à l'auto-
clave à 120 °C pendant 20 minutes.
Régénérer au moment de l'emploi.

Présentation

- Milieu prêt à l'emploi :
 - 5 tubes 10 ml code : 53 615
 - Fl. 450 ml code : 53 613
- Milieu déshydraté :
 - Fl. 450 g code : 64 091
 - Fl. 100 g code : 64 092

Conservation

- Milieu prêt à l'emploi : à + 4°C.
- Milieu déshydraté : conserver la boîte soigneusement fermée dans
un endroit frais et sec.
La date de péremption est indiquée sur chaque conditionnement.

⑥

Bouillon peptoné salé glucosé

Le bouillon peptoné salé glucosé est un milieu liquide qui permet la croissance des germes aérobies ne présentant pas d'exigences particulières.

Formule (en grammes par litre d'eau distillée)	Peptone	10
	Extrait de viande	5
	Chlorure de sodium	5
	Glucose	2
	pH final = 7,4	

Préparation Mettre 22 g de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée. Chauffer lentement, en agitant fréquemment jusqu'à complète dissolution. Ajuster, si nécessaire, le pH à 7,4. Répartir, puis stériliser à l'autoclave à 120 °C pendant 20 minutes.

Présentation — Milieu prêt à l'emploi :
5 tubes 10 ml code : 53 475
— Milieu déshydraté :
Fl. de 450 g code : 64 071

Conservation — Milieu prêt à l'emploi : à + 4°C.
— Milieu déshydraté : conserver la boîte soigneusement fermée dans un endroit frais et sec.
La date de péremption est indiquée sur chaque conditionnement.

⑦

Bouillon nutritif

Le bouillon nutritif est un milieu liquide qui permet la croissance des germes ne présentant pas d'exigences particulières.

Formule (en grammes par litre d'eau distillée)	Peptone	5
	Extrait de viande	1
	Extrait de levure	2
	Chlorure de sodium	5
	pH 7,4 (environ)	

Préparation Verser 13 g de poudre dans un litre d'eau distillée. Bien mélanger et répartir en tubes. Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.

Présentation — Bouillon prêt à l'emploi :
5 tubes 10 ml code : 53 445
Fl. 100 ml code : 53 444
Fl. 225 ml code : 53 442
Fl. 450 ml code : 53 443
— Bouillon déshydraté :
Boîte de 100 g code : 64 066
Boîte de 450 g code : 64 067

Conservation — Bouillon prêt à l'emploi : à + 4°C.
— Bouillon déshydraté : conserver la boîte soigneusement fermée dans un endroit frais et sec.
La date de péremption est indiquée sur chaque conditionnement.

⑧

Bouillon au foie Liver Broth

Prod. n° 5464

Composition g/litre

Poudre au foie 50,0 ; D(+)-glucose 10,0 ; phosphate disodique 2,0.

Préparation

Mettre en suspension 62 g dans un litre, faire bouillir environ 15 minutes, répartir en tubes le bouillon trouble bien agité et autoclaver.

pH 7,6 ± 0,1.

⑨

Bouillon glucosé tamponné

Formule (en grammes par litre d'eau distillée)	Peptone	20
	Extrait de viande	2
	Chlorure de sodium	2,5
	Phosphate monopotassique	0,2
	Phosphate disodique	3,4
	Glucose	4

Préparation Verser 32 g de poudre dans 1 litre d'eau distillée bien mélanger et avant répartition, stériliser à l'autoclave à 115°C pendant 15 minutes.

Présentation

- Milieu prêt à l'emploi:
5 tubes 10 ml Code : 53 365
Fl. 45 ml Code : 53 362
- Milieu déshydraté:
Bottle 450 g Code : 64 037
Bottle 100 g Code : 64 036

Conservation

- Milieu prêt à l'emploi : à + 4 °C.
- Milieu déshydraté : conserver la bottle soigneusement fermée dans un endroit frais et sec.
La date de péremption est indiquée sur chaque conditionnement.

EPREUVE PROFESSIONNELLE DE SYNTHÈSE

B - RÉALISATION PRATIQUE D'OPÉRATIONS DE GENIE BIOLOGIQUE

Durée totale : 8 h

Coef. : 8

PREMIER JOUR (Durée : 4 h)

1. ÉTUDE DE LA CROISSANCE D'ESCHERICHIA COLI (80 points)

Influence des facteurs physico-chimiques

A partir d'une culture de 18 h (en phase exponentielle de croissance) d'Escherichia coli, inoculer un volume équivalent à 10 % du volume de milieu contenu dans les fioles A et B (la nature du milieu et son volume vous sont indiqués au début de l'épreuve).

Soumettre les milieux à agitation. Faire une lecture de l'absorbance toutes les 15 minutes pendant 3 heures.

Procéder à l'étude de la croissance d'Escherichia coli en suivant l'évolution de l'absorbance en fonction du temps.

Faire pour chaque milieu (fiole A et fiole B) deux numérations aux temps $t = 1$ heure et $t = 2$ heures.

(Se servir d'un bac à glace pour y déposer les échantillons prélevés afin de stopper la croissance dans ceux-ci).

On demande :

- 1 — Un tableau présentant les différents temps de mesure, les absorbances et $\log A$.
- 2 — Les courbes représentant la variation du logarithme de l'absorbance en fonction du temps $\log A = f(t)$, sur papier millimétré.
- 3 — Comparer les 2 courbes. Quelles phases observe-t-on ?
Conclusion.

2. GROUPE HLA (20 points)

Lecture et interprétation des plaques de détermination "HLA" remises, concernant un individu dont l'âge, le sexe et la race sont précisés.

Conclusion, discussion.

DEUXIEME JOUR (Durée : 4 h)

1. ETUDE D'UNE FERMENTATION PAR SACCHAROMYCES CEREVISIAE (60 points)

On suit l'évolution en fonction du temps de divers paramètres lors de la culture de *Saccharomyces cerevisiae* dans le milieu initial suivant :

– glucose	: 5 g/l
– $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$: 10 g/l
– $\text{KH}_2 \text{PO}_4$: 6 g/l
– $\text{Mg SO}_4, 7 \text{ H}_2\text{O}$: 3 g/l
– $\text{Ca Cl}_2, \text{ H}_2\text{O}$: 0,1 g/l
– Na Cl	: 0,1 g/l
– Extrait de levure	: 0,5 g/l

Chaque heure, depuis le temps initial et jusqu'au temps 8 heures, est réalisé un prélèvement stérile.

Chaque fois, une fraction égale, de 20 ml, est diluée, puis distillée ; on recueille 100 ml de distillat sur lequel on effectue le dosage de l'éthanol.

Le reste du prélèvement est centrifugé et permet le dosage du glucose.

1.1. Dosage du glucose (méthode à la glucose oxydase)

On utilise un coffret BOEHRINGER.

Le principe et le mode opératoire de la méthode figurent dans la fiche technique présente en annexe.

Adapter le mode opératoire aux conditions du dosage.

1.2. Dosage de l'éthanol

1.2.1. Principe

En milieu acide, l'éthanol est oxydé par le dichromate en acide éthanoïque ; cette réaction se traduit par une diminution de l'absorbance d'une solution acide de dichromate à 420 nm. La réaction d'oxydation est accélérée par chauffage à 80°C.

1.2.2. Mode opératoire

1.2.2.1. Etalonnage

Diluer au 1/20, avec de l'eau distillée, la solution étalon d'éthanol à 3 g/l.

Dans une série de tubes à essais, introduire :

- 2,5 ml d'acide sulfurique 9 mol/l,
- 1 ml de dichromate de potassium à 3,18 g/l,
- puis 0,5 - 1 - 2 - 3 - 4 - 5 ml de solution diluée d'éthanol.

Mettre les tubes 20 min au bain-marie à 80°C.

Refoldir et compléter à 10 ml.

Lire l'absorbance à 420 nm en réglant le tube témoin à 0,4 unité d'absorbance.

1.2.2.2. Dosage

Traiter de manière identique les divers échantillons en prenant une prise d'essai de 5 ml pour les prélèvements de 0, 1, 2 et 3 heures et de 1 ml pour les autres.

1.3. Résultats : compte-rendu

On demande :

- de rassembler sous forme de tableaux les valeurs numériques correspondant aux manipulations effectuées et aux résultats obtenus,
- de justifier les dilutions et les calculs effectués,
- de compléter le tableau de résultats suivant qui inclut la concentration C de la biomasse déterminée aux divers temps.

Temps en heures	Biomasse g/l	Glucose g/l	Ethanol g/l
0	0,11		
1	0,12		
2	0,15		
3	0,24		
4	0,39		
5	0,62		
6	1,00		
7	1,10		
8	1,15		
9	1,18	0	1,00
10	1,30	0	0,25
11	1,60	0	0
12	1,70	0	0
13	1,70	0	0

- de rassembler les valeurs de ces divers paramètres en un seul graphe représentant la variation de la concentration C en fonction du temps,
- d'interpréter le graphe obtenu.

2. ETUDE DE LA CROISSANCE D'ESCHERICHIA COLI

Lecture et interprétation des résultats du 1er jour.

A l'aide des résultats, calculer K (coefficient d'adsorption pour le milieu $K = A/C$), les taux de croissance et temps de génération pour la souche donnée.

Evaluer l'efficacité des 2 cultures.

Test-Combination

Glucose

Méthode GOD-Ferid*
Méthode colorimétrique
Réf. 124 028 pour env. 2 x 50 dosages
Réf. 124 036 pour env. 3 x 175 dosages

Méthode

Wiemers, W., H.G. Rey et H. Weidinger, Z. analyt. Chem. 252 (1970) 224
Brevet français (no. 1589637), et brevets étrangers.

Principe
Glucose + O₂ + H₂O $\xrightarrow{\text{GOD}}$ gluconate + H₂O₂
POD $\xrightarrow{\text{H}_2\text{O}_2}$ chromogène coloré + H₂O

Valeurs usuelles

	g/l	mg/100 ml	mmol/l
Sang	0,70-1,00	70-100	3,88-5,55
Plasma ¹ , sérum	0,76-1,20	76-120	4,22-6,67

Bibliographie

Schmidt, F.H. dans E.F. Pfeiffer et coll.:
Handbuch des Diabetes mellitus.
Tome II, J.F. Lehmanns Verlag, Munich 1971, p. 938
* Massold, M. F., Am. J. Med. Technol. 43 (1976) 243

Échantillon

Sang, sérum, plasma recueilli sur héparine ou EDTA

Réactifs

Contenu
Concentrations des solutions
prêtes à l'emploi

1 Standard
Glucose
9,1 mg/100 ml ou 0,505 mmol/l

2

Tampon/enzymes/
chromogène
100 mmol/l, pH 7,0
POD \geq 0,6 g/l
GOD \geq 10 U/ml
ARTS**
1,0 mg/ml

Réactif auxiliaire
URAC** (acétate d'uranyle), Réf. 125 415.

Attention: poison!
Utiliser des pipettes de sécurité!

Contrôle de qualité

Domaine de la normale Prénorm-U et Prénorm-S
Domaine pathologique Précapit-U et Précapit-S
Pour le contrôle de la précision: Prénorm-U, PX
* ARTS: Marque déposée pour le sel de diammonium de l'acide
amino-2,2-di-(4-éthyl-3 benzothiazoline sulfonique-6)

Préparation et conservation des solutions

- Utiliser le contenu sans diluer.
Conservation: entre + 15 et + 25 °C jusqu'à la date de péremption indiquée.
- Réf. 124 010: dissoudre le contenu avec 150 ml d'eau distillée.
Réf. 124 028: dissoudre le contenu d'un flacon avec 300 ml d'eau distillée.
Réf. 124 036: dissoudre le contenu d'un flacon avec 1000 ml d'eau distillée.
Conservation: six semaines à + 4 °C.

Préparation de l'échantillon

Sang: effectuer immédiatement la déprotéinisation.

Plasma, sérum: séparer les éléments figurés.

Conservation: sept jours à + 4 °C dans un récipient bouché.

Bibliographie: Hofmeister, H. et B. Jung.

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 8 (1970) 673

Introduire dans un tube à centrifuger.

URAC**	1,00 ml
Echantillon	0,10 ml

Rincer la pipette en aspirant et refoulant plusieurs fois le liquide. Centrifuger la suspension. Utiliser 0,1 ou 0,2 ml de surnageant pour le dosage.

Conservation à + 4 °C dans le surnageant décanté: 3 jours dans un récipient bouché.

Mode opératoire

Longueur d'onde: Hg 436 nm
Hg 578 nm

Spectrophotomètre: 610 nm

Cuve: 1 cm d'épaisseur

Température: 20-25 °C

Mesurer contre le témoin. Pour chaque série de dosages, un standard et un témoin suffisent.

Mesure à Hg 436 nm

Introduire dans des tubes à essais:

	Témoin	Standard	Essai
Eau distillée	0,1 ml	—	—
Solution 1	—	0,1 ml	—
Surnageant de déprotéinisation	—	—	0,1 ml
Solution 2	5,0 ml	5,0 ml	5,0 ml

Mesure à Hg 578 nm ou à 560-620 nm			
Introduire dans des tubes à essais:			
	Témoin	Standard	Essai
Eau distillée	0,2 ml	—	—
Solution 1	—	0,2 ml	—
Surnageant de déprotéinisation	—	—	0,2 ml
Solution 2	5,0 ml	5,0 ml	5,0 ml

Mélanger et laisser reposer à 20-25 °C à l'abri de la lumière solaire directe. Après 25 à 50 min, lire l'extinction de l'essai (E_{Essai}) et l'extinction du standard (E_{Standard}) contre le témoin.

Limite de dilution

5 g/l ou 500 mg/100 ml ou 27,8 mmol/l

Dans le cas de concentrations plus élevées, retenir le dosage avec la moitié du volume de surnageant indiqué dans le schéma de pipetage: résultat x 2.

Calcul

Concentration (C) en glucose dans le sang, le sérum et le plasma:

$$C = 1 \times \frac{E_{\text{Essai}}}{E_{\text{Standard}}} \text{ (g/l)}$$

$$\hat{C} = 100 \times \frac{E_{\text{Essai}}}{E_{\text{Standard}}} \text{ (mg/100 ml)}$$

$$C = 5,55 \times \frac{E_{\text{Essai}}}{E_{\text{Standard}}} \text{ (mmol/l)}$$

Remarques

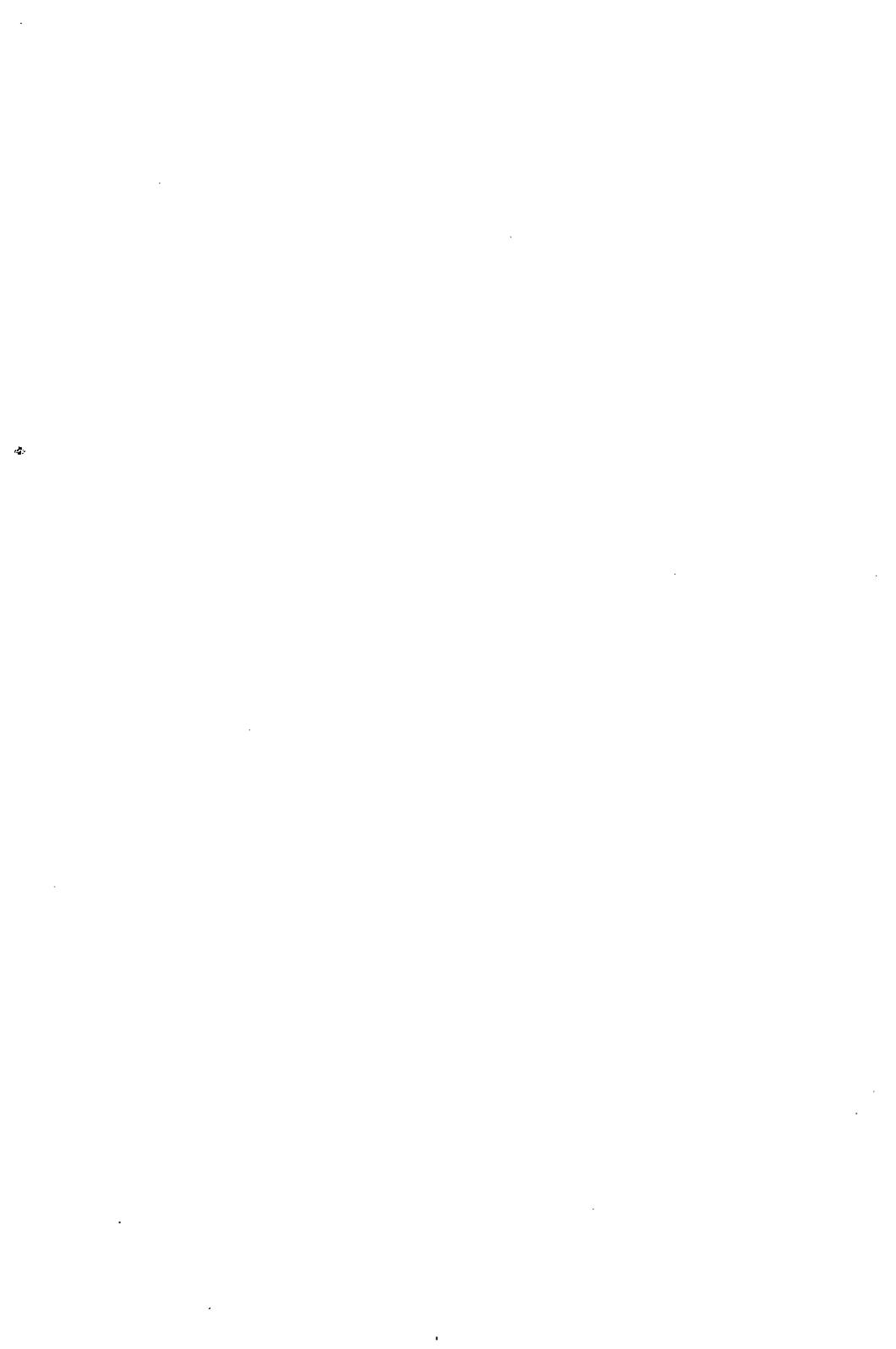
En opérant à 37 °C, le temps de réaction peut être réduit à 15 min. Effectuer les lectures dans les 10 min. qui suivent. Pour un dosage isolé, il est possible d'effectuer les lectures après 10 min. (méthode rapide) à condition de préparer et de lire (après 10 min, simultanément le standard et l'essai contre le témoin). La modification de la précision et de l'exactitude est négligeable.

La solution 2 contient de l'ARTS*. Ne pas avaler ce réactif. Eviter le contact avec la peau et les muqueuses.

La solution 3 du coffret Test-Combination Glucose, Réf. 124 010, est de l'URAC* (acétate d'uranyle). Ce réactif est toxique. Ne pas manger, boire ou fumer lors de sa manipulation. En cas d'absorption par voie orale, lors du pipetage p. ex., ou en cas de malaise, consulter immédiatement un médecin.



Boehringer Mannheim GmbH
Diagnostics



EPREUVES DE LA SESSION 1987

SCIENCES BIOLOGIQUES FONDAMENTALES ET GENIE BIOLOGIQUE

Durée : 4 heures

Coef. : 6

Le lactose est le constituant majeur de l'extrait sec des laits et des lactosérums. Ce diholoside présente un faible pouvoir sucrant, une mauvaise solubilité dans l'eau et on observe chez l'homme des cas d'intolérance au lactose.

L'hydrolyse en glucose et galactose par une lactase (bêta-galactosidase) améliore les propriétés fonctionnelles et nutritionnelles.

Mais un des problèmes liés à l'utilisation industrielle des enzymes est leur stabilité insuffisante, surtout vis-à-vis de la température d'où l'intérêt de la production d'enzymes thermostables.

PRODUCTION D'UNE BETA-GALACTOSIDASE BACTERIENNE THERMOSTABLE EN VUE D'UNE UTILISATION INDUSTRIELLE

1. Action de la température au niveau cellulaire et moléculaire (20 points)

- 1.1. Quelle est l'influence de la température sur la croissance bactérienne ?
- 1.2. Quel est l'effet d'une augmentation de température sur la structure et sur l'activité d'une enzyme ?
- 1.3. En partant de la loi d'Arrhénius reliant la constante de vitesse à la température, expliquez comment on peut déterminer l'énergie d'activation d'une réaction enzymatique.

2. Amélioration des performances d'une souche productrice de bêta-galactosidase sans faire appel au génie génétique (35 points)

- 2.1 Comment le génome des microorganismes peut-il être modifié ? (25 points)
- 2.2. En partant d'une souche sauvage, proposez une succession des étapes principales d'amélioration. (10 points)

3. Apports du génie génétique (40 points)

Dans le cas d'une enzyme produite en trop faible quantité par un organisme quelconque, le gène correspondant peut être cloné dans un hôte homologué et facile à cultiver. (L'enzyme produite par un hôte homologué peut servir à la transformation de produits à destination alimentaire, ici le lactose). Le niveau d'expression du gène cloné pourra être considérablement augmenté en changeant sa régulation, d'où l'intérêt en production industrielle.

- 3.1 Le clonage d'un gène peut être réalisé par la voie de l'ARN messenger. Schématisez cette voie (10 points)

- 3.2. Le clone portant le gène intéressant est recherché à l'aide d'un crible. Ce gène peut être détecté soit directement par hybridation avec une sonde radioactive, soit indirectement par son expression : activité enzymatique ou propriétés antigéniques de la protéine. Dans ce dernier cas, on pourra utiliser des anticorps monoclonaux.

3.2.1. En faisant le parallèle avec les anticorps polyclonaux, expliquez ce que sont ces anticorps monoclonaux, quels sont les avantages de leur utilisation et leur mode de production. (15 points)

3.2.2. Quelles sont les grandes étapes de différenciation cellulaire et de remaniement du génome qui permettront d'aboutir à la production d'anticorps par une cellule spécialisée ? (15 points)

4. Utilisation Industrielle de la bêta-galactosidase thermostable produite (25 points)

On peut distinguer trois grandes classes de procédés d'hydrolyse :

- les procédés mettant en oeuvre l'enzyme soluble en cuve,
- les procédés par enzyme soluble avec récupération par ultrafiltration,
- les procédés par enzyme immobilisée.

4.1. Les enzymes immobilisées

4.1.1. Quelles sont les principales méthodes d'immobilisation des enzymes ?

4.1.2. Comparer les propriétés des enzymes fixées à celles des enzymes en solution.

4.1.3. Décrire un réacteur à enzyme immobilisée.

- 4.2. Pour dé lactoser le lait en continu, on a proposé le système schématisé sur la figure ci-jointe. Expliquez le fonctionnement de cette unité en rappelant le principe de l'ultrafiltration.

Donnée : composition de 1 litre de lait.

eau	900 - 910 g
glucides	47 - 52 g
lipides	35 - 45 g
protéines	33 - 36 g
déchets azotés (urée...)	1,6 g
sels	9 à 9,5 g
divers	traces

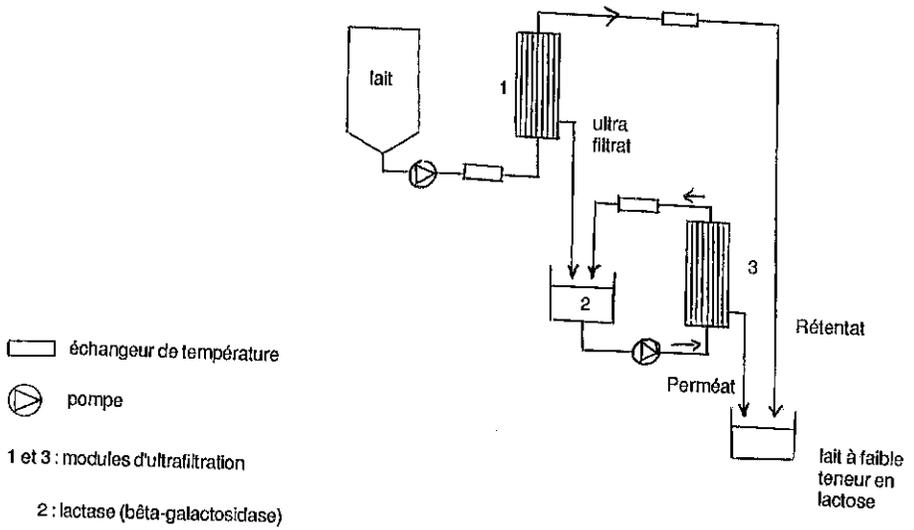


Figure : Schéma du système permettant de délactoser le lait

MATHEMATIQUES ET SCIENCES PHYSIQUES

Durée : 4 h

Coef. : 4

Le candidat traitera les deux parties sur des copies distinctes qui seront relevées séparément.

PREMIERE PARTIE : MATHEMATIQUES (Coef. : 1,5)

La clarté des raisonnements et la qualité de la rédaction interviendront pour une part importante dans l'appréciation des copies.

L'usage des instruments de calcul est autorisé.

PROBLEME 1

Dans une réaction chimique deux substances A et B réagissent pour donner la substance AB.

A l'instant $t = 0$, les concentrations [A], [B] et [AB] sont respectivement a , b et 0.

A un instant t quelconque, ces concentrations sont respectivement $(a - u)$, $(b - u)$ et u .

La vitesse de réaction est proportionnelle au produit [A] [B].

$$v = \frac{du}{dt} = k(a - u)(b - u).$$

$$\text{On sait que } k = k_0 e^{-\frac{E}{RT}}$$

où $R = 8,316$, T est la température, E l'énergie d'activation.

Question 1

On veut déterminer expérimentalement E et k_0 à partir du tableau suivant :

T	250	300	350	400	450
k	1,6	4,6	8,9	14	23

1a. Représenter graphiquement $y = \ln(k)$ en fonction de $x = \frac{1}{T}$ pour T entre 250 et 400.
(\ln désigne la fonction logarithme népérien).

1b. Déterminer par la méthode des moindres carrés l'équation de la droite d'ajustement $y = \alpha x +$

1c. En déduire l'expression de k en fonction de T puis la valeur de E .

Question 2

A température constante, la vitesse de réaction est :

$$v = \frac{du}{dt} = k(a-u)(b-u) \text{ où } k \text{ est constant } (k > 0). \quad (1)$$

On suppose que pour $t=0$ $a=b$ et $u=0$.

2a. Résoudre l'équation différentielle. (1)
Déterminer u en fonction de t .

On donne $k=12$ et $a=0,1$.

2b. Etudier les variations de la fonction u de t pour $0 < t < 500$ et en donner une représentation graphique.

Question 3

Résoudre l'équation différentielle suivante :

$$\frac{E}{R} y - x^2 y' = 0 \text{ où } E \text{ et } R \text{ sont des constantes positives sachant que l'on a } \lim_{x \rightarrow +\infty} y = A.$$

PROBLEME II

140 personnes ont suivi un régime A.

145 personnes ont suivi un régime B.

On a observé les résultats suivants :

Gain de poids (kg)	Effectif	
	Régime A	Régime B
De -1,5 à -1	35	24
De -1 à 0	57	47
De 0 à 1	24	48
De 1 à 1,5	18	26
De 1,5 à 2,5	6	0
Total	140	145

- Calculer la valeur moyenne et l'écart-type des gains de poids correspondant à chacun de ces deux échantillons.
- Estimer la valeur de la moyenne et de l'écart-type d'une population (supposée très grande) d'individus ayant suivi le régime A, ayant suivi le régime B.
Donner un intervalle de confiance de ces moyennes au seuil de risque de 5%.
- Au seuil de risque 0,05, peut-on considérer comme vraie l'hypothèse suivante :
Les gains de poids sont les mêmes pour les deux régimes.

N.B. : On rappelle que si N suit une loi normale centrée réduite, alors $P(|N| \leq 1,96) = 0,95$.

DEUXIEME PARTIE : SCIENCES PHYSIQUES (coef. : 2,5)

Les trois questions sont indépendantes

A - Dosage conductimétrique

1. Etalonnage de la cellule de conductivité

On mesure la résistance R d'une cellule de conductivité plongeant dans une solution de chlorure de potassium de conductivité γ , de concentration $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$

$$\gamma = 1,411.10^{-1} \Omega^{-1} . \text{m}^{-1}$$

$$R = 1417,5 \Omega$$

En déduire la constante géométrique de la cellule.

2. Dosage de l'acide chlorhydrique par la soude

On rappelle que la conductivité γ d'une solution d'électrolytes est donnée par la relation

$$\gamma = \sum \Lambda_i C_i Z_i$$

2. 1. Définir Λ_i , C_i et Z_i

Préciser les unités dans le S. I.

On supposera que les concentrations des solutions sont suffisamment faibles pour que l'on puisse considérer que $\Lambda_i \approx \Lambda_{0i}$

2.2. On prélève 10 ml d'une solution d'acide chlorhydrique à 0,1 mole / litre que l'on dilue cent fois dans un ballon de 1 l.

Calculer la conductivité de la solution ainsi diluée et calculer la conductance de la cellule plongeant dans cette solution.

2.3. A cette solution ainsi diluée, on ajoute x ml de soude à 0,1 mole / litre. On supposera $x \ll 1000$ et, en conséquence, on considérera que le volume global de la solution reste constant et égal à 1000 ml.

Calculer la conductance de la cellule pour :

$$x = 5, 10, 15 \text{ et } 20 \text{ ml.}$$

2.4. Tracer la courbe représentative des variations de la conductance en fonction de x . Commenter.

Données

nature de l'ion	Λ_{0i} à 25 °C
$\text{H}^+ \text{aq}$	$350 \cdot 10^{-4} \text{ SI}$
Cl^-	$76 \cdot 10^{-4}$
Na^+	$50 \cdot 10^{-4}$
OH^-	$198 \cdot 10^{-4}$

87.7

B - Cinétique

On étudie la cinétique de la saponification de l'acétate d'éthyle. Au temps $t = 0$, le milieu réactionnel contient 0,05 mole d'ester et 0,05 mole de soude. La réaction est suivie en prélevant, au temps t , 10 ml du mélange réactionnel et en dosant par \varnothing ml d'acide chlorhydrique de concentration 0,02 mol. l⁻¹.

On obtient les résultats suivants :

t (min)	5	10	15	20	30	50
\varnothing (ml)	21,5	18,9	16,85	15,2	12,65	9,6

1. Ecrire la réaction de saponification.
2. Sachant que cette cinétique est d'ordre 2, démontrer la relation permettant de calculer la constante de vitesse.
3. Calculer la valeur moyenne de cette constante à partir des 6 mesures.
4. Calculer le temps de 1/2 réaction.

C - Chimie organique

1. Le méthyl -1 cyclohexanol (A) traité par H₂ SO₄ concentré à chaud, conduit à un mélange de deux composés B et B'.

- Ecrire le mécanisme de la réaction ainsi que les formules de B et de B'.

- Indiquer le composé prépondérant.

2. L'ozonolyse de B conduit à un seul composé organique C.

- Donner la formule de C.

3. En milieu basique, C subit une réaction spécifique aux dérivés carbonylés. Dans le cas de C, la réaction est intramoléculaire et conduit à une cyclisation.

- Quelles sont les trois possibilités de cyclisation ?

- Ecrire les formules développées des corps dont on peut envisager l'obtention selon ces trois possibilités.

- Préciser le mécanisme en choisissant une réaction.

- En réalité, il ne se forme que 2 composés. Lesquels ? Justifier la réponse.

FRANÇAIS

Durée : 3 h

Coef. : 2

LA VIOLENCE DANS LES STADES

Les sources des phénomènes de hooliganisme dans le football anglais sont à mettre en rapport avec des faits qui touchent aux modifications de la communauté ouvrière, et donc du public du football, ainsi qu'à l'évolution indulte dans la professionnalisation du football. Dans les années 60, on parlait volontiers d'embourgeoisement et d'intégration de la classe ouvrière. En fait, très globalement, l'analyse était pour le moins exagérée. Des travaux récents de Goldthorpe et de quelques autres ont montré que la société anglaise restait coupée en deux, un fils d'ouvrier anglais ayant plus de chances que son homologue français ou suédois de devenir ouvrier. La classe ouvrière reste donc à l'écart mais se transforme sous les effets des modifications du travail, la catégorie de *semi-skilled* vient s'intercaler entre les *skilled* et les *unskilled* (1) sous les effets des politiques d'urbanisme, notamment dans des villes comme Londres (où l'East-End se vide d'une partie de ses habitants traditionnels), enfin sous les effets de la crise, qui provoque le déclin plus ou moins brutal des grandes industries (charbon, sidérurgie, activités portuaires). Enfin, le chômage vient s'ajouter à la déqualification.

10

Ces transformations se sont inscrites dans les tribunes des stades. Depuis 1945, "l'ouvrier de l'abondance", l'ouvrier hautement qualifié, s'est vu offrir par les clubs des tribunes couvertes pour se protéger de la pluie, des sièges et même des coussins, des bars pour la bière d'avant-match et celle de la mi-temps ; en même temps, le prix des places a augmenté. Seules les *terraces*, le *kop*, sont restées ouvertes au vent et à la pluie ; c'est l'endroit où l'on reste debout pendant le match, mais aussi d'où l'on jette des projectiles divers sur les supporters de l'autre camp et d'où l'on insulte le gardien de but de l'équipe adverse. Ce sont les occupants du *kop* qui sont attendus par la police à cheval avec chiens policiers, ce sont les occupants du *kop* qui se déversent sur les villes visitées. Les hooligans sont là.

20

Les analyses portant sur les hooligans convergent sur un certain nombre de points. C'est un phénomène qui touche une population majoritairement jeune, entre 17 et 21 ans. Actuellement se mêlent dans cette sous-culture des *terraces* plusieurs courants :

Pour le premier, qu'on pourrait qualifier de traditionnel, le football est l'occasion de faire revivre quelques valeurs authentiquement prolétariennes comme la bagarre, l'appartenance à une communauté, la bière forte, le culte de la force physique et de la virilité ; ce courant peut être bon enfant et se contenter de parader torse nu en plein hiver, faisant jouer biceps et tatouages et cassant à coups de pied les distributeurs de chocolat pour en offrir aux petits enfants : ce sont les supporters pauvres des clubs du Nord, comme Newcastle ou Sunderland. Ce courant représente les restes d'une culture ouvrière du football, revivant les vieilles rivalités locales ou régionales. S'ils sont arrêtés, c'est plus souvent pour ivresse.

30

Le deuxième courant relèverait d'une forme plus pure de délinquance où le plaisir d'organiser le combat, de ne pas se faire prendre, domine le soutien à l'équipe : un cas récent a été jugé à Cambridge, ville pourtant très éloignée du paysage industriel à la Manchester, où un "général" qui contrôlait plus de 80 "soldats" a été condamné à cinq ans de prison pour avoir organisé la chasse aux supporters adverses.

1. *skilled* correspond aux ouvriers qualifiés, *semi-skilled* aux OS, *unskilled* aux manoeuvres

Enfin, le troisième courant, celui qui serait illustré par les *skinheads*, serait une forme plus activiste de défense des valeurs ouvrières traditionnelles : reprenant la glorification des vertus viriles de la défense du territoire, ils trouvent dans le football et dans les terrasses un lieu idéal pour mettre en scène leurs revendications d'appartenance.

- 40 En se professionnalisant et en s'internationalisant, le football a fait des tribunes et des écrans de télévision un nouvel enjeu. En effet, pendant toute une époque, l'horizon de l'équipe était la région ; avec le passage au niveau national, les contacts se sont élargis et notamment la pratique des transferts de joueurs d'un club à un autre afin de pouvoir augmenter ses chances de victoire en coupe ou en championnat ; lorsque les clubs anglais se sont intégrés aux compétitions européennes, cette adhésion a accéléré la rupture entre l'équipe de foot et son public, quand elle n'obligeait pas certains clubs à mettre la clé sous la porte parce qu'ils ne pouvaient pas suivre le rythme des dépenses. En effet, même si le championnat anglais emploie peu de joueurs étrangers, à la différence des championnats italiens, espagnols ou français, les équipes ont souvent perdu leurs assises locales : les vedettes viennent d'Ecosse, d'Irlande du Nord ou de la région de Londres. Ainsi, le club local n'est plus le moyen de sortir de
- 50 sa condition ; de même, les structures de gestion du club se sont rationalisées avec la création de postes salariés spécialisés : cette "bureaucratization" du football a retiré aux supporters l'influence qu'ils pouvaient avoir sur la vie du club. De plus en plus, les supporters se sont trouvés assignés à cette seule fonction de soutien et relégués, pour les plus démunis d'entre eux, dans les *terraces*. Ce nouvel état du football a en quelque sorte multiplié les occasions d'exhiber son authenticité et ses droits face à ce qui apparaît comme une dépossession : face aux supporters adverses, face à l'équipe dirigeante du club, face aux supporters respectables, mais aussi face à la télévision, à l'Angleterre entière si ce n'est au monde entier à l'occasion de la coupe du monde. D'une authenticité locale ou régionale (être de Millwall), on est passé à une authenticité sociale (être un vrai prolétaire), ou nationale (être anglais), ou encore ethnique (être blanc).

- 60 Les instances du football mondial et européen ont voulu voir dans les événements de Bruxelles un mal spécifiquement anglais, d'où les sanctions sévères contre l'ensemble des clubs anglais engagés dans les compétitions internationales. En fait, le développement de la violence autour des stades est un phénomène universel.

Patrick MIGNON
Esprit, N° 104-105
Août-sept. 1985

Note :

- En juin 1985, des bagarres entre supporters et la panique qui suivit entraînent, au stade du Heysel à Bruxelles, un grand nombre de morts.

QUESTIONS :

- 1- Résumez le texte en 200 mots, avec une marge de tolérance de + ou - 10 %.
Indiquez le nombre de mots utilisés en fin de résumé.
- 2- Expliquez les mots ou expressions suivants :
 - valeurs prolétariennes (ligne 25)
 - authenticité (ligne 54)
- 3- Selon l'auteur, "le développement de la violence autour des stades est un phénomène universel".
Les raisons avancées par l'auteur vous paraissent-elles pouvoir expliquer d'autres formes de violence, dans d'autres domaines ?

BAREME

Question 1 : 8 points

Question 2 : 2 points

Question 3 :10 points

ANGLAIS

Durée : 2 heures

Coef. : 2

FEAR AS A NEW SCIENCE STEPS INTO UNKNOWN

from MARK FRANKLAND in Washington

As the Hanafi Muslims prepared for their assault on Washington last Tuesday, some 30 people in a quiet room at the National Academy of Sciences were discussing whether terrorists might one day use discoveries about DNA, the deoxyribonucleic acid that is the genetic material determining an organism's characteristics, to make a new and awful weapon.

The sort of thing they had in mind were bacteria made toxic by genetic manipulation and released to spread incurable disease. The Harvard professor leading the discussion argued that there seemed little point in such a weapon since there were plenty of naturally deadly bacteria around. But if it was as obvious as that, why, one wondered, was the meeting attended by two lawyers from the Government's Arms Control and Disarmament Agency, two men from the Defence Department, three Army lieutenants and the scientific councillor from the Russian Embassy ?

This link between DNA research and terrorism was just a particularly creepy part of a two-and-a-half-day forum arranged by the National Academy of Sciences on all aspects of research into recombinant DNA (recombinant because genetic modification is achieved by separating and then recombining elements of DNA).

The forum left no doubt of the awesome consequences of this latest scientific triumph, but it also showed that the scientific community, and to a rapidly growing extent the American public too, is split over whether those consequences are likely to be awesomely good or awesomely bad.

Robert SINSHEIMER of the California Institute of Technology told the forum that "science has not taken so large a step into the unknown since Rutherford began to split atoms".

Though the technique of recombining, in other words manipulating, DNA was discovered only in 1972, research is already being done at nearly 100 American universities and research centres and by at least nine private, chiefly pharmaceutical, companies.

The DNA enthusiasts described the promising and in some cases startling progress that has been made. The first ever practical application may be the production of a new sort of vaccine made by reworking the genes of the bacterium *E. coli* which causes the diarrhoea many young cattle and pigs suffer and die from.

Other possibilities are for the better understanding of hereditary and infectious diseases, and of cancer. It may also be possible to use recombinant DNA to make insulin, used in treating diabetics.

There are at least two potentially revolutionary uses for agriculture : the mass production of proteins for animal feed and replacing nitrogen fertiliser with nitrogen-producing genes in crop growing. Given the rising cost of fertilisers made from oil or coal this could have tremendous interest for the poor and underfed countries.

But every time someone came up with an argument in favour of DNA research he was met with two main challenges : Is it safe ? And even if it is safe, is it moral ?

The most obvious safety worry is that man-made genes might infect laboratory workers or escape from the laboratory.

But there are more complex worries. By introducing new genes, Sinsheimer argued last week, man would be "intervening profoundly in the evolutionary process". Man-made genes could touch off dangerous mutations in microbes or viruses that are presently harmless to human and animal life.

The final argument of Sinsheimer and those who think like him is that scientists are not only profoundly ignorant of the consequences of what they are doing but also preparing a technology of such possible power that it would be "fit only for a rational, farsighted, unerring, incorruptible people".

For there is no doubt that the worst potential horror of DNA research is that it brings human genetic engineering, the planned production of certain types of people, very much closer.

Jon Beckwith, a young professor at the Harvard Medical School, who has refused to use recombinant DNA techniques in his laboratory, pointed out that genetic engineering is now, in a sense, being done. People are already being tested for genetic differences and while gene surgery (the insertion of genes into human cells, organs or embryos) is still not possible the odds are that the techniques will be discovered before long.

Behind the moral objection lies a broader, political one. "Biologists" said Sinsheimer, "have become, without wanting it, the custodians of great and terrible power". The problem was how they could share it in anything like the way that conventional political power is divided up under the wisdom of the American Constitution.

There was, too, a pessimism that the logic of discovery could not be beaten. Too many scientific careers were involved. Neither the politicians nor the military would let America pull out while other countries continued. Industry was already deeply interested. The forum itself, it turned out, had been financed one-third by seven pharmaceutical companies.

THE OBSERVER 3/3/1977

- 1) Sum up the passage in French. (200-250 words).
- 2) What is the role of genes ?
- 3) Explain what "recombining DNA" consists in. Why was it such a controversial subject ?

a weapon : une arme. to attend : assister à. a lawyer : un avocat.
creepy : terrifiant. awesome : affreusement. startling : ahurissant.
a custodian : un gardien.

EPREUVE PROFESSIONNELLE DE SYNTHÈSE

A - ETUDE DE PROJET

87.14

Durée : 4 heures

Coef. : 4

Remarques préliminaires :

* L'usage d'un dictionnaire anglais - français est autorisé

* La répartition des points est donnée à titre indicatif.

PRODUCTION D'ACETONE-BUTANOL PAR FERMENTATION

1 - INTERET DE LA PRODUCTION D'ACETONE-BUTANOL PAR FERMENTATION

(4 points)

A partir des documents fournis, dégager l'intérêt de la production d'acétone-butanol par fermentation.

2 - MISE AU POINT D'UN PROCEDE AU LABORATOIRE (11 points)

2.1. Fermentation discontinue sur glucose sans régulation de pH.

On effectue des fermentations discontinues de *Clostridium acetobutylicum* dans un fermenteur de 4 litres de volume utile.

2.1.1. Dosage du substrat et des produits de fermentation.

Proposer la méthode la plus appropriée au dosage du substrat (glucose) et des produits au cours de la fermentation.

Indiquer les grandes lignes de sa mise en oeuvre (mode opératoire exclu) dans le contexte considéré.

Préciser l'allure des enregistrements susceptibles d'être obtenus.

2.1.2. Les divers temps de la fermentation.

A partir de l'analyse des documents 2 et 3, déterminer :

- les divers temps de la fermentation,
- le taux de croissance néperien pour chacune de ces phases.

2.1.3. Influence des métabolites.

A partir du document 4, analyser rapidement l'influence de l'acétone, l'acide acétique, l'acide butyrique, l'éthanol et le butanol sur la croissance.

En déduire les métabolites dont l'effet est à prendre en compte durant la fermentation.

2.2 Fermentation discontinue sur glucose avec régulation de pH.

2.2.1. A partir de l'étude des documents 4 et 5 :

- dégager l'influence du pH sur la fermentation,

- déterminer l'intérêt d'une régulation du pH et indiquer les conditions de pH les plus propices à une production d'acétone-butanol.

2.2.2. Au vu des résultats précédents, indiquer comment accroître la productivité.

3 - PROCEDE AU NIVEAU INDUSTRIEL (5 points)

- 3.1. La production au niveau industriel nécessite en plus des fermenteurs, un certain nombre d'installations annexes.
Préciser la nature et le rôle de celles-ci.
Faire un schéma de l'ensemble de l'installation.
- 3.2. Dans le contexte français, quelles sont les matières premières susceptibles d'être utilisées comme substrat ?
Quelles sont les études complémentaires à effectuer :
- à l'échelle du laboratoire,
- à l'échelle industrielle,
avant de réaliser une mise en oeuvre industrielle ?
- 3.3. Dans le contexte économique actuel, une telle production a-t-elle une chance de voir le jour, en France et en Europe, dans les cinq ans à venir ? Justifier rapidement la réponse.

Documents joints :

Document 1 : Extrait de "Comprehensive Biotechnology" The Principles, Applications and Regulations of Biotechnology in Industry, Agriculture and Medicine. Editor in chief Murray Moo-Young - Volume 3 915-919 - Pergamon Press 1986.

Document 2, 3 : Thèse INPL de Michel Finck, Ingénieur INSA TOULOUSE "Etude de la fermentation acétonobutylique".

Document 2 : p. 63

Document 3 : p. 71

Document 4 : p. 22, 23 et 24

Document 5 : p. 25

DOCUMENT 1

Page 1/4

Acetone and Butanol

J. C. LINDEN, A. R. MOREIRA and T. G. LENZ
Colorado State University, Fort Collins, CO, USA

1 INTRODUCTION

1.1 History

The acetone-butanol fermentation has a long history as a successful industrial fermentation process. The earliest work on this fermentation was performed by Pasteur in 1862, who investigated the production of butanol from lactic acid and calcium lactate (Compere and Griffith, 1979). Prazmowski proposed the name of 'clostridium' for these anaerobic spore formers that produced butanol, resulting in the genus *Clostridium* (Buchanan and Gibbons, 1974).

The fact that acetone was also a fermentation product was not known until Schardinger made the discovery in 1905 (Underkoller and Hickey, 1954). The interest in commercializing the process began in 1909 in England primarily as a means to obtain butadiene as raw material for syn-

thetic rubber. Strange and Graham Ltd., obtained the services of Perkin, Weizmann, Fernback, Schön and others to study the problems associated with this process (Prescott and Dunn, 1959). After considerable investigation, it was decided that butadiene was a most desirable raw material for synthetic rubber, and this diene could be produced from butanol. In 1912, Weizmann broke from the group, but continued to study the fermentation independently. After about two years, he found an organism which he called *Clostridium acetobutylicum* which successfully fermented starchy grains to produce acetone, butanol and ethanol. He applied for patents on the process and British Patent 4845 (1915) and US Patent 1 315 585 (1919) were issued (Shreve, 1967).

With the outbreak of World War I in 1914, the production of acetone was of great interest to the UK for the manufacture of cordite, the explosive used in naval warfare. Strange and Graham Ltd. was contracted to produce acetone, but their process was unsuccessful until Weizmann was placed in charge of the plant and installed his process. Because of the shortage of corn in Britain the process was transferred in August 1916 to Canada where it operated until 1918 (Prescott and Dunn, 1959). Shortly after the United States entered the war, the Weizmann process was operated at Terre Haute, Indiana, for acetone production. Considerable quantities of acetone were produced, along with twice as much butanol. The storage and disposal of the butanol presented a problem for some time. It was shortly after the war that E. I. DuPont de Nemours and Company developed nitrocellulose lacquers for the automobile industry and it was found that butyl acetate, derived from butanol, was the solvent of choice for this coating system (Steel, 1958). During 1940, over 45×10^6 and 90×10^6 kg of butanol and acetone, respectively, were produced (Shreve, 1967). However, changes in the availability of carbohydrate feedstocks, problems which developed with plague infestation, and the availability of inexpensive petrochemicals in the 1950s, caused a decrease in the production of acetone and butanol by fermentation. It was estimated in 1965 that only 5% of the acetone and 10% of the butanol produced in the world were obtained by fermentation (Faith *et al.*, 1965). Former producers by fermentation in the United States that ceased operation during the 1950s included Commercial Solvents Corp., Terre Haute, IN; Publiker Industries, Inc., Philadelphia, PA; US Industrial Chemicals Co., New York, NY; and Western Condensing Co., Adell, WI. Production by fermentation was abandoned during the 1960s in Japan (Peppler, 1967).

Abstracts reporting activities in the acetone-butanol fermentation of beet molasses in the Soviet Union continued to appear throughout the 1970s. Commercialized production is still carried out by the fermentation of cane molasses in South Africa (Spivey, 1978).

... / ...

DOCUMENT 1

Page 2/4

1.2 Current Production and Uses

Currently, butanol is manufactured from ethylene and triethylaluminum and is used primarily in the manufacture of lacquers, rayon, detergents, brake fluids and amines for gasoline additives. It can also be used as a solvent for fats, waxes, resins, shellac and varnish. Acetone is a by-product from the manufacture of phenol from cumene, a by-product of oxidation cracking of propane, or can be manufactured by chemical reduction of isopropanol. Acetone is used mostly as a solvent for fats, oils, waxes, resins, rubber plastics, lacquers, varnishes and rubber cements.

1.3 Proposed Uses

The acetone-butanol fermentation currently has potential because butanol has many characteristics which make it a better liquid fuel extender than ethanol, now used in the formulation of gasohol. Three of the more important characteristics which make butanol a better liquid fuel extender are: (1) its low vapor pressure, (2) its low miscibility with water and (3) butanol, unlike ethanol, is completely miscible with diesel fuel even at low temperatures (see Table 1).

Although economically attractive when based on waste-type materials such as cheese whey (Lenz and Moreira, 1980), the acetone-butanol fermentation has a number of drawbacks which must be addressed before any attempt for commercial production is made. The major one is the very low levels of acetone and *n*-butanol obtained in the final fermentation broth. With current technology, such levels are only 0.7 and 1.4% (w/v), respectively. This results in the need for large vessels for fermentation and an energy-intensive distillation recovery of the solvents. Sterilization of large volumes of media is also highly energy intensive. Additional difficulties with this fermentation include the need for strict anaerobic conditions and delicate culture maintenance and propagation.

Table 1 Characteristics of Chemically Pure Fuels

Fuel	Molecular weight	Specific gravity	Boiling point (°C)	Vapor pressure at 37.7°C (p.s.i.)	Combustion energy (kJ kg ⁻¹)	Latent heat (kJ kg ⁻¹)	Solubility (parts in 100 parts H ₂ O)	Stoichiometric air-fuel ratio
Methanol	32	0.79	65	4.6	23 864.8	1170.0	∞	6.5
Ethanol	46	0.79	78	2.2	30 610.6	921.1	∞	9
Butanol	74	0.81	117	0.3	36 681.0	432.6	9	11.2
Octane	114	0.70	210	1.72	48 264.5	360.5	insoluble	15.2
Hexadecane	240	0.79	287	3.46	47 264.3	—	insoluble	15

2 FERMENTATIVE PRODUCTION

The organism *Clostridium acetobutylicum* will ferment a variety of carbohydrates such as lactose, glucose, xylose, fructose, arabinose, galactose, maltose, mannose, starch and sucrose (Buchanan and Gibbons, 1974), and produce a variety of organic solvents including butyric and acetic acids, butanol, acetone, ethanol, carbon dioxide, hydrogen, isopropanol, formic acid, acetone (acetylmethylcarbinol or 3-hydroxy-2-butanone) and a yellow oil, which is a complex mixture of higher alcohols, higher acids and esters (Stanier *et al.*, 1976). Butanol, acetone and ethanol are normally considered to be the principal products of this fermentation.

2.1 Raw Materials

... / ...

DOCUMENT 1

Page 3/4

2.1.1 Starch

The production of acetone and butanol by the Weizmann process utilized starch as substrate (Beech, 1953). *C. acetobutylicum* (Weizmann) possessed amylolytic and saccharolytic enzyme activities required to hydrolyze gelatinized starch to glucose and maltose. Concentrations of corn of 8 to 10% (5 to 6.5% starch) were readily utilized; average solvent yields of 38.0%, based on sugar fermented were reported. Wheat, milo and rye served equally well. Potatoes could not be handled at high concentrations because of viscosity problems. Normally, the germ and bran were removed from the grains prior to milling in order to recover these valuable by-products. The grain mash was first gelatinized for 20 min at 65 °C and then sterilized for 60 min at 102 °C. This cooked mash was cooled by means of double-pipe heat exchangers to 35 °C as it was pumped through steam-sterilized lines to fermenters of 250 000–2 000 000 l capacity. The fermenter was inoculated either during or after the filling process with 3% (v/v) inoculum from a 24 hour culture tank. In some cases, 30 to 40% of the total aqueous volume of the mash was provided by stillage from which neutral fermentation solvents from previous fermentations had been stripped. This so-called slopping-back procedure added certain nutrients to the medium which increased yield, aided in foam control and reduced the amount of stillage which required evaporation and drying for feed supplement preparations.

The fermentations which lasted 2 to 2.5 days, passed through three phases. The first was characterized by rapid growth, production of acetic and butyric acids, and evolution of carbon dioxide and hydrogen, primarily the latter. The pH, initially 6.0 to 6.5, decreased during this phase to a constant value determined by the particular buffering capacity of the substrate and medium. The 'titratable acidity' however increased to a maximum which defined the end of the first phase. The second phase, called the acid break, began with a sharp decrease in the 'titratable acidity' after 12 to 14 hours. The organisms had begun to convert the acidic products to neutral solvents. Gas production increased, a greater proportion being carbon dioxide than in the earlier phase of the fermentation. During the third phase, the rates of gas and solvent production decreased until the cells autolyzed. The corn substrate fermentation ended at between pH 4.2 and 4.4.

2.1.2 Molasses

Beech (1952) described the use of a variety of other *Clostridium* species used for fermentation of sugar in molasses. The fermentation process was similar to that described above for starch

except that the mash could be sterilized at a lower temperature, the fermentation was conducted at 31 to 32 °C, cleaning of tanks and lines was easier, higher concentrations of sugars could be used and a greater ratio of butanol to acetone plus ethanol was produced. It was necessary to add nitrogen and phosphate nutrients to molasses fermentations (e.g. 1.0 to 1.4% ammonia based on sugar present). The ammonia was usually added to maintain the pH at 5.6 after the 'titratable acidity' dropped the pH from an initial value of 6.5 during the first 16 hours of fermentation. The molasses production medium contained 6% sugar calculated as sucrose; average solvent yields of 30.0% were reported (Beech, 1952). Shin *et al.* (1982) have reported successful fermentation of sorghum molasses to produce acetone and butanol.

2.1.3 Cheese whey

Since *C. acetobutylicum* had the capability of metabolizing lactose, it was possible to utilize cheese whey as a feedstock for the acetone-butanol fermentations. Cheese whey, the fluid which remains following separation of the curd when converting milk into cheese, contains about 6% lactose by weight and in the order of 1% protein, depending on the type of cheese manufacture. The level of sugar in cheese whey coincided with that required in the medium for the acetone-butanol fermentation. Cheese whey preparations from which approximately 75% of the protein was removed by simple heat denaturation, acidification or ultrafiltration have proven to be suitable fermentation substrates.

The fermentation of lactose in cheese whey produced some interesting modifications in the product distribution and yield (Lindberg and Morcira, 1982a). The classical solvent ratio produced by *C. acetobutylicum* from corn mash was 2 to 1 butanol to acetone. With pure glucose as substrate, a ratio of 2.7 to 1 was obtained. Under the same conditions, substitution of lactose for glucose resulted in a product stream in which the relative proportion of butanol to acetone was 2.9 to 1. The fermentation of cheese whey resulted in a strikingly different set of product concentration profiles. For instance, the normal intermediary build-up of acetic and butyric acid was not

... / ...

DOCUMENT 1

Page 4/4

observed and the final ratio of butanol to acetone was 9.7 to 1. Maddox (1980) also reported a 10 to 1 butanol to acetone ratio in fermentation of an ultrafiltrate of cheese whey. However, Lindberg and Moreira (1982b) reported that fermentations on cheese whey from which 80% of the protein was removed by heat precipitation and ultrafiltration yielded butanol to acetone ratios of 12.3 to 1 at 37 °C and 20.6 to 1 at 33 °C. Compere and Griffith (1979) also obtained 10 to 1 ratios of butanol to acetone with ultrafiltered cheese whey, using one particular strain of *C. acetobutylicum*, but that result was not consistent under all experimental conditions. The dependence of product distribution on micronutrient components will be discussed below in Section 4.1.1.

2.1.4 Jerusalem artichoke

An assortment of raw materials such as beet molasses, wheat, rice, horse chestnuts, potatoes and Jerusalem artichokes, have also been used in this fermentation. Wendland, Fulmer and Underkofler (1941) studied the acetone-butanol fermentation with Jerusalem artichoke. The French government was recently making a concerted effort to produce quantities of butanol for emergency fuel purposes from Jerusalem artichokes. The potential for utilizing not only fructose from tuber-derived inulin, but also the structural carbohydrates in the vegetative stalk of the plant has been investigated (Linden *et al.*, 1982). Until anthesis, the inulin content of the stalk and leaves is greater than that of the tubers. The protein content of the leaves is great enough to offer substantial by-product credit from extracted leaf protein. Butanol to acetone ratios of 2.75 to 1 (w/w) from acid hydrolyzed inulin from Jerusalem artichoke tubers have been obtained.

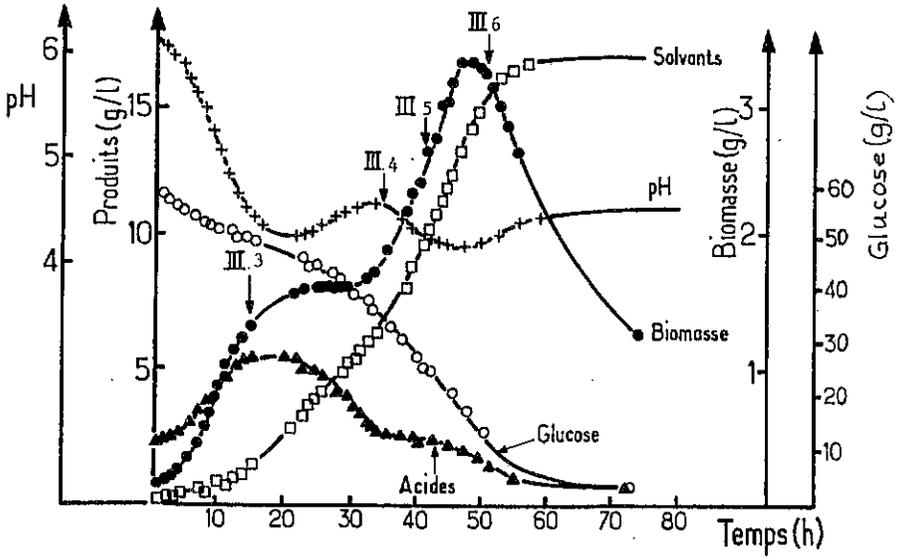
2.1.5 Lignocellulosic hydrolysates

C. acetobutylicum can anaerobically ferment different carbohydrates into a spectrum of products including *n*-butanol, acetone, ethanol, butyric acid, acetic acid and acetoin. Hydrolysates of lignocellulosics, *i.e.* wood, paper, crop residues, *etc.*, primarily contain glucose and cellobiose as well as galactose, mannose and the pentose sugars such as *D*-xylose and *L*-arabinose, from the hemicellulose fraction. Glucose, cellobiose, mannose and arabinose have been shown to be fermentable (Yu and Saddler, 1983). Galactose and xylose were utilized poorly and primarily yielded acids. Mes-Hartree and Saddler (1982) also noted that under the conditions of their study, better solvent production was obtained from sugars arising from the *erythro* configuration (glucose, mannose, arabinose) as compared to the *threo* configuration (xylose, galactose).

Compere and Griffiths (1979) have shown that widely varying product yields were obtained when different substrate concentrations of xylose and arabinose were used. Yu and Saddler (1983) reported a significant increase in acetone and butanol production occurred when *C. acetobutylicum* was grown on *D*-xylose in the presence of 1 g l⁻¹ acetic acid or 3 g l⁻¹ butyric acid added prior to inoculations. Saddler *et al.* (1983) reported very low conversion rates of the pentose fraction from steam exploded aspen wood by *C. acetobutylicum*, but this may have been due to the extreme sensitivity of the organism to furfurals (Langlykke *et al.*, 1948). Langlykke *et al.* (1948) reported an average of 30.6% yield, based on sugar fermented, of solvents with normal product distribution when fermenting corn cob saccharification liquors, composed primarily of xylose, with *C. butylicum* (NRRL 594). Wiley *et al.* (1941) also reported similar product ratios and yield using *C. butylicum* for the production of acetone and butanol from the wood sugars in waste sulfite liquor which is primarily xylose, following lignin precipitation with calcium ions. Xylose utilization by *C. acetobutylicum* was also shown to be improved with concentrations of up to 10 g l⁻¹ calcium carbonate by Mes-Hartree and Saddler (1982).

... / ...

DOCUMENT 2



: Fermentation discontinue de Clostridium acetobutylicum
 évolution des concentrations en fonction du temps

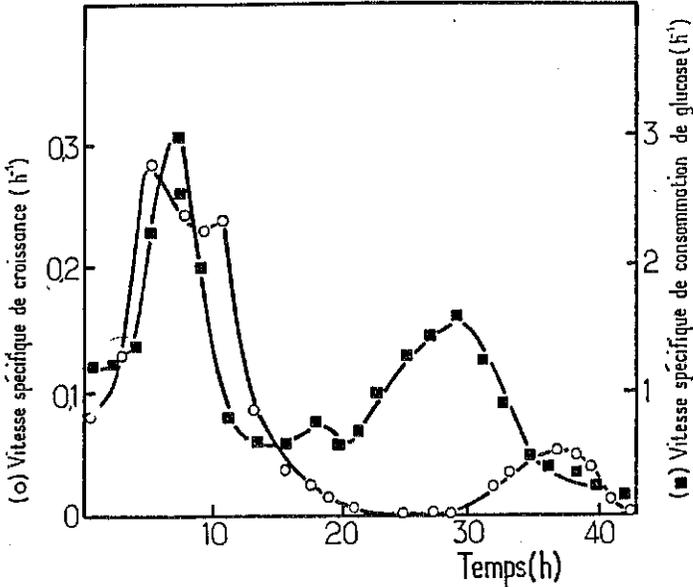
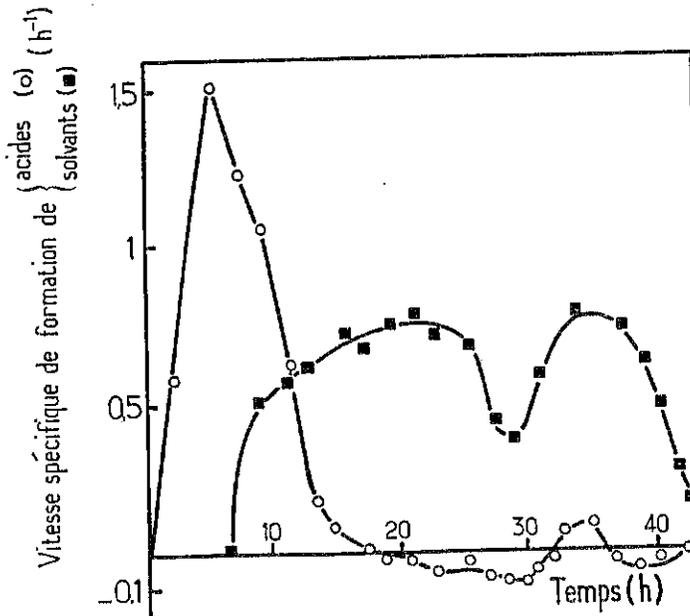


Figure III-9 : Evolution des vitesses spécifiques de croissance et de consommation de glucose en fonction du temps lors d'une fermentation discontinue sans régulation de pH.

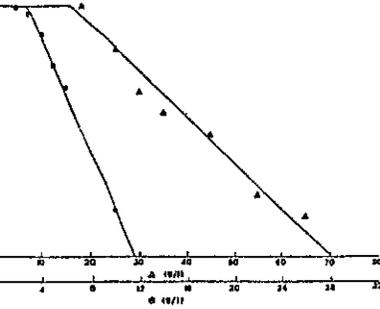


: Evolution des vitesses spécifiques de formation des acides et des solvants en fonction du temps lors d'une fermentation discontinue sans régulation de pH.

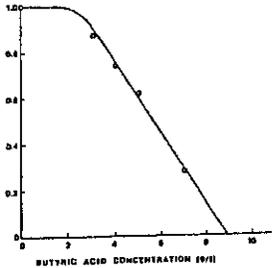
DOCUMENT 4

page 1/2

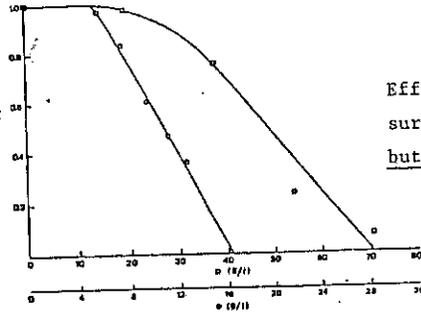
Effet de l'ajout d'acétone (▲) et d'acide acétique (●) sur la vitesse spécifique de croissance de Cl. acetobutylicum



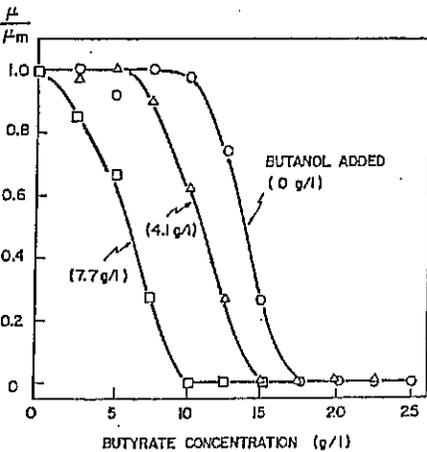
Effet de l'ajout d'acide butyrique sur la vitesse spécifique de croissance de Cl. acetobutylicum



Effet de l'ajout d'éthanol (■) et de butanol (○) sur la vitesse spécifique de croissance de Cl. acetobutylicum

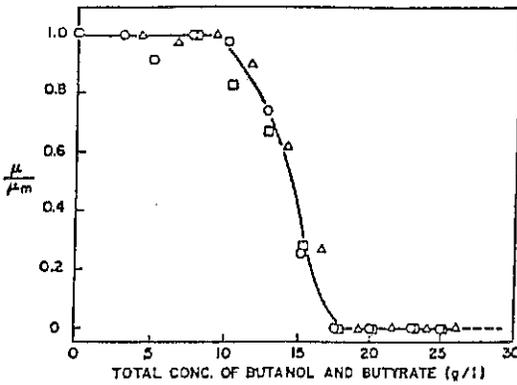


Effet du butyrate et du butyrate + butanol sur la vitesse spécifique de croissance de Cl. acetobutylicum



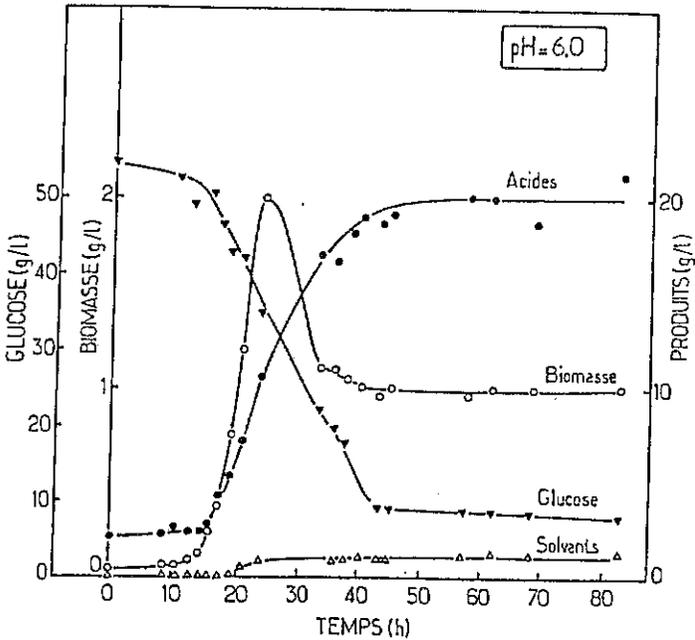
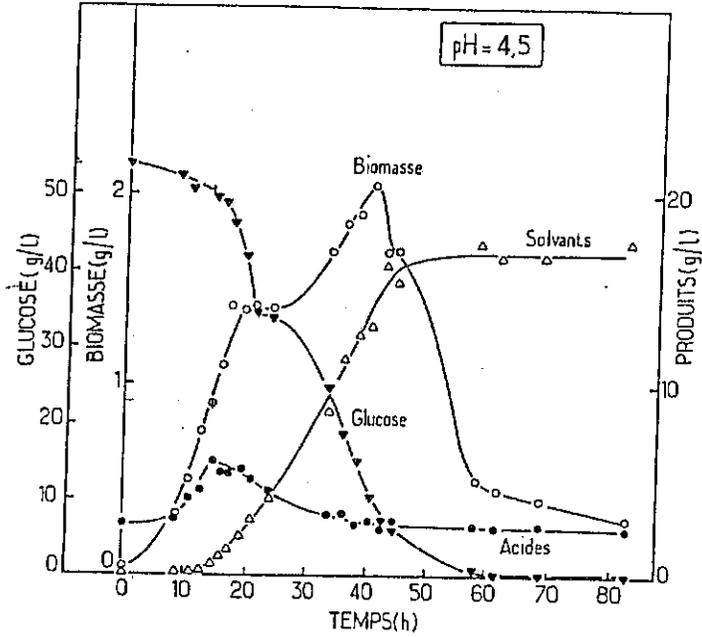
DOCUMENT 4

page 2/2



Effet cumulé du butyrate et du butanol sur la vitesse spécifique de croissance de Gl. acetobutylicum

DOCUMENT 5



Comparaison des fermentations de *Cl. acetobutylicum*
à pH 4,5 et à pH 6,0

EPREUVE PROFESSIONNELLE DE SYNTHESE

B - REALISATION PRATIQUE D'OPERATIONS DE GENIE BIOLOGIQUE

SUJET 1

Durée totale : 8 h

Coef. : 8

PREMIER JOUR (Durée : 7 h + 1 h pour repas pris sur place)

ETUDE EXPERIMENTALE D'UN LACTOBACILLUS

On se propose de déterminer différentes propriétés physiologiques d'un *Lactobacillus*, utilisé en mélange dans un ferment lactique.

N.B. — Le point III est l'objet d'une question tirée au sort selon un ordre et un horaire à fixer en début de séance.

I. CROISSANCE ET ACIDIFICATION DES MILIEUX DE CULTURE

1) Suivi de la croissance par turbidimétrie

- Ensemencer un milieu MRS à 10 %, en fiole d'Erlenmeyer, avec une préculture de la souche dans le même milieu.
- Incuber à la température indiquée, dans un bain thermostaté faiblement agité, jusqu'à la phase stationnaire de croissance.
- Suivre la croissance au spectrophotomètre à 600 nm par prélèvements aseptiques. Réaliser une mesure environ toutes les 30 minutes.
- On demande de tenir compte de la linéarité des appareils qui sera indiquée au début des travaux pratiques.
- Arrêter la croissance dans la cuve par une goutte de formaldéhyde.

2) Suivi de l'acidification par dosage UV de l'acide lactique produit

- Réaliser 6 dosages d'acide lactique pendant la croissance en suivant le mode opératoire du test UV Boehringer à 340 nm (voir document joint).
- Ne pas effectuer de déprotéinisation.
- Déterminer les concentrations en acide lactique par comparaison avec un standard à 1 ml d'acide lactique pur par litre (densité de l'acide lactique 1,24) utilisé non dilué (un seul essai).

3) Exploitation des résultats

- a - Déterminer la vitesse spécifique de croissance (ou taux de croissance népérien), le temps de génération, la productivité volumique horaire maximale, et totale en acide lactique.
- b - Calculer la concentration résiduelle en glucose après 2 heures de phase exponentielle de croissance.

Données :

- rendement de croissance du *Lactobacillus* par rapport au glucose = 12 %,
- rendement de conversion du glucose en acide lactique = 35 %,
- concentration initiale en glucose du milieu = 20 g.l^{-1} ,
- coefficient de correspondance absorbance - masse sèche de bactéries : indiqué pour les appareils utilisés.

II. SENSIBILITE DU LACTOBACILLUS AUX PHAGES

On titre les phages du lactosérum provenant d'une cuve dans laquelle le *Lactobacillus* étudié est contaminé.

A - Réalisation d'une numération des bactériophages par la méthode des plages de lyse

- Réaliser 4 dilutions décimales du lactosérum (indiquées par l'examineur).
- Dans un tube à hémolyse, mélanger :
0,1 ml de lactosérum ou de ses dilutions,
0,1 ml de la souche de « *Lactobacillus* » distribué spécialement.
- Laisser 10 minutes à 37°C .
- Ajouter 5 ml de gélose demi-molle et homogénéiser.
- Couler à la surface d'une gélose vierge.
- ensemencer deux boîtes par dilution.
- Réaliser des témoins.
- Incuber les boîtes retournées une nuit à 37°C .

B - Détection immunologique des contaminants viraux

Les contaminants viraux doivent être détectés rapidement, aussi le laboratoire a-t-il décidé d'utiliser des méthodes immunologiques.

Pour cela, un lapin a été hyperimmunisé contre les protéines capsidales, et son sérum brut ainsi que deux fractions I et II obtenues par immuno-adsorption sont à tester par méthode E.L.I.S.A. directe.

1) Mode opératoire

- La plaque fournie a été traitée selon les indications suivantes :
 - dépôt de 200 μ l de solution antigénique dans tous les puits des 6 premières lignes sauf dans le premier puits de chaque ligne (colonne 1); incubation : 1 h à 37°C, 12 h à 4°C.
 - dépôt de 200 μ l de solution de SAB dans tous les puits; incubation : 1 h à 37°C, 12 h à 4°C.
- Dans les lignes A et B, tester le sérum brut dilué en PBS au 1/10^e.
- Dans les lignes C et D, tester la fraction I diluée en PBS au 1/10^e.
- Dans les lignes E et F, tester la fraction II diluée en PBS au 1/10^e.
- Préparer des dilutions en PBS, de 2 en 2, des échantillons fournis déjà dilués au 1/10^e.
- Prévoir tous les témoins nécessaires, si possible dans le premier puits de chaque ligne. Pour ces témoins, le réactif contrôlé sera remplacé par du tampon de dilution.
- Vider la plaque par retournement, la sécher par tapotement sur un tapis de papier filtre. La rincer au PBS additionné de tween 20, puis au PBS pur.
- Mettre dans un puits 100 μ l de l'échantillon dilué au 1/10^e; dans le puits suivant 100 μ l de la dilution au 1/20^e; dans le puits suivant 100 μ l de la dilution au 1/40^e; etc...
- Incuber 1 heure à 37°C.
- Vider, laver la plaque 2 fois au PBS pur.
- Ajouter dans chaque puits 100 μ l d'une dilution en PBS d'un sérum antiglobuline de lapin marquée à la phosphatase alcaline.
- Incuber 1 heure à 37°C.
- Vider, laver deux fois au PBS pur.
- Ajouter dans tous les puits 200 μ l d'une solution de PNPP en tampon alcalin.
- Incuber 30 minutes à 37°C.
- Arrêter la réaction par addition de 100 μ l de soude à 1 mole.l⁻¹. La coloration est stable pendant plusieurs heures. Conserver les plaques à 4°C en attendant la lecture.
- Lire les absorbances des puits à 410 nm.

2) Résultats

- Quels témoins ont été réalisés ? Pourquoi ? Comment les interpréter ?
- Donner le tableau des absorbances pour chaque puits. Tracer les courbes de variation d'absorbance à 410 nm en fonction de la dilution.
- Prendre comme valeur du titre l'inverse de la dilution qui donne une absorbance égale à la moitié de l'absorbance maximale obtenue avec le sérum brut.
- Donner les titres du sérum brut et des fractions I et II.

III. DEMONSTRATION D'OPERATIONS INTERVENANT DANS LA MISE EN OEUVRE D'UN FERMENTEUR PILOTE

Question tirée au sort, selon l'ordre et l'heure prévus et annoncés en début de séance.

- Temps de préparation \approx 5 minutes.
- Temps d'interrogation et de réponse \approx 10 minutes.

Document joint : Protocole test UV Lactate Boehringer.

Test-Combination Lactate

Méthode entièrement enzymatique

Test UV
Réf. 266 773 pour 3 x 100 ml

Mode opératoire pour le dosage sans déproteïnisation:

Réactif auxiliaire:

Fluorure/EDTA Réf. 243 710

Méthode

Modif selon F. Neff dans H. U. Bergmeyer.
Méthode der enzymatischen Analyse, 3. edition tome II, Verlag
Chemie, Weinheim, 1974, p. 1521

Code S.F.B.C.: A1

Principe

L-lactate + NAD⁺ LDH, pyruvate + NADH + H⁺
Pyruvate + L-glutamate, GP1, L-alanine + 4-cétoglutarate

Valeurs usuelles dans le plasma

57-220 mg/l ou 5,7-22 mg/100 ml ou 0,63-2,44 mmol/l
Béckmayer, Kuhnle, H. F. et coll., *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 15 (1977) 171

Valeurs usuelles dans le liquide céphalo-rachidien

108-189 mg/l ou 10,8-18,9 mg/100 ml ou 1,2-2,1 mmol/l
Béckmayer, Kuhnle, T. O. et coll., *Dtsch. med. Wochschr.* 104 (1979) 453

Echantillon

Plasma (cf. préparation de l'échantillon), liquide céphalo-rachidien

Réactifs

- 1 NAD
- 2 Tampon Tampon carbonate L-glutamate
- 3 LDH/GPT
- 4 (NH₄)₂SO₄ Sulfate d'ammonium

Concentrations des solutions, prétes / emploi:

Solution réactionnelle: 0,5 mol/l, pH 10,0; L-glutamate: 63 mmol/l;
NAD: 4,8 mmol/l
Suspension 3: LDH: 1632 U/ml; GPT: 102 U/ml
Solution 4: Sulfate d'ammonium: 3,2 mol/l

Contrôle de qualité

Domaine de la normale: Précapath U, Précapath S
Domaine pathologique: Précapath U, Précapath S
Pour le contrôle de la précision: Précapath-UTX

- 1 **Préparation et conservation des solutions**
Dissoudre le contenu d'un flacon avec 25 ml d'eau distillé.
Concentration: trois semaines; entre + 2 et + 8 °C.
- 2 **Utiliser le contenu sans diluer.**
Conserver, entre + 2 et + 8 °C jusqu'à la date de péremption indiquée.

Solution réactionnelle

Nombre de doses env.	Solution 1		Solution 2	
	ml	ml	ml	ml
3	3	3	12	
5	5	5	20	
10	10	10	40	
20	20	20	80	

La solution réactionnelle doit être utilisée immédiatement ou être placée au réfrigérateur.
Conservation: six heures entre + 2 et + 8 °C.

3 et 4

Le contenu est prêt à l'emploi.
Conservation: entre + 2 et + 8 °C jusqu'à la date de péremption indiquée.

Préparation de l'échantillon

Le caroté doit être placé que pendant un court instant (max. 30 sec.) avant le prélèvement du sang veineux.
Pour l'obtention du plasma, mélanger env. 2 ml de sang avec 2 gouttes de fluorure/EDTA (env. 80 µl), centrifuger env. 5 minutes à 3000 tours/min dans les 2 heures qui suivent et décanter le plasma.
Conservation dans le plasma décanter: six jours à + 4 °C, trois jours entre + 15 et + 25 °C.
Utiliser le liquide céphalo-rachidien tel quai.

Conservation:

24 heures à + 4 °C
trois heures entre + 15 et + 25 °C
au minimum un mois à 20 °C

Mode opératoire pour la mesure à la longueur d'onde 365 nm

Cuve: 1 cm d'épaisseur
Température d'incubation: 20-25 °C
Mesurer contre l'air (réaction d'extinction).
Introduire dans des tubes à essais:

Introduire dans des tubes à essais:		Témoins-essais (TE)		Essai
Solution réactionnelle	5,0 ml			
Plasma ou L.C.R.	0,1 ml			
Bien mélanger.				
Prélever du tube témoin-essai				2,50 ml
Suspension 3				0,05 ml
Solution 4	0,05 ml			
Mélanger immédiatement; après 10-15 min, lire l'une après l'autre, dans la même cuve l'extinction du témoin-essai (E ₁) et l'extinction du l'essai (E ₂); ΔE = E ₂ - E ₁ .				

*Remettre le liquide restant dans la pipette dans le tube témoin-essai

Rincer préalablement la cuve à videage ou à circulation, après chaque mesure, avec le témoin-essai de l'échantillon suivant.

Limite de dilution

Dans le cas de concentrations plus élevées, mélanger 0,1 ml d'échantillon avec 0,5 ml d'eau distillée et relaire le dosage: résultat x 6

Calcul

Obtenir la concentration (C) en lactate dans le plasma ou le liquide céphalo-rachidien à partir des formules suivantes:

Longueur d'onde	C (mg/l)	C (mg/100 ml)	C (mmol/l)
Hg 365 nm	137,9 x ΔE	13,79 x ΔE	15,3 x ΔE

Mode opératoire pour la mesure aux longueurs d'onde 340 nm et Hg 334 nm

Cuve: 1 cm d'épaisseur
Température d'incubation: 20-25 °C
Mesurer contre l'air (réaction d'extinction).
Introduire dans des tubes à essais:

Introduire dans des tubes à essais:		Témoins-essais (TE)		Essai
Solution réactionnelle	5,0 ml			
Plasma ou L.C.R.	0,05 ml			
Bien mélanger.				
Prélever du tube témoin-essai				2,50 ml
Suspension 3				0,05 ml
Solution 4	0,05 ml			
Mélanger immédiatement; après 10-15 min, lire l'une après l'autre, dans la même cuve l'extinction du témoin-essai (E ₁) et l'extinction du l'essai (E ₂); ΔE = E ₂ - E ₁ .				

*Remettre le liquide restant dans la pipette dans le tube témoin-essai.

Rincer préalablement la cuve à videage ou à circulation, après chaque mesure, avec le témoin-essai de l'échantillon suivant.

Limite de dilution

Hg 334 nm/340 nm: 1750 mg/100 ml ou 17,5 mmol/l.
Dans le cas de concentrations plus élevées, diluer 0,1 ml d'échantillon avec 0,5 ml d'eau distillée et relaire le dosage: résultat x 6.

Calcul

Obtenir la concentration (C) en lactate dans le plasma ou le liquide céphalo-rachidien à partir des formules suivantes:

Longueur d'onde	C (mg/l)	C (mg/100 ml)	C (mmol/l)
Hg 334 nm	147,3 x ΔE	14,73 x ΔE	16,7 x ΔE
Hg 340 nm	150,1 x ΔE	15,01 x ΔE	16,7 x ΔE

Remarques

Pour les dosages isolés remplacer, dans le mode opératoire, les 5 ml de solution réactionnelle par 1,0 ml de solution 1 et 4,0 ml de solution 2. Il est pas tenu compte de la dilution de l'échantillon par 2 gouttes de fluorure/EDTA (env. 80 µl) dans les facteurs de calcul, elle peut être négligée en routine.
La cuve peut renfermer des quantités importantes de lactate; il est impératif de ne pas toucher avec les doigts les extrémités des pipettes, les spatules en plastique et les bouchons qui arrivent au contact du mélange réactionnel.
La solution 2 contient de l'azote de sodium comme conservateur. Ne pas stocker. Éviter le contact avec la peau et les muqueuses.

Distributeur en France

Boehringer Mannheim France SA, 35940 Meylan



Boehringer Mannheim GmbH
Diagnostica

ETUDE EXPERIMENTALE D'UN LACTOBACILLUS (suite)

— LECTURE DE RESULTATS ET REPONSES AUX QUESTIONS —

I. SENSIBILITE DU LACTOBACILLUS AUX PHAGES

A - Numération des bactériophages

- 1) Le Lactobacillus utilisé dans le ferment lactique est-il sensible aux phages du lactosérum contaminé ? Justifier la réponse.
- 2) Quel est le niveau de contamination du lactosérum par les phages révélés lors de cette expérience ?
- 3) Qu'apporterait la réalisation du même titrage vis-à-vis des autres souches industrielles de bactéries lactiques utilisées en mélange.

B - Détection immunologique des contaminants viraux

Le sérum de lapin a été purifié par Immunoabsorption : 1 ml de sérum a été passé sur une colonne de sépharose dans laquelle ont été immobilisées des protéines capsidales. Après 24 heures d'incubation, une première élution est effectuée avec du PBS. Des fractions de 2 ml sont recueillies et leur absorbance est lue à 280 nm. Les fractions dont l'absorbance est supérieure à 0,05 unités sont rassemblées et reconcentrées puis dialysées. Le volume final est de 1 ml : c'est la fraction I.

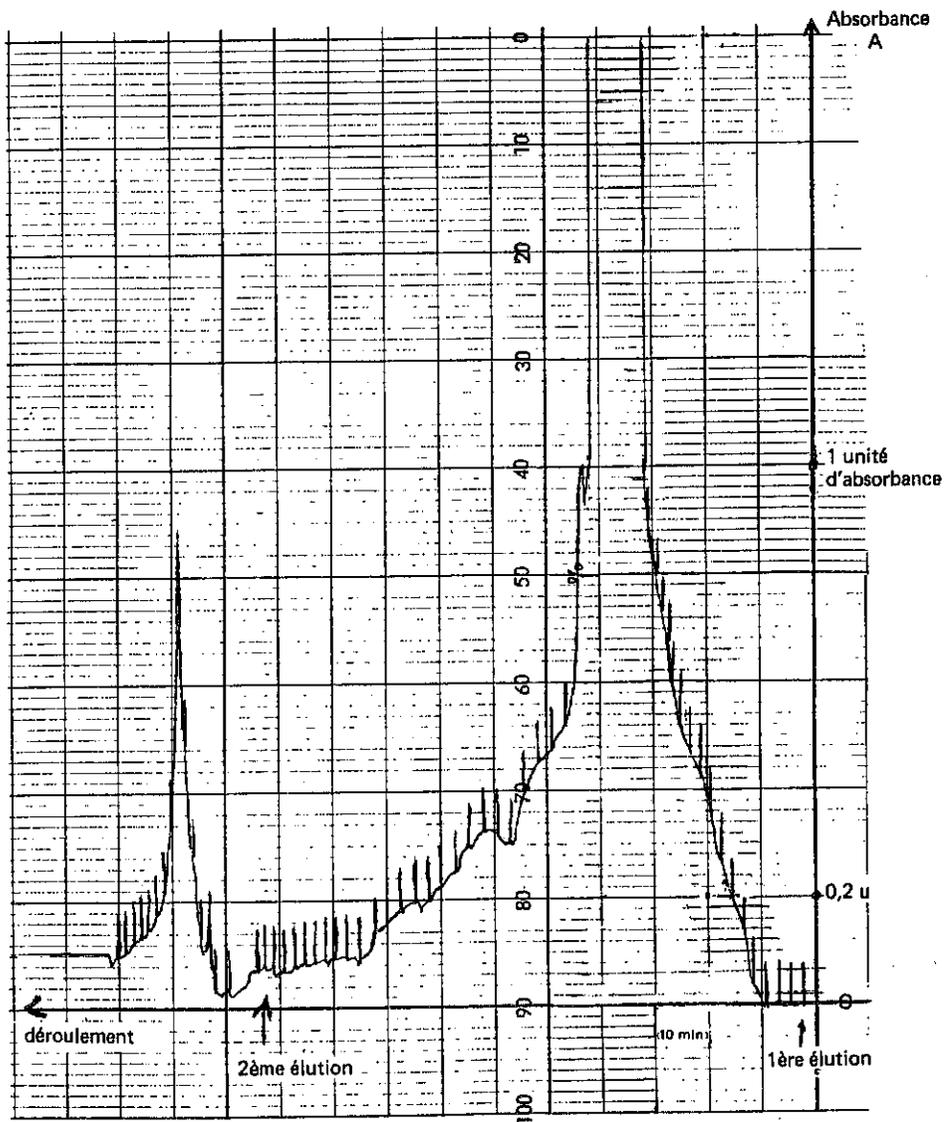
Quand l'absorbance est inférieure à 0,05 unités, une deuxième élution est effectuée avec une solution de $MgCl_2$, 5 M. Des fractions de 1 ml sont recueillies. Celles dont l'absorbance à 280 nm est supérieure à 0,05 unités sont réunies, dialysées contre du PBS, puis concentrées et redialysées contre du PBS. Le volume final est de 1 ml : c'est la fraction II.

Le document joint donne les variations d'absorbance pendant les éluions.

L'activité anticorps du sérum brut et des fractions I et II a été précédemment testée par la méthode E.L.I.S.A. directe.

QUESTIONS

- 1) — Expliquer les différentes étapes de la chromatographie.
 - Commenter l'allure du document joint.
 - Que doivent théoriquement contenir les deux fractions ? Cela est-il confirmé par les résultats de la méthode E.L.I.S.A. ?
- 2) Sachant que l'absorbance à 280 nm est :
 - pour le sérum brut, dilué au $1/500^e$: 0,19,
 - pour la fraction I, diluée au $1/500^e$: 0,17,
 - pour la fraction II, diluée au $1/50^e$: 0,16,
 et que l'absorbance moyenne d'une solution protéique à 1 g.l^{-1} est de 1,6 unités à 280 nm, calculer le rendement de purification et le taux de purification en utilisant le titre en anticorps comme mesure de l'activité de la solution testée.



SUJET 2

Durée : 8 h

Coef. : 8

PREMIER JOUR (Durée : 4 h)

I. IDENTIFICATION D'ACIDES AMINES D'UN MELANGE PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE (40 points)

La chromatographie est effectuée sur couche mince de gel de silice.

Le solvant utilisé est un mélange de :

- butanol 1 = 2 volumes,
- acide acétique pur pour analyses = 1 volume,
- eau distillée = 1 volume.

Introduire le solvant dans la cuve (bêcher de 400 ml) couverte d'un fond de boîte de Pétri sur une hauteur de 1 à 1,2 cm maximum. Saturer l'atmosphère de la cuve en tapissant les parois latérales de bandes de papier filtre imprégnées de solvant. Attendre 30 minutes couvercle en place.

Activer une plaque de 10 x 8 cm par passage à l'étuve à 110° pendant quelques minutes. Sur les bords latéraux de la plaque, ôter une bande mince de Silicogel. Tracer une ligne horizontale à 2 cm du bord inférieur (au crayon à mine de graphite).

Marquer les emplacements de 6 dépôts régulièrement espacés.

Les dépôts seront réalisés à l'aide de tubes capillaires. Le volume déposé sera d'environ 1 à 2 μ l, en plusieurs fois, avec séchage entre chaque opération à l'aide d'un sèche-cheveux. Déposer sur la ligne :

- la solution de glycine,
- la solution d'alanine,
- la solution de valine,
- le mélange M (2 dépôts).

Introduire la plaque dans la cuve. Laisser la migration s'effectuer jusqu'à ce que le solvant atteigne le bord supérieur de la plaque.

Sortir la plaque. Noter la position du front du solvant. Sécher.

Pulvériser le révélateur à la ninhydrine. Après quelques minutes, porter à l'étuve à 100° pendant 3 à 4 minutes. Entourer les spots d'un trait de crayon.

RESULTATS

Sur la feuille de compte-rendu, coller le chromatogramme et indiquer la position des différentes solutions déposées. Indiquer le temps de migration. Mesurer les Rf. Identifier les acides aminés du mélange M.

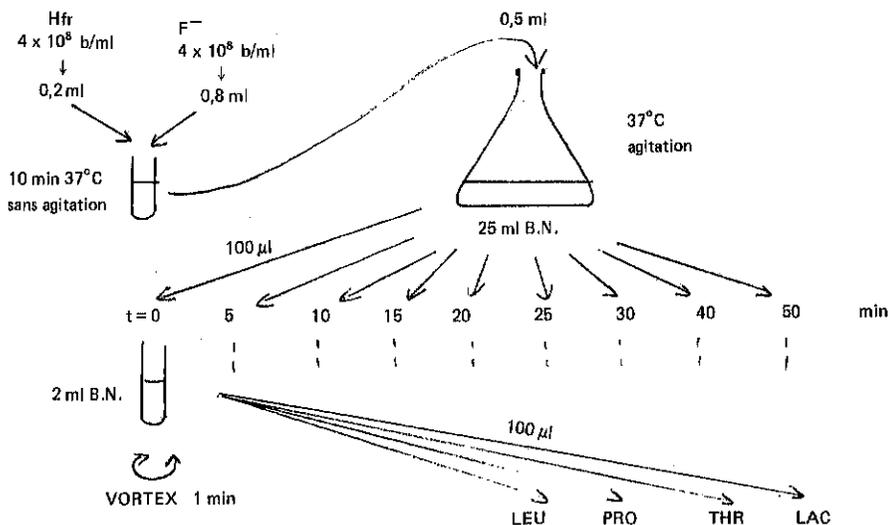
II. ETUDE DE LA CONJUGAISON CHEZ ESCHERICHIA COLI; ETUDE DU TRANSFERT DES MARQUEURS SUIVANTS : LEUCINE, PROLINE, THREONINE, LACTOSE (80 points sur 2 jours)

On réalise une conjugaison à l'aide des souches suivantes :

- Escherichia coli Hfr Sm^s (sensible à la streptomycine)
- Escherichia coli F⁻ Leu⁻ Pro⁻ Thr⁻ Lac⁻ (λ⁺) Sm^r (résistant à la streptomycine).

Manipulation (voir schéma) :

- Mélanger 0,2 ml de Escherichia coli Hfr à 4 x 10⁸ bactéries par ml dans du bouillon nutritif avec 0,8 ml de Escherichia coli F⁻ à 4 x 10⁸ bactéries par ml dans du bouillon nutritif (4 x 10⁸ bactéries par ml correspondent à une densité optique de 1 à 500 nm).
- Incuber 10 minutes à 37°, sans agitation.
- Avec précautions, prélever 0,5 ml du mélange à l'aide d'une pipette stérile de 5 ml. Les déposer dans un erlen contenant 25 ml de bouillon nutritif.
- Prélever de suite (temps 0) 100 µl et les diluer dans 2 ml de bouillon nutritif. Placer aussitôt l'erlen de 25 ml à 37° avec agitation.
- Aux temps 5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 25 min, 30 min, 30 min et 50 min, réaliser le même prélèvement et la même dilution qu'au temps 0.
- A chaque temps, passer au VORTEX pendant une minute les prélèvements dilués, puis étaler :
 - 100 µl sur une boîte « Leu » (milieu minimum glucosé + Thr + Pro + Sm),
 - 100 µl sur une boîte « Pro » (milieu minimum glucosé + Thr + Leu + Sm + Val + Ile),
 - 100 µl sur une boîte « Thr » (milieu minimum glucosé + Leu + Pro + Sm + Val + Ile),
 - 100 µl sur une boîte « Lac » (milieu minimum lactosé + Thr + Pro + Leu + Sm + Val + Ile).
- Noter sur les boîtes les temps de prélèvements réels. Mettre à l'étuve à 37°.



I. ETUDE DE LA CONJUGAISON CHEZ ESCHERICHIA COLI (suite)

Réaliser le comptage des colonies sur toutes les boîtes.

Présenter sous forme de tableaux les résultats obtenus. Tracer pour chaque marqueur la courbe représentant la variation du nombre de recombinants par ml de milieu réactionnel en fonction du temps.

Conclusions.

Expliquer la composition des milieux de sélection.

II. REALISATION D'UN REACTEUR ENZYMATIQUE DISCONTINU (BATCH) A INVERTASE (40 points)

La β -D-Fructofuranoside fructohydrolase (EC 3.2.1.26, invertase, saccharase) est une enzyme qui peut être, entre autres, extraite de la levure. Elle hydrolyse le saccharose selon la réaction :



En fin de réaction, le D-fructose est un inhibiteur compétitif et le D-glucose un inhibiteur partiellement compétitif.

Les produits de la réaction, réducteurs, sont dosés par colorimétrie : le 3,5 dinitrosalicylate jaune est réduit en milieu alcalin à chaud en un composé rouge. L'absorbance est lue à 530 nm. On étalonne le spectrophotomètre utilisé par une solution équimoléculaire de glucose et fructose de concentration connue.

Dans cette manipulation, on réalise un réacteur enzymatique discontinu à enzyme soluble et on suit l'apparition du produit en fonction du temps à une température précisée en début de manipulation.

1. Conditions expérimentales de réalisation du bioréacteur

Introduire dans un bécher de 250 ml :

α ml de solution enzymatique (le volume α sera précisé en début de manipulation),

90 - α ml de tampon acétate 0,1 M pH 4,5.

Déclencher la réaction (temps 0) par ajout de 10 ml de solution de saccharose 1,2 M dans le tampon acétate.

Mettre immédiatement 3 ml de milieu réactionnel dans un tube à essai contenant 2 ml de 3-5 DNS : c'est le premier prélèvement.

Renouveler les prélèvements toutes les 10 minutes durant 60 minutes.

Remarque : Il n'est pas nécessaire que les prélèvements soient effectués exactement toutes les 10 minutes; il est néanmoins important de repérer soigneusement le moment du prélèvement.

2. Dosage des produits formés : Mode opératoire

Préparer une série de tubes à essais contenant 2 ml de 3-5 DNS : ces tubes serviront à recueillir les divers prélèvements (le 3-5 DNS arrête la réaction).

Le volume de chaque prélèvement est à adapter à la quantité de sucres réducteurs présents. Il sera indiqué au début de la manipulation.

Prise d'essai V ml
(entre 3 ml et 30 μ l)
introduite dans 2 ml de 3-5 DNS

87-35

Eau distillée 3 - V ml

Agiter.

Porter 5min au bain-marie bouillant.

Refroidir. Ajouter 15 ml d'eau distillée.

Lire au spectrophotomètre à 530 nm.

3. Etalonnage du spectrophotomètre

Dans un tube à essai, introduire :

- 1,25 ml de solution de glucose 0,005 M et fructose 0,005 M,
- 0,75 ml d'eau distillée,
- 1 ml de tampon acétate 0,1 M, pH 4,5,
- 2 ml de 3-5 DNS.

Agiter.

Porter 5 min au bain-marie bouillant.

Refroidir. Ajouter 15 ml d'eau distillée.

Lire au spectrophotomètre à 530 nm contre un témoin.

4. Compte-rendu

4.1. Tableau des résultats expérimentaux (voir document)

Compléter le tableau avec les diverses valeurs expérimentales :

- temps exacts de prélèvement,
- volume V de prélèvement,
- valeur d'absorbance.

4.2. Calculs

- Calculer la quantité de produit formé en fonction du temps.
- Calculer la quantité de saccharose présent dans le réacteur en fonction du temps.

Ces calculs seront justifiés.

Compléter à l'aide de ces valeurs le tableau de résultats.

4.3. Tracé des graphes

Sur une même feuille de papier millimétré, tracer les courbes représentant les variations des concentrations de produit (P) et de substrat (S), en fonction du temps :

$(P) = f(\text{temps})$ et $(S) = f'(\text{temps})$.

4.4. Modélisation

On peut modéliser le comportement du réacteur en cherchant une expression mathématique permettant de calculer la concentration du substrat en fonction du temps.

Le modèle sera d'autant meilleur que les valeurs calculées seront plus proches de la courbe expérimentale $(S) = f'(\text{temps})$.

Le modèle est obtenu :

- en effectuant un bilan substrat au niveau du réacteur supposé parfaitement mélangé,
- en admettant une loi cinétique de disparition du substrat,
- en intégrant l'expression obtenue par rapport au temps.

Le modèle obtenu en admettant que la disparition du substrat s'effectue selon la relation de Michaelis conduit, lors de la représentation graphique, à une courbe passant systématiquement au-dessous de la courbe expérimentale.

- Interpréter ce comportement.
- Comment améliorer ce modèle ?

- Document -

REALISATION D'UN REACTEUR ENZYMATIQUE
DISCONTINU (BATCH) A INVERTASE

Nom : _____

Prénom : _____

TABLEAU DE RESULTATS

N° _____

Temps (min)	V (μ l)	A (530 nm)	μ mol sacch. hyd. (100 ml)-1	sacch. hyd. M	(S) M

Achevé d'imprimer

le 15 janvier 1988

sur les presses du Centre Régional
de Documentation Pédagogique
de l'Académie de LYON
47-49, rue Philippe-de-Lassalle - 69316 LYON Cédex 04

