

BIOTECHNOLOGIES

Durée : 3 heures

L'usage d'abaques, de tables, de calculatrice et de tout instrument électronique susceptible de permettre au candidat d'accéder à des données et de les traiter par les moyens autres que ceux fournis dans le sujet est interdit.

Chaque candidat est responsable de la vérification de son sujet d'épreuve : pagination et impression de chaque page. Ce contrôle doit être fait en début d'épreuve. En cas de doute, il doit alerter au plus tôt le surveillant qui vérifiera et, éventuellement, remplacera le sujet.

Le sujet comprend au total 12 pages numérotées de 1 à 12.

Le sujet comporte 13 documents situés en pages 5 à 12.

Si, au cours de l'épreuve, un candidat repère ce qui lui semble être une erreur d'énoncé, il le signale sur sa copie et poursuit sa composition en expliquant les raisons des initiatives qu'il a été amené à prendre.

Avertissements :

- La plupart des questions sont indépendantes ou regroupées en parties indépendantes.

La question rédactionnelle (Q11) est clairement identifiée.

Partie 1.

La PETase : enzyme de dégradation du PET, détruire biologiquement les bouteilles en plastique

Beaucoup de produits plastiques sont remarquablement persistants dans l'environnement en raison de l'absence ou de la faible activité d'enzymes cataboliques qui pourraient décomposer leurs constituants ; en particulier le polyéthylène téréphthalate (PET), polymère de très grande taille.

Récemment, une bactérie *Ideonella sakaiensis* a été étudiée pour sa capacité à dégrader le PET grâce à une enzyme particulière : la PETase selon les réactions présentées dans le document 1. La modification ciblée de la PETase d'*Ideonella sakaiensis* pourrait, ainsi, permettre d'augmenter les capacités et les performances de cette enzyme.

Dans le but d'améliorer l'activité PETase, de nombreuses séquences codantes modifiées de PETases ont été produites, puis :

- les séquences codantes modifiées des PETases sont insérées dans un plasmide pRSET-CFP. La séquence de la protéine CFP (Cyan Fluorescence Protein) est associée à la séquence de la PETase lors de l'insertion dans le plasmide ;
- la synthèse des PETases modifiées se fait à travers l'expression des séquences codantes modifiées portées par le plasmide pRSET-CFP. Cette expression peut prendre place dans un système cellulaire (dans *E. coli* par exemple) ou acellulaire (type free-cell).

1. Evaluation de la quantité d'enzyme produite par mesure de fluorescence du partenaire de fusion

Le [document 2](#) montre la procédure d'expression des PETases modifiées puis la mesure de l'activité de ces enzymes.

- Q1. Discuter l'intérêt de la standardisation après l'expression du gène et calculer la dilution réalisée sur l'échantillon A211P-CFP.
- Q2. Calculer la fluorescence théorique juste avant le dépôt du film plastique.
- Q3. A partir du [graphique \(a\)](#) et du [graphique \(b\)](#) du [document 2](#), ainsi que de la procédure, discuter le choix des PETases modifiées : R61A, L88F et I179F.

2. Mesure des cinétiques enzymatiques des PETases R61A, L88F et I179F

Ces PETases modifiées sont produites en système acellulaire et purifiées, pour une étude enzymatique. On évalue les modifications de l'affinité et de la catalyse comparées à la PETase sauvage (wild type : WT).

Les activités enzymatiques de ces PETases sont suivies en utilisant le substrat p-nitrophényl acétate (PNPA).

- Q4. Justifier, à l'aide du [document 3A](#), l'utilisation du para-nitrophénylacétate (PNPA) comme substrat dans le cadre de la mesure d'activité des différentes PETases.

Les résultats, obtenus à partir d'essais en triple, sont présentés dans le [document 3B](#).

- Q5. Discuter les modifications des constantes K_m et k_{cat} des différentes PETases testées.
- Q6. A l'aide du [document 3B](#), proposer la PETase modifiée la plus performante dans les conditions expérimentales utilisées. Argumenter ce choix.

3. Etude de la structure moléculaire des PETases

La suite de l'étude portera sur la structure moléculaire des 3 PETases modifiées précédemment choisies et nommées R61A, L88F et I179F. Les PETases n'ont subi la modification que d'un seul acide aminé dans leur structure ainsi, pour exemple, R61A signifie que l'acide aminé R en position 61 a été remplacé par l'acide aminé A.

La structure moléculaire de la PETase d'*Ideonella sakaiensis* a été obtenue par cristallographie avec un dimère de PET (2PET) comme substrat. Les PETases modifiées ont été étudiées de la même façon, pour permettre la comparaison à la PETase sauvage. Les résultats sont présentés dans le [document 4](#).

- Q7. A partir du [document 5](#) et de la structure des acides aminés, proposer les conséquences induites par la mutation R61A au niveau du site actif de l'enzyme.
- Q8. A partir des propriétés physico-chimiques des acides aminés et des propriétés physico-chimiques du PET (structure donnée dans le [document 4](#)), dégager la conséquence probable pour l'enzyme modifiée ([document 5](#)).

Les [documents 6A](#) et [6B](#) montrent les distances des interactions entre l'enzyme et son substrat.

- Q9. Préciser la nature de ce type d'interaction.
- Q10. En s'appuyant sur l'ensemble des données et notamment les figures des [documents 4, 5](#) et [6](#), proposer une explication reliant les 3 modifications aux constantes K_m et k_{cat} . On appuiera notamment le raisonnement sur la nature des acides aminés, les distances et le nombre d'interactions.
- Q11. Question rédactionnelle :

Le [document 3B](#) donne les K_m et k_{cat} des différentes PETases étudiées.

Après avoir présenté rapidement les principaux paramètres cinétiques d'une enzyme michaelienne, expliquer leur signification pour l'enzyme vis-à-vis de la réaction catalysée. Présenter leur détermination expérimentale puis mathématique en s'appuyant sur des graphiques soigneusement annotés.

Partie 2.

Comment améliorer la procédure de production d'un condiment fermenté, la sauce soja, afin de répondre aux attentes mondiales des consommateurs : avoir un produit de couleur claire ?

La sauce soja est l'un des condiments les plus populaires dans le monde.

Sa production suit un processus de fermentation microbiologique en deux phases, présenté dans le [document 7](#), durant lequel de nombreux micro organismes (moisissures, bactéries) coopèrent et se succèdent.

La préférence des consommateurs évolue vers une sauce soja de couleur claire, peu riche en mélanoïdine (pigment brun produit par réaction de Maillard). Des méthodes chimiques ont été testées pour l'éclaircir mais elles s'accompagnent toutes de perte de saveur.

L'étude proposée présente un nouveau processus microbiologique d'éclaircissement de la sauce soja par l'utilisation d'une collaboration métabolique entre deux souches de *Bacillus*, naturellement présentes au cours de la fermentation, mais génétiquement modifiées afin :

- de limiter la présence du xylose, précurseur de mélanoïdine ;
- et de dégrader une partie de la mélanoïdine responsable de la teinte brune.

On cherche à créer une communauté bactérienne semi synthétique utilisable en industrie.

1. Sélection de *Bacillus*, candidats à des modifications génétiques pour limiter la production de mélanoïdine

Des souches de *Bacillus subtilis* ont été isolées et caractérisées afin de répondre aux exigences physico chimiques et nutritionnelles du milieu imposé par l'étape de fermentation Moromi notamment :

- la tolérance à une forte concentration en sel : $\rho_{\text{NaCl}} \geq 15 \text{ \% m/v}$;
- la forte capacité à métaboliser le xylose ;
- la capacité à dégrader la mélanoïdine.

Les *Bacillus subtilis* sont des bactéries bacillaires à Gram positif, chimio- organotrophes, hétérotrophes, mésophiles, aérobies strictes, sporulées et non exigeantes.

Q12. Réaliser un schéma annoté de l'organisation des enveloppes d'une bactérie à Gram positif.

Le [document 8](#) présente deux milieux (en bouillon ou en gélose) utilisés pour l'entretien des souches de *Bacillus* : le milieu LB et le milieu M9 pour *Bacillus subtilis*.

Q13. A partir de l'analyse de ces deux milieux, vérifier et justifier que leur composition est en accord avec les types trophiques de *Bacillus subtilis*. Argumenter les réponses.

Q14. Donner la composition d'un milieu LB modifié pour vérifier les caractères de la souche bactérienne:

- tolérante à une forte concentration en sel : $\rho_{\text{NaCl}} \geq 15 \text{ \% m/v}$;
- capable de métaboliser le xylose ;
- capable d'hydrolyser la mélanoïdine.

Argumenter la réponse. Préciser les conditions d'incubation des milieux et expliciter leur lecture.

2. Modification génétique de *Bacillus subtilis* pour l'expression d'une Xylose Réductase fongique

2.1. Intérêt métabolique

Au cours de la fermentation Moromi, les deux principaux glucides libérés sont le xylose et le glucose dans une proportion 1 : 10. Le xylose est un fort contributeur de la réaction de Maillard conduisant au brunissement de la sauce soja.

Dans une première stratégie, il a été décidé de renforcer la capacité à métaboliser le xylose des souches sélectionnées. *Bacillus subtilis* est modifié génétiquement afin d'exprimer une xylose réductase fongique, XR. Cette nouvelle souche sera ensuite ajoutée au cours de la fermentation Moromi. Les voies fongiques et bactériennes du métabolisme du xylose sont présentées dans le [document 9](#).

Q15. A partir de l'analyse du document 9, établir un bilan moléculaire et énergétique de la voie de métabolisation du xylose ($C_5H_{10}O_5$) proposée pour :

- la souche *Bacillus subtilis* sauvage ;
- la souche *Bacillus subtilis* transformée [Xylose réductase fongique +].

Q16. Donner l'intérêt de l'utilisation de la souche génétiquement modifiée lors de la fermentation Moromi (document 7).

2.2. Les vecteurs et la sélection de la xylose réductase

Le document 10 présente le vecteur navette pCG004-AmyQ SP utilisé pour la construction du vecteur pCG004-AmyQ SP-CbXR pour l'expression de la xylose réductase CbXR de *Candida boidinii*.

Q17. Montrer que le vecteur pCG004-AmyQ SP est un « vecteur navette d'expression » en analysant les différentes boîtes fonctionnelles présentes.

Q18. Préciser et justifier les éléments à ajouter au milieu de culture afin de permettre l'expression de la xylose réductase par *Bacillus* transformé par pCG004-AmyQ SP-CbXR.

Le gène *CbXR* de *Candida boidinii* codant la **xylose réductase** est inséré en aval d'un promoteur inducible à l'IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside), le promoteur P_{grac} .

Q19. A partir de l'organisation de la zone promotrice et de la carte génétique du vecteur (document 10B), expliquer son fonctionnement en présence et en absence d'IPTG. L'utilisation de schémas est recommandée.

Le document 11 présente la carte de restriction du gène *CbXR*. Des séquences adaptatrices commerciales contenant le site de coupure d'une enzyme de restriction sont ajoutées, par PCR, en 5' et 3' du gène *cbXR* pour simplifier son intégration dans le vecteur pCG004-AmyQ SP (document 11A).

Q20. Choisir, en argumentant, un couple de séquences adaptatrices permettant de construire le vecteur d'expression pCG004-AmyQ SP-CbXR.

Trois vecteurs recombinés sont produits à partir de 3 gènes fongiques différents. Ces vecteurs sont testés afin de caractériser le meilleur système pour l'étude (document 12).

Q21. Analyser les résultats fournis et conclure quant au meilleur système utilisable.

3. Co-culture de *Bacillus* génétiquement modifiés dans un milieu proche du Moromi

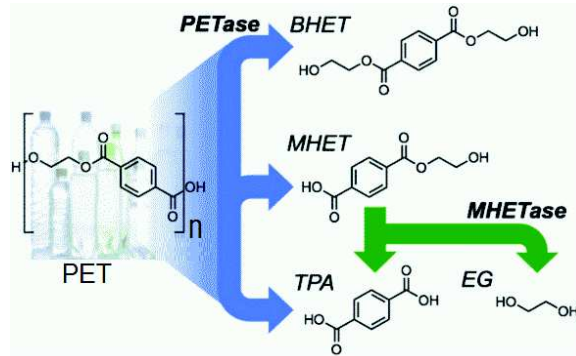
Une seconde stratégie a consisté à modifier génétiquement une autre souche de *Bacillus* afin qu'elle exprime la laccase bactérienne de *Escherichia coli* : EcMO. La souche est transformée par le vecteur pCG004-AmyQSO-EcMO. Les laccases dégradent la mélanoïdine (document 7).

Des tests de co-culture sont réalisés afin de valider l'efficacité des deux *Bacillus* transformés pour l'éclaircissement de la sauce soja. La procédure expérimentale et les résultats sont présentés dans le document 13.

Q22. Analyser les résultats présentés dans le document 13. Conclure quant à l'ensemble de la démarche mise en œuvre.

Q23. Proposer une ou deux pistes afin de conforter et/ou poursuivre les investigations avant l'utilisation de co-cultures de souches de *Bacillus* transformées (communauté bactérienne semi synthétique) lors de la production à l'échelle industrielle de sauce soja.

Document 1 - La PETase et son activité sur le PET



Source : Characterization and engineering of a plastic-degrading aromatic polyesterase, AustinHP et al, Proc Natl Acad Sci U S A. 2018 May 8;115(19):E4350-E4357.

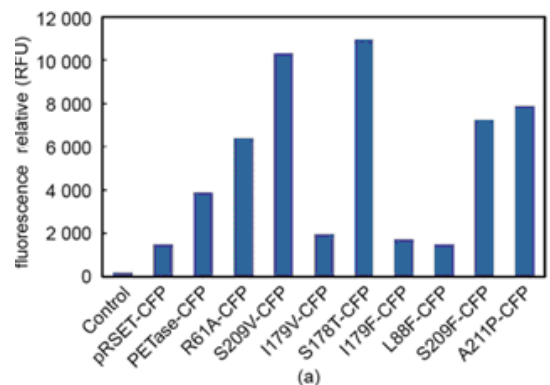
Document 2 - Procédure d'expression et mesure d'activité en système acellulaire

Les PETases modifiées ont été exprimées dans un système acellulaire à base de *E. coli* en plaque de 96 puits.

Phase d'expression : Evaluation de la quantité d'enzyme produite par mesure de fluorescence du partenaire de fusion.

Les plasmides pRSET-CFP (à raison de 50 μL par puits) ont été exprimés pendant 12 h à 37°C.

Une mesure de fluorescence est réalisée dont les résultats de certaines enzymes testées sont montrés sur le **graphique (a)**.



Procédure de normalisation de la fluorescence avant la mesure de l'activité enzymatique

Une solution tampon a été ajoutée dans chaque puits pour diluer et obtenir une fluorescence d'intensité de 1000 RFU.

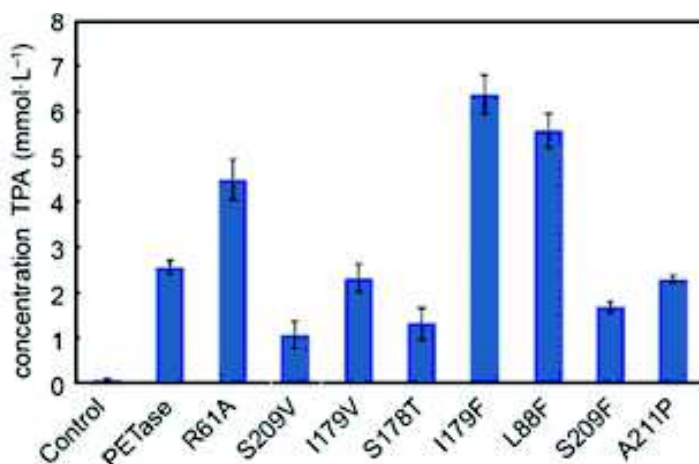
10 μL de chaque solution résultante ont été mélangés à 1990 μL du tampon de réaction pour obtenir chaque milieu réactionnel test.

Phase de mesure d'activité des enzymes produites

Un morceau de film plastique PET de 1,5 cm sur 1,0 cm, préalablement traité avec une solution à 1 % de dodécyl sulfate de sodium (SDS), éthanol et eau distillée à 50°C pendant 30 minutes puis séché pendant 48 h à 50°C, a été ajouté aux milieux réactionnels précédents.

La réaction se déroule pendant 48 h à 30°C puis la réaction est stoppée par ajout d'une solution aqueuse de soude à 1 mol·L⁻¹. Un traitement à 50°C pendant 10 minutes est ensuite appliqué.

Après centrifugation à 12000 rpm (rotation par minute) pendant 1 minute, 200 μL de chaque surnageant sont repris en microplaque.



(b)

L'absorbance est alors mesurée à 240 nm pour déterminer la concentration de téréphtalate (TPA). Les résultats de certaines enzymes testées sont montrés sur le **graphique (b)** ci-dessous.

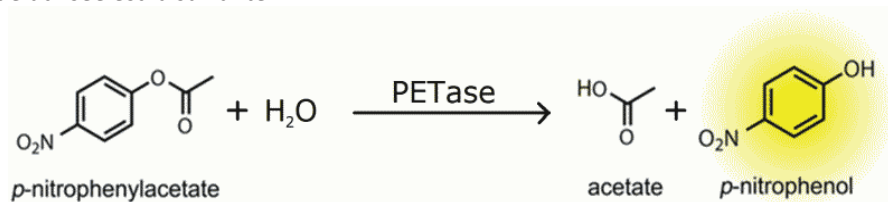
Source adaptée de: Enhanced Poly (ethylene terephthalate) Hydrolase Activity by Protein Engineering, Yuan Ma et al, Engineering, Vol 4-6, Dec. 18, p 888-893.

Document 3 - Mesure d'activité des PETases

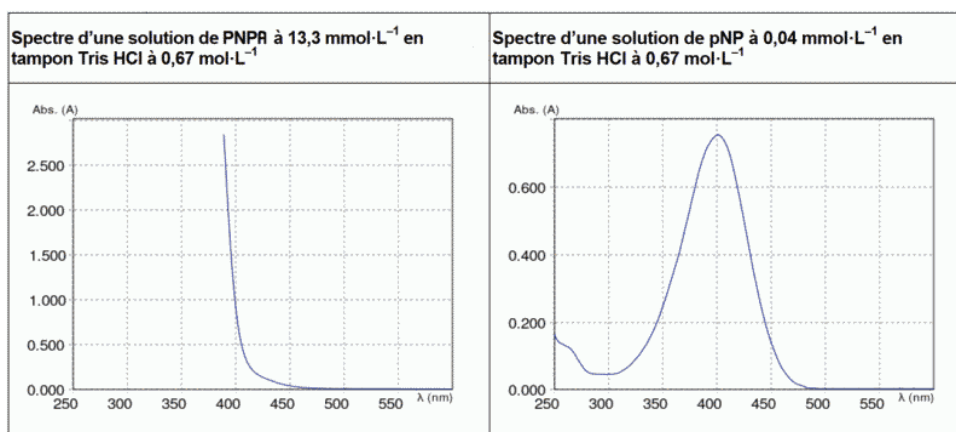
3A. Procédure

Les mesures d'activité ont été effectuées en utilisant du p-nitrophénylacétate (PNPA) comme substrat pour analyser les paramètres cinétiques de Michaelis. Ces derniers ont été déterminés à 30°C et à pH = 7,0 avec des concentrations de substrat comprises entre 0,5 et 8,0 mmol·L⁻¹.

La réaction enzymatique utilisée est la suivante :



Spectre d'absorption du PNPA et du PNPP



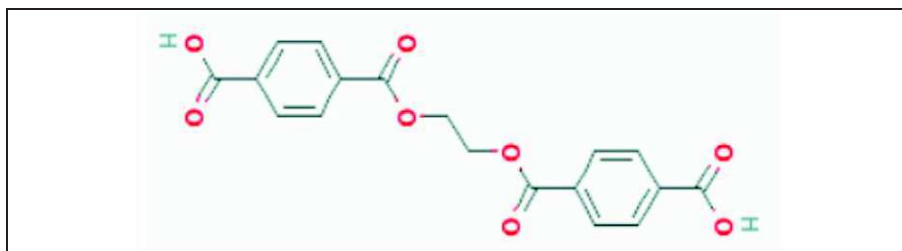
3B. Résultats des paramètres cinétiques de la PETase et de ses variantes avec le substrat PNPA

Enzyme	K _m (mmol·L ⁻¹)	k _{cat} (s ⁻¹)
PETase	4,6 ± 0,5	27,0
PETase I179F	1,2 ± 0,2	107,7
PETase L88F	3,8 ± 0,4	44,8
PETase R61A	4,5 ± 0,1	41,9

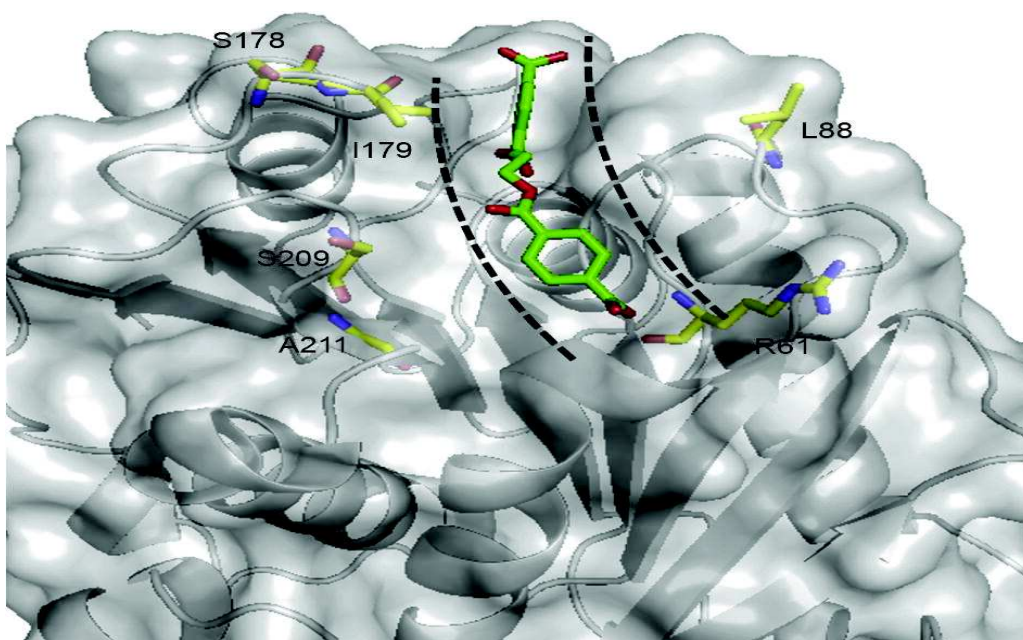
Source adaptée de: Enhanced Poly (ethylene terephthalate) Hydrolase Activity by Protein Engineering, Yuan Ma et al, Engineering, Vol 4-6, Dec. 18, p 888-893.

Document 4 - Structure moléculaire de la PETase sauvage et du 2PET

L'étude de la PETase par cristallographie a été faite avec un dimère d'éthylène téréphtalate (2PET) comme substrat.



L'étude de la structure moléculaire de la PETase d'*Ideonella sakaiensis*, obtenue par cristallographie avec le 2PET comme substrat, montre que 6 acides aminés sont potentiellement importants pour la liaison du substrat : R61, L88, S178, I179, S209 et A211.



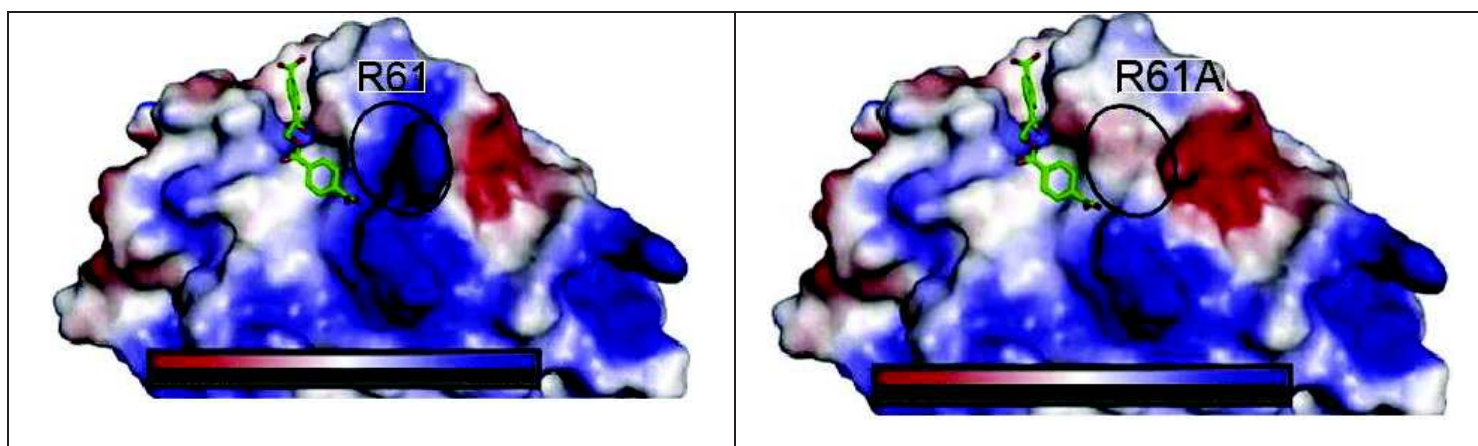
Données : Code des acides aminés à 3 lettres et à 1 lettre

ala	arg	asn	asp	cys	glu	gln	gly	his	ile	leu	lys	met	phe	pro	ser	thr	trp	tyr	val
A	R	N	D	C	E	Q	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V

Les mêmes études cristallographiques ont été réalisées pour les 3 mutations suivantes : R61A, L88F, I179F.

Source adaptée de: Enhanced Poly (ethylene terephthalate) Hydrolase Activity by Protein Engineering, Yuan Ma et al, Engineering, Vol 4-6, Dec. 18, p 888-893.

Document 5 - Structure moléculaire topographique et potentiel électrostatique de surface des PETases R61 et R61A



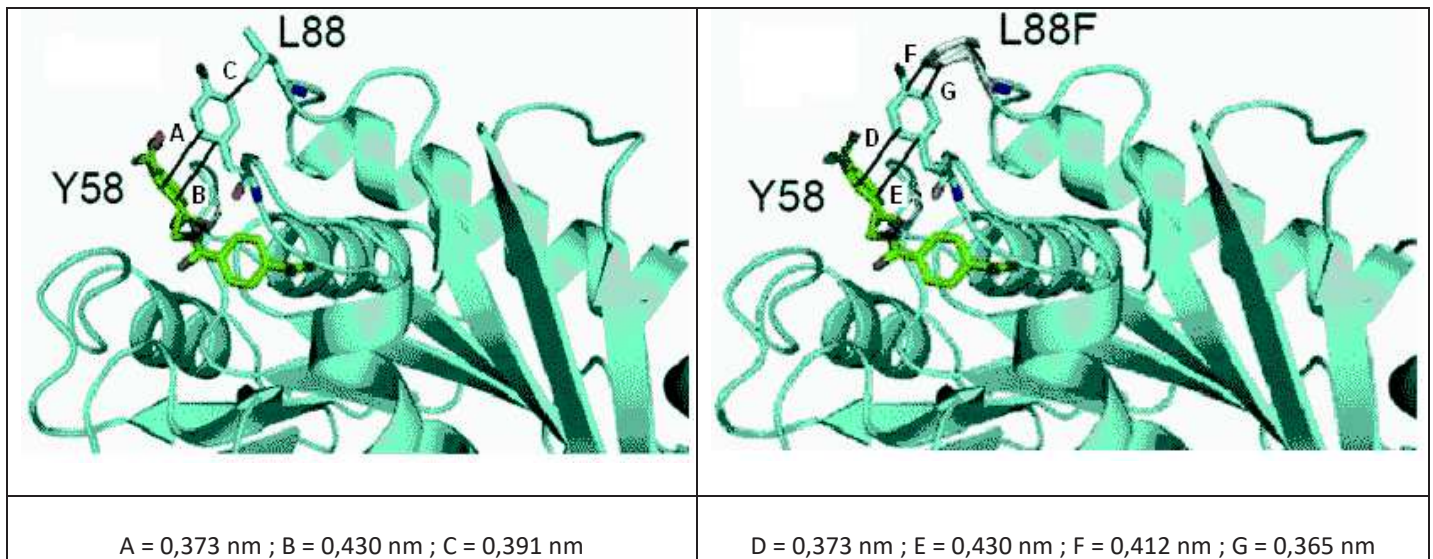
Le 2 PET est représenté en vert. La zone d'intérêt est entourée. Le potentiel électrostatique de surface est identifié : rouge (-), blanc (neutre) et bleu (+).

Source adaptée de: Enhanced Poly (ethylene terephthalate) Hydrolase Activity by Protein Engineering, Yuan Ma et al, Engineering, Vol 4-6, Dec. 18, p 888-893.

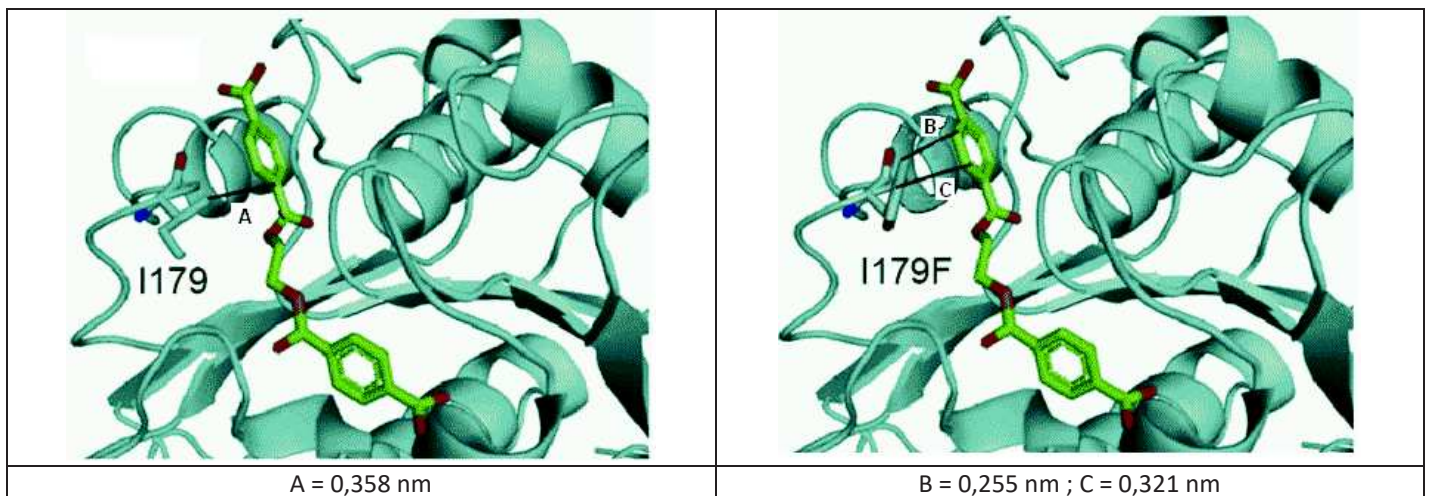
Document 6 - Structure moléculaire de la PETase sauvage et des deux formes mutées L88F et I179F

Une comparaison structurale est réalisée entre la PETase sauvage (WT) et sa forme mutée pour 2 acides aminés : L88 et I179. Les interactions étudiées sont symbolisées par un **trait noir**. Leurs dimensions (en nm) sont indiquées en respectant leurs positions qui sont identifiées par **une lettre**.

6A. Structure moléculaire de la PETase L88 WT et de sa forme mutée L88F



6B. Structure moléculaire de la PETase I179 WT et de sa forme mutée I179F



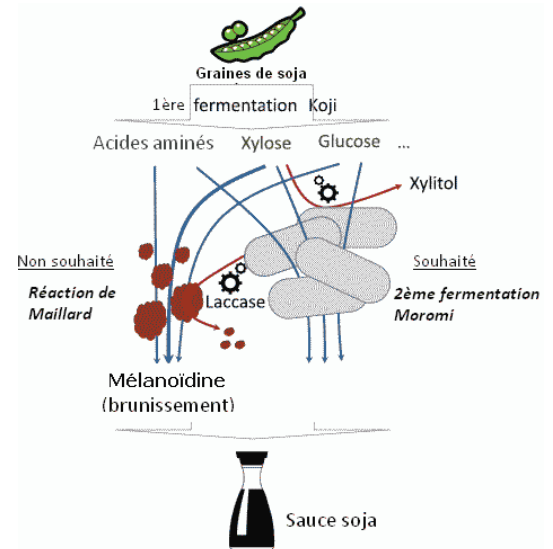
Source adaptée de: Enhanced Poly (ethylene terephthalate) Hydrolase Activity by Protein Engineering, Yuan Ma et al, Engineering, Vol 4-6, Dec. 18, p 888-893.

Document 7 - Étapes biologiques de la production de la sauce soja

La première fermentation du soja, **fermentation Koji**, principalement par *Aspergillus oryzae* (moisissures) conduit à la production et à la libération d'acides aminés et de glucides (glucose et xylose).

Au cours d'une seconde fermentation, **fermentation Moromi**, et après ajout de sel (NaCl), ces substrats sont métabolisés par un ensemble de micro organismes halophiles autochtones (bactéries lactiques, *Bacillus* et levures) pour aboutir à la sauce soja. Le xylitol produit a un effet conservateur et édulcorant.

Le brunissement est dû à la mélanoidine, plus ou moins abondante, produite par la réaction de Maillard entre les acides aminés et les glucides, dont le xylose principalement.

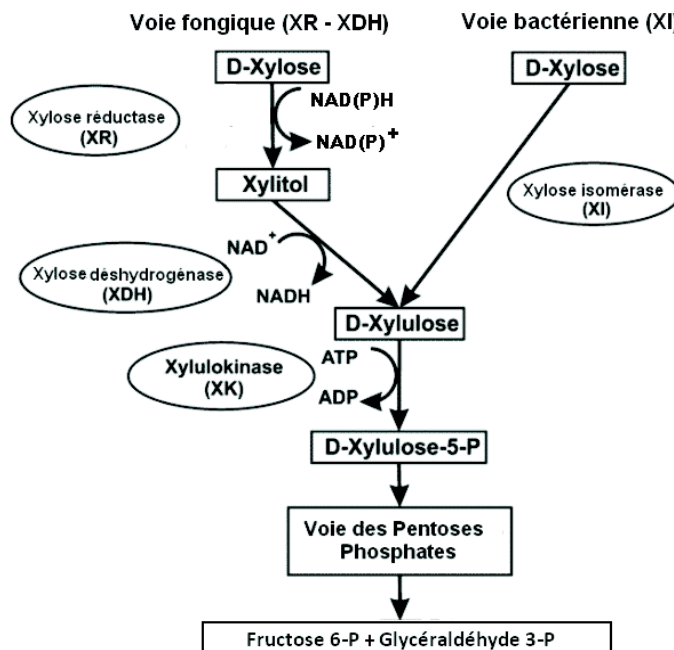


Source: Towards semi-synthetic microbial communities: enhancing soy sauce fermentation properties in *B. subtilis* co-cultures, Det-Udom R, Gilbert C, Liu L, Prakitchaiwattana C, Ellis T, Ledesma-Amaro R. Microb Cell Fact. 2019 Jun 3; 18 (1):101.

Document 8 - Milieux utilisés pour la culture des souches de *Bacillus subtilis*

Milieu LB		Milieu M9 pour <i>Bacillus subtilis</i>	
Composition pour 1 L de bouillon LB		Composition pour 1 L de milieu	
Tryptone	10,0 g	NH ₄ Cl	1,0 g
Extrait de levure	5,0 g	Na ₂ HPO ₄	6,0 g
NaCl	10,0 g	KH ₂ PO ₄	3,0 g
Ajout de 15 g d'agar pour les géloses LB		NaCl	0,5 g
Source : http://legacy.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/Difco_BBL/244610.pdf		pH final	7,4±0,2 (25°C)
		Supplémenté par 10 g de glucose, 100 mM MOPS, 0,2 g MgSO ₄ et 50 mg de Tryptophane	
		Ajout de 15 g d'agar pour les géloses	
		Sources: Microb Cell Fact. 2016; 15: 94 & https://www.sigmaaldrich.com	

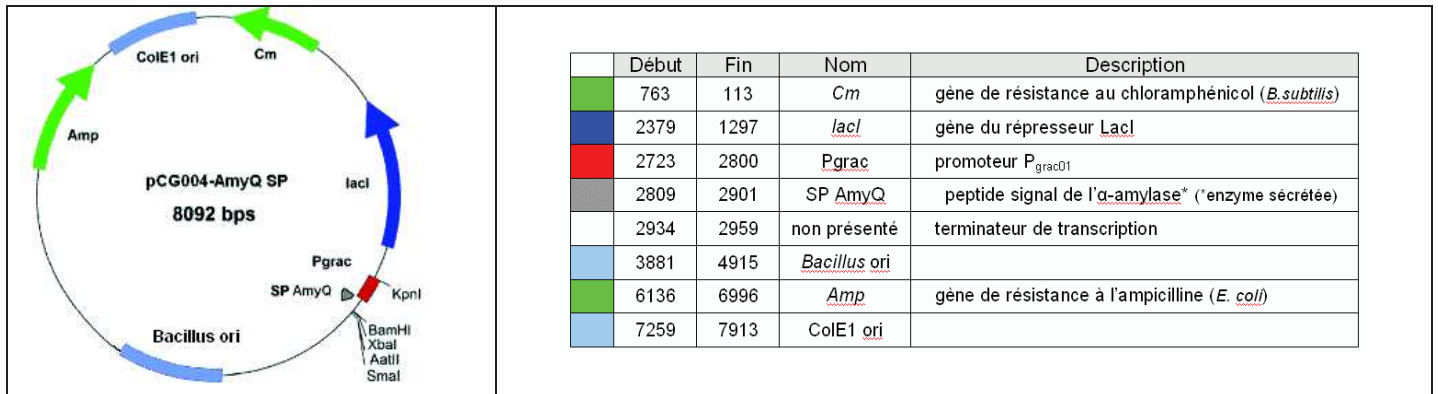
Document 9 - Voies métaboliques fongique et bactérienne de l'utilisation du xylose



Source : Advances and developments in strategies to improve strains of *Saccharomyces cerevisiae* and processes to obtain the lignocellulosic ethanol-a review, Lalue C, Schenberg AC, Gallardo JC, Coradello LF, Pombeiro-Sponchiado SR, ApplBiochemBiotechnol.2012 Apr; 166(8):1908-26.

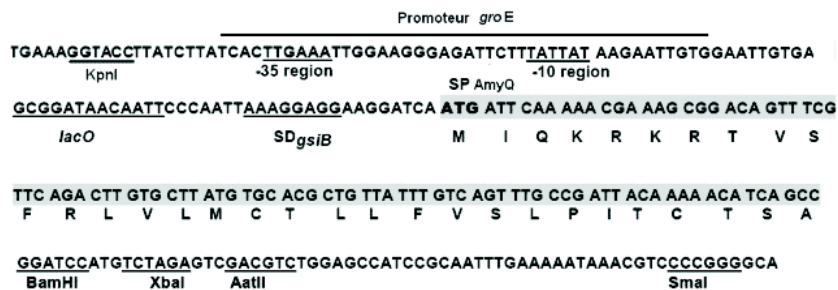
Document 10 - Le système hétérologue d'expression de la Xylose Réductase (XR) chez *Bacillus subtilis*

10A. Organisation génétique du vecteur navette d'expression pCG004-AmyQ SP



10B. Organisation de la région promotrice *Pgrac* et des séquences adjacentes

La région promotrice *Pgrac* est constituée du promoteur *groE*, de la séquence opérateur *lac O* et de la séquence *SDgsiB* (séquence Shine-Dalgarno du gène *gsiB* : site de fixation du ribosome). La séquence du peptide signal AmyQ (SP AmyQ) et le site de clonage multiple sont à la suite.



Sources: <https://www.mobitec.com/products/vector-systems>, & Extracellular Self-Assembly of Functional and Tunable Protein Conjugates from *Bacillus subtilis*. Gilbert C, Howarth M, Harwood CR, Ellis T. ACS Synth Biol. 2017 Mar 7.

Document 11 - Séquences du gène CbXR et des adaptateurs mis à disposition au laboratoire

11A. Séquence du gène *CbXR*

5'ATGAGTAGTCCGCTGTTAACACTTAATAACGGGTTAAAGATGCCGCAATCGGCTTTGGTTGTTGGAAGGTAGACAACGCAACCTGTGCGGAGACAATCTATGAGGCTATCAAGG TGGGATATCGCCTGTTTCGACGGCGCAATGGATTACGGCAACGAGAAAGAAGTAGCGGAGGGAGTGAATAAGGCGATAAAGGACGCGCTTGGTTAAGCGGGAGGAATTTATCATCG TGAGCAAGTTGTGGAATAATTTTCATCATCCTGATTCTGTAAGTTAGCAATTA AAAAGGTACTGTGAGATCTGAATTTGGAGTACATTGACCTGTTCTACATGCACCTTTCCAATTGCA CAAAAATTCGTGCCGATTGAAAAAATACCCACCGAATCTACTGCGGCGACGGTGATAAATGGTCAATTTGAGGATGTCCCAATTTGACGACGTCGCGGGCAATGAGGAGCT

AatII

TGTTGAAGAGGGACTGTCAAACTATAGGAATATCCAATTTTGTGGGGCTCTGATCCAGGACTTATTACGTGGATGCAAAATACGCCAGCCGCTATTGAAATCGAGCACCATCC ATACCTGGTGACGCTCTGTGATAGAATATGCCAAGACCGAAGGTATCCATGTGACTGCCTATTATCTTTTCGGGCTCAGTCAATTTGTCGAACTCGATCATCCTAAGGTTAAGGAT TGTACGACACTGTCAAGCATGAAACATAACTCAATTTGCTCTGCTCAGCAGCTACCACCAGCCAAAGTGTCTCCGGTGGGCAACCCAGCGCGGTTAGCAGTGATTCCGAAG AGTAACAAAAAAGAACGCTTTTGGCAACTTGAAGATTAATGACTTTGATCTTACGGAAGCCGAGTTAGAAAAATAGAGGCTCTCGACATAGGTTTGGGTTCAATGACCCTTGG ACGTGGGGCTACAATATCCCAACTTTTATATAA3'

11B. Séquences adaptatrices disponibles

Enzyme de restriction	Site de coupure	Adaptateur (+1)	Adaptateur (+2)	Adaptateur (+3)
AatII	GACGTC	5'tcgGACGTCgat3'	5'tcgtGACGTCctga3'	5'tcggggtcGACGTCtg3'
BamHI	GGATCC	5'tcgGGATCCgat3'	5'tcgtGGATCCggtc3'	5'tcgtcGGATCCtc3'
KpnI	GGTACC	5'tcgGGTACCgat3'	5'tcgtGGTACCggtc3'	5'gggtcGGTACCtt3'
SmaI	CCCGGG	5'tcgCCCGGGgat3'	5'tcgtCCCGGGgcca3''	5'gggtcCCCGGGtcc3'
XbaI	TCTAGA	5'tcgTCTAGAgat3'	5'tcgtTCTAGAgctt3'	5'tcgtcTCTAGAtc3'

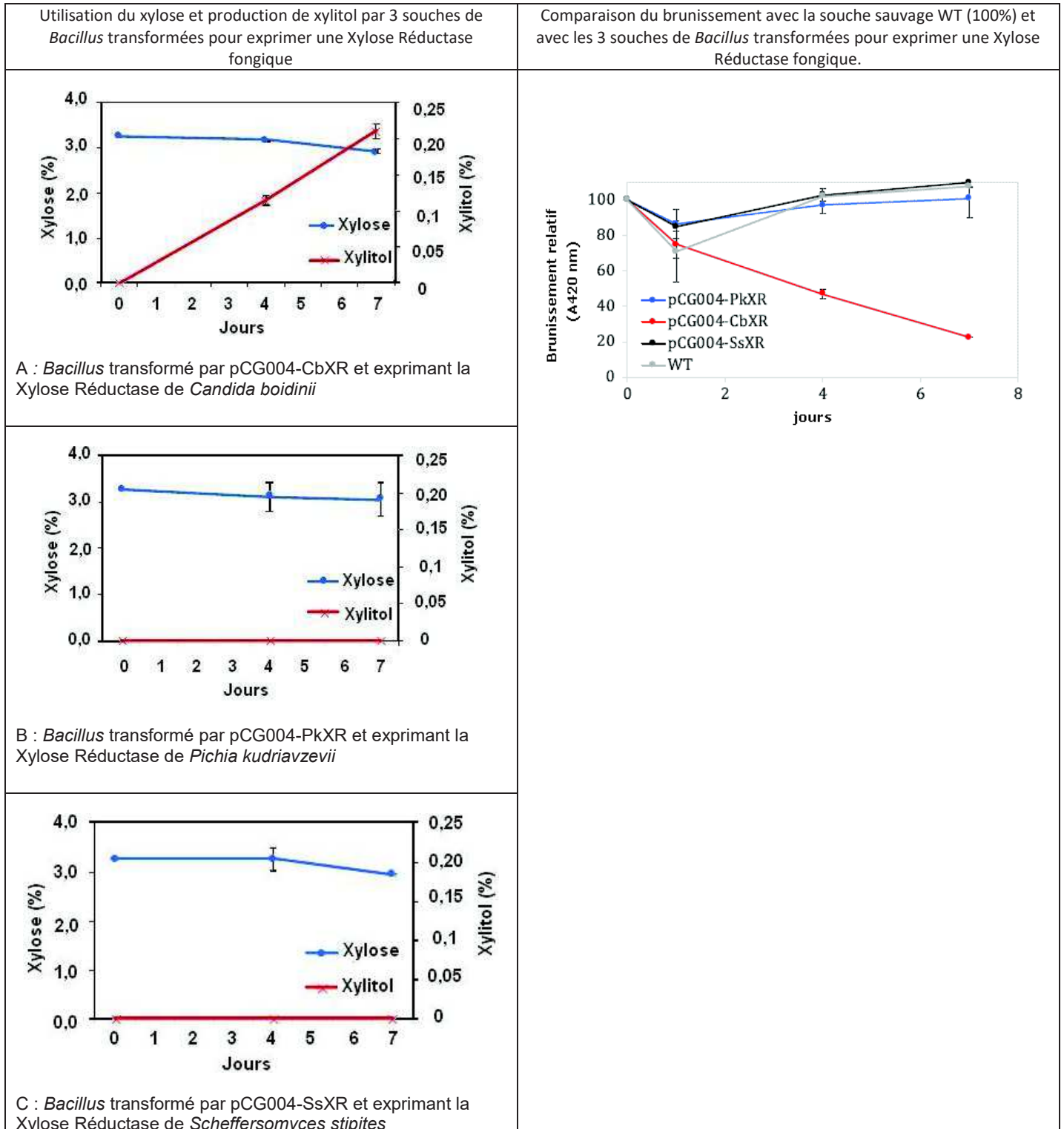
Source adaptée de: Towards semi-synthetic microbial communities: enhancing soy sauce fermentation properties in *B. subtilis* co-cultures, Det-Udom R, Gilbert C, Liu L, Prakitchaiwattana C, Ellis T, Ledesma-Amaro R. MicrobCellFact. 2019 Jun 3;18(1):101.

Document 12 - Test fonctionnel de l'activité Xylose Réductase de différentes espèces fongiques

Procédure expérimentale :

- Mise en culture des souches transformées sur milieu LB contenant de l'IPTG et 3% (m/v) de Xylose puis prélèvement d'une fraction de surnageant de culture tous les jours durant 7 jours ;
- Analyses de chaque prélèvement :
 - dosage du xylose et du xylitol par HPLC ;
 - mesure du brunissement (A_{420nm}) après induction de la réaction de Maillard (100°C, 4 h).

Résultats expérimentaux



Les échantillons sont préparés en double, les barres d'erreur représentent l'écart type

Source: Towards semi-synthetic microbial communities: enhancing soy sauce fermentation properties in *B. subtilis* co-cultures, Det-UdomR, Gilbert C, Liu L, Prakitchaiwattana C, Ellis T, Ledesma-Amaro R. MicrobCellFact. 2019 Jun;3:18(1):101.

Document 13 - Contrôle de l'efficacité des *Bacillus* transformés en co-culture

Les souches de *Bacillus* suivantes :

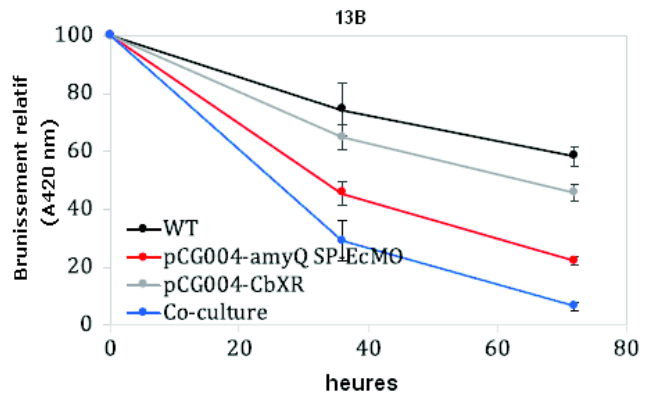
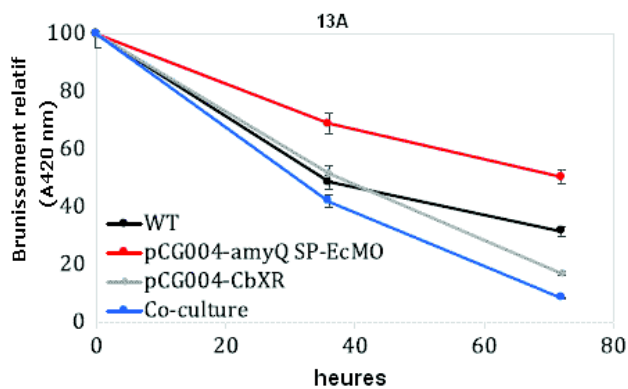
- souche sauvage : WT,
- *B. subtilis* transformé par pCG004-CbXR,
- *B. subtilis* transformé par pCG004-amyQSP-EcMO,
- *B. subtilis* pCG004-CbXR et *B. subtilis* pCG004-amyQSP-EcMO (co culture),

sont mises en culture sur milieu LB contenant de l'IPTG, 5% (m/v) de glucose et 0,5% (m/v) de xylose.

Deux échantillons de 1 mL de surnageant de chacune des 4 cultures sont prélevés à intervalle régulier pour les analyses.

Un échantillon est mis à bouillir durant 4 heures puis l'absorbance à 420 nm (A_{420nm}) est mesurée afin d'évaluer le rôle de la dégradation du xylose sur le brunissement ([document 13A](#)). L'autre échantillon est mélangé ensuite avec 500 μ L du premier, puis est incubé 2 jours à 37°C. La mesure de l' A_{420nm} permet alors d'évaluer l'effet de l'expression de la laccase sur le brunissement ([document 13B](#)).

Résultats



Les échantillons sont préparés en double, les barres d'erreur représentent l'écart type

Source: Towards semi-synthetic microbial communities: enhancing soy sauce fermentation properties in *B. subtilis* co-cultures, Det-Udom R, Gilbert C, Liu L, Prakitchaiwattana C, Ellis T, Ledesma-Amaro R. MicrobCellFact.2019 Jun3;18(1):101.

FIN DU SUJET