

# BREVET DE TECHNICIEN SUPERIEUR BIOANALYSES ET CONTROLES

## Microbiologie et technologies d'analyses

### Examen du 3<sup>e</sup> trimestre

#### INDUSTRIE COSMETIQUE ET MICRO-ORGANISMES

#### CORRIGE

### 1. Production industrielle d'un bioémulsifiant : l'alsan: 37 points

#### 1.1. **Systématique bactérienne**

1.1.1. **Eucaryotes, Eubactéries et Archéobactéries.**(1.5 pt)

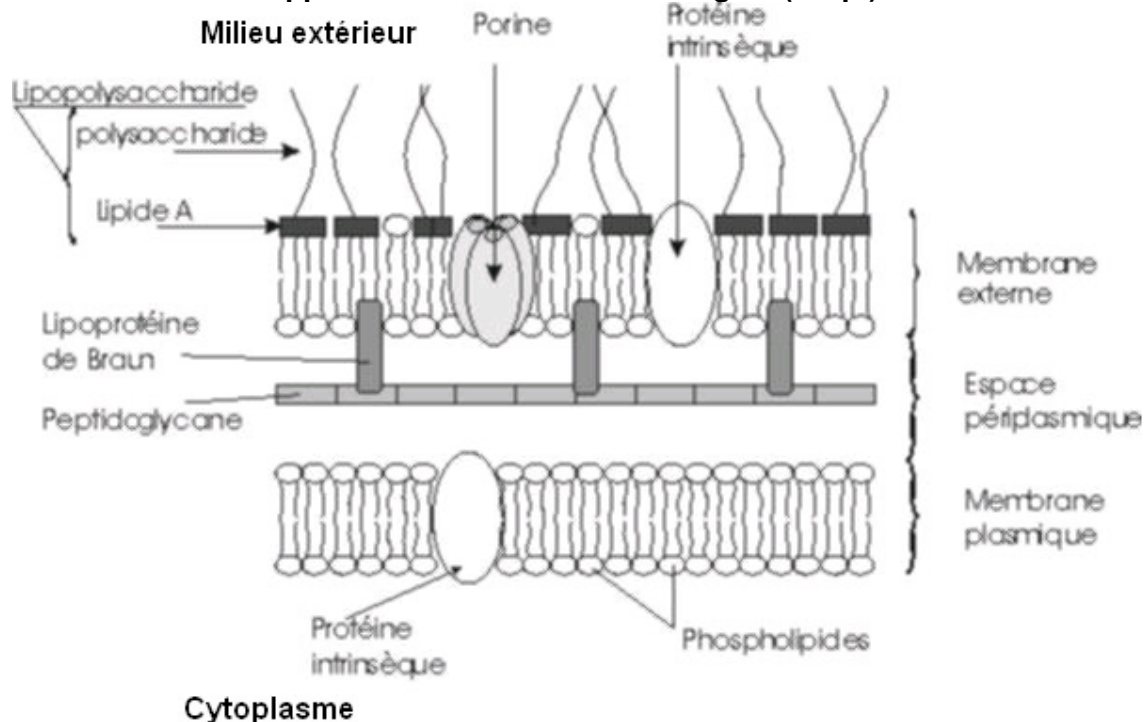
1.1.2. *Acinetobacter* est une **eubactérie**. (0.5pt)

1.1.3. Champignons microscopiques unicellulaires (levures) et filamenteux (moisissures) ; algues unicellulaires et protozoaires. (1pt)

#### 1.2. **Structure bactérienne**

1.2.1. Mise en évidence d'une **zone claire** (dispersion des particules d'encre de Chine) autour des cellules bactériennes : il s'agit d'une **capsule** de nature **polyosidique**. Cette structure permet l'adhésion aux surfaces, la résistance à la phagocytose. Elle est impliquée dans la formation des biofilms. (2pt)

1.2.2. **Schéma des enveloppes d'une bactérie à Gram négatif** (2.5 pt)



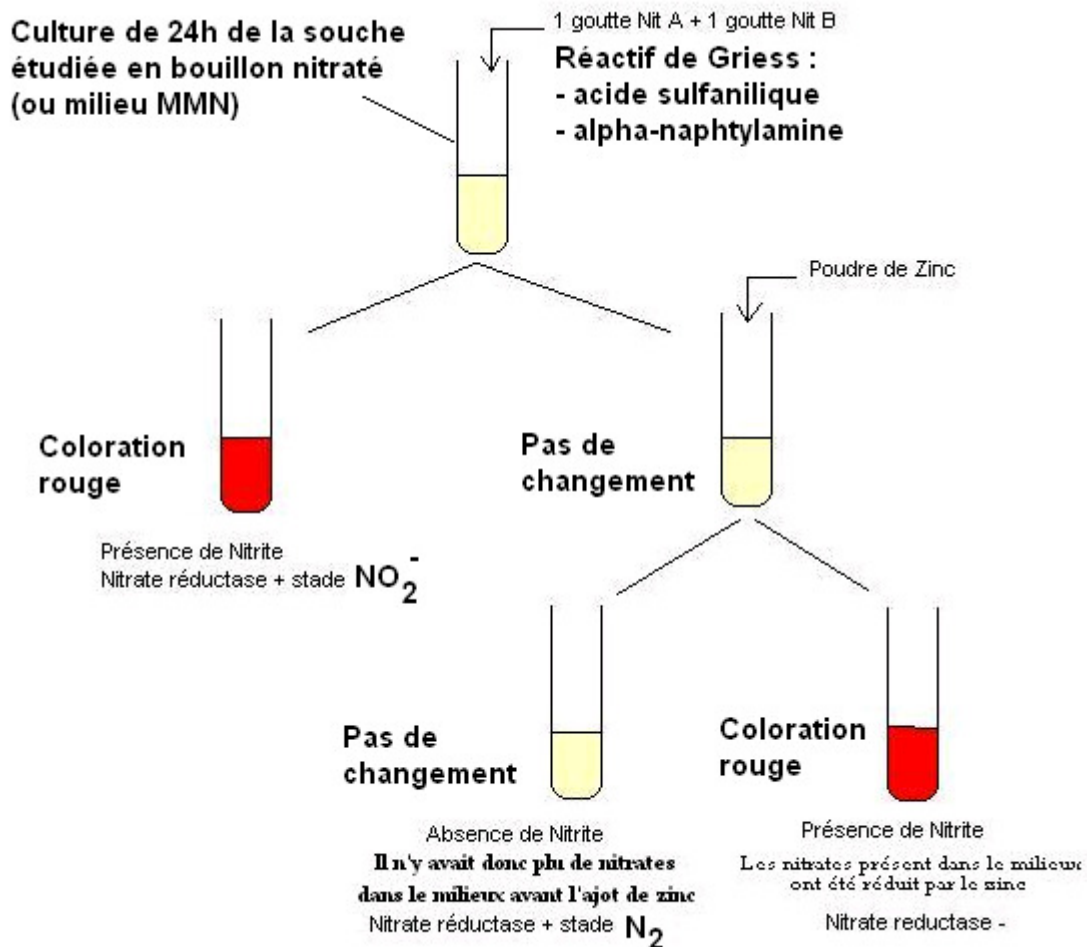
1.2.3. Peptidoglycane : (3pt)

- partie osidique = enchaînement de d'acide **N-acétyl muramique** (NAM) et de **N-acétyl glucosamine** (NAG) reliés par des **liaisons osidiques  $\beta$ -1,4**
- partie peptidique : chaque NAM est lié à un **térapeptide**
- les térapeptides des différentes chaînes polyosidiques sont liés entre eux par des *ponts interpeptidiques* (pentaglycine chez *S. aureus* par exemple).

### 1.3. Procédé de production

1.3.1. **Coccobacille** (parfois coccoïde, parfois plus polymorphe) **Gram négatif**, immobile, **oxydase négative**, **aérobie strict**, utilisant le glucose par voie oxydative (1.5pt)

1.3.2. (3pt)



1.3.3. (2pt)

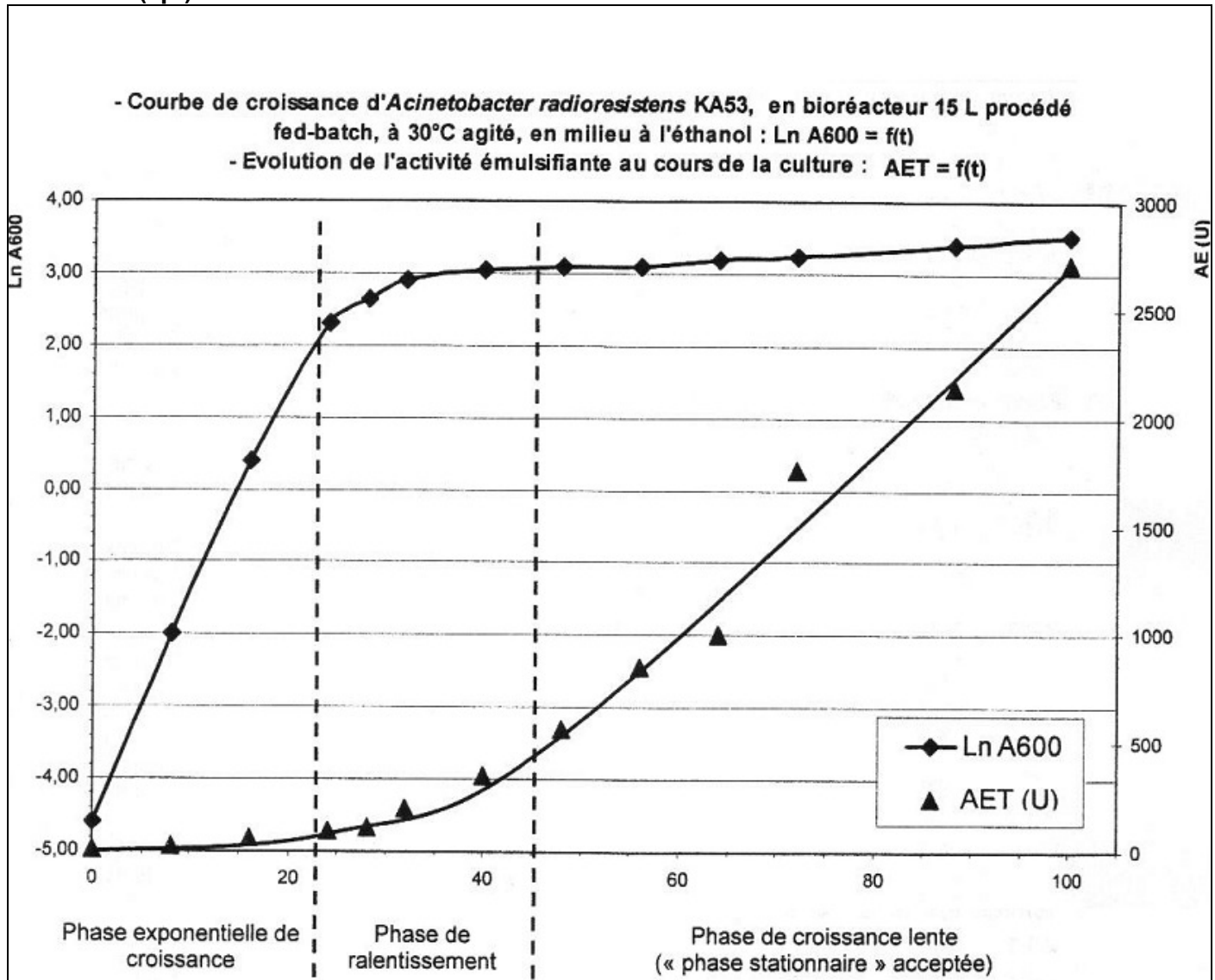
- Ethanol : source de **carbone** organique et d'énergie
  - Urée : source **d'azote** organique
  - Phosphate de sodium et de potassium : apport de **phosphore** et effet tampon
  - Sulfate de Magnésium : apport **d'ions  $\text{Mg}^{2+}$**  (cofacteur important pour de nombreuses réactions) et de **soufre**
  - Ions : apport **d'oligo-éléments** (nécessaires en faibles quantités)
- La composition exacte du milieu est connue : c'est un **milieu synthétique**.

1.3.4. (2.5pt)

1. Moteur (rotation des pales pour l'agitation)
2. Entrée d'air
3. Double enveloppe
4. Entrée d'eau dans la double enveloppe
5. Vidange de la cuve
6. Sortie des gaz
7. Sortie d'eau de la double enveloppe
8. Pales
9. Tuyau de prélèvement
10. « Bulleur » pour la fragmentation des bulles d'air (Spargeur)

1.3.5. (4pt)

1.3.6. (2pt)



1.3.7. (4pt)

Paramètres cinétiques de la croissance :

-  $\mu_{\text{expo}}$  = vitesse spécifique de croissance maximale = vitesse volumique de croissance rapportée à l'unité de biomasse pendant la phase exponentielle.

- G = temps de génération = temps de doublement de la population pendant la phase exponentielle de croissance.

Détermination graphique ou par le calcul acceptée. Pas d'ordre imposé pour le calcul de G et  $\mu_{\text{expo}}$ .

**Détermination de  $\mu_{\text{expo}}$  :**

$N = N_0 \cdot e^{\mu t} \Leftrightarrow \text{Ln } N = \text{Ln } N_0 + \mu t \rightarrow \mu_{\text{expo}}$  est donc la pente maximale de la courbe de croissance

Pour 2 points  $A_1$  et  $A_2$  pris en phase exponentielle :

$$\text{Ln } N_{A2} = \text{Ln } N_{A1} + \mu_{\text{expo}} (t_2 - t_1)$$

$$\mu_{\text{expo}} = (\text{Ln } N_{A2} - \text{Ln } N_{A1}) / (t_2 - t_1) = \text{pente de la droite de la phase expo}$$

$$\mu_{\text{expo}} \approx 0,3 \text{ h}^{-1} \text{ (calculable sans calculatrice avec les points 8h et 16h) ou } \mu_{\text{expo}} = \frac{\ln 2}{G}$$

**Détermination de G :**

$$G = t_2 - t_1 \text{ tel que } N_2 = 2 N_1 \text{ ou } G = \frac{\ln 2}{\mu_{\text{expo}}}$$

$$\text{Donc } \text{Ln } N_2 = \text{Ln } 2 + \text{Ln } N_1$$

Pour déterminer G graphiquement, on choisit en ordonnées  $\text{Ln } N_1$ , on ajoute  $\text{Ln } 2 = 0,7$  pour obtenir  $\text{Ln } N_2$  ( $\text{Ln } N_1$  et  $\text{Ln } N_2$  pris en phase expo), puis on reporte ces deux points sur la droite de la phase exponentielle puis sur l'axe des abscisses où on lit  $t_2 - t_1$  correspondant à G  $\rightarrow G \approx 2 \text{ h}$

1.3.8. (2pt)

La courbe de l'évolution de l'activité émulsifiante en fonction du temps présente deux phases : une première phase (jusqu'à ~ 25 h) de pente très faible (voire nulle) et une seconde phase de pente plus forte.

L'alsan est majoritairement produit à partir de la deuxième phase de la courbe de croissance (après 25 h, idiophase) : métabolite secondaire.

1.3.9. Il s'agit d'une **culture discontinue, sans soutirage, alimentée par un milieu nutritif**. Le volume du contenu du fermenteur augmente pendant la culture en fed-batch. (1.5pt)

Le but ici est de produire de l'alsan : on cherche donc à atteindre le plus rapidement possible la phase de production (qui correspond à la phase de croissance lente ou phase quasi-stationnaire) et on cherche à allonger le plus possible cette phase de production (idiophase). On n'alimente donc pas en substrat pendant les 30 premières heures pour « forcer » la bactérie à épuiser le milieu et que la biomasse atteigne une concentration suffisante. On ajoute ensuite progressivement du nouveau milieu, en quantité juste suffisante pour maintenir l'idiophase et donc la production du métabolite d'intérêt.

1.3.10. (1pt)

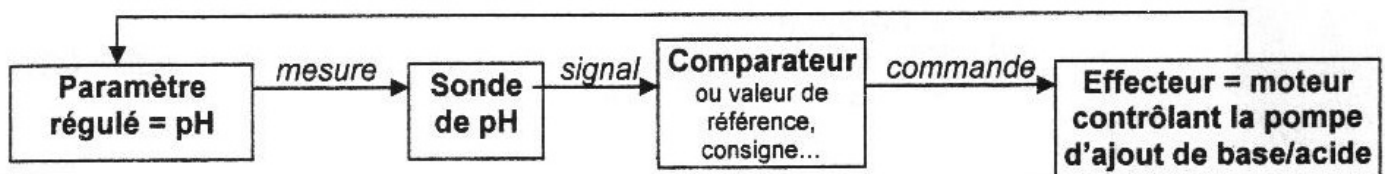
Productivité horaire finale en alsan : elle correspond à la quantité de produit formé par unité de temps, en fin de fermentation → il suffit de calculer la pente « apparente » de la courbe de production de l'émulsifiant en quantité, entre 0 h et 100 h.

-  $t_0 \rightarrow P_0 = 10 \text{ U}$  ;  $t_f \rightarrow P_f = 2710 \text{ U}$  (lus sur le tableau du document 4)

→  $PVH_f = (P_f - P_i) / (t_f - 0) = (2710 - 10) / 100 = 27 \text{ U.h}^{-1}$

1.3.11. Après mesure du pH par une sonde, celui-ci est ajusté automatiquement (boucle de régulation) :

- ajout de base (NaOH) si le pH diminue par rapport à la valeur de consigne
- ajout d'acide (HCl) si le pH augmente par rapport à la valeur de consigne (1pt)



1.3.12. (2pt)

Analyse : le document montre la variation de G en fonction de la température. On remarque un aspect en « cloche inversée » qui traduit l'existence d'une zone de températures optimales pour la culture de cette souche (quand G est le plus petit, entre 22 et 34°C). La température pour laquelle G est le plus petit est 30°C, ce qui correspond à la température choisie pour le procédé. La souche est donc mésophile.

## 2. Prévention des contaminations dans l'industrie cosmétique: 13 points

2.1. (2pt)

Un additif conservateur doit assurer :

- l'innocuité du produit, par l'inhibition de la multiplication des microorganismes pathogènes éventuellement présents et de la production de toxines.
- la stabilité du produit par l'inhibition des microorganismes d'altération.

2.2. (1.5pt)

Un challenge-test sert à vérifier l'efficacité du conservateur présent dans un produit cosmétique, au cours du temps.

2.3. (3pt)

Analyse des résultats du challenge-test :

- *P. aeruginosa* : réduction > 2 log à 2 jours ; > 3 log à 7 jours ; P.A.U. à 14 jours ; réaugmentation à 28 jours → conservateur non efficace contre ce germe à long terme.
- *S. aureus* : réduction > 2 log à 2 jours ; > 3 log à 7 jours ; P.A.U. à 14 jours ; P.A.U. à 28 jours → conservateur efficace contre ce germe à long terme.
- *C. albicans* : réduction > 2 log à 14 jours ; P.A.U. à 28 jours → conservateur efficace contre ce germe à long terme.
- *A. niger* : réduction > 2 log à 14 jours ; P.A.U. à 28 jours → conservateur efficace contre ce germe à long terme.

2.4.

2.4.1. (1.5pt)

CMI = concentration minimale inhibitrice = plus petite concentration en conservateur capable d'empêcher le développement d'un microorganisme particulier (= aucune croissance visible).

2.4.2. (3pt)

Analyse des résultats de la CMI :

- boîte témoin (0 %) : culture des 3 souches → le milieu gélosé utilisé n'inhibe pas la croissance des souches testées.
- souche M : croissance jusqu'à 0,025 %, pas de croissance à partir de 0,05 % → CMI = 0,05 % ou  $0,025 \% < CMI \leq 0,05 \%$ .
- souche P : croissance sur toutes les boîtes testées → CMI > 0,4 %.
- souche B : croissance jusqu'à 0,1 %, pas de croissance à partir de 0,2 % → CMI = 0,2 % ou  $0,1 \% < CMI \leq 0,2 \%$ .

2.4.3. (2pt)

Le PHBM est présent dans la crème cosmétique à 0,2 % (1,0 g pour 500 g total →  $1/500 = 0,2 \%$ ).

D'après les résultats précédents, il sera :

- efficace contre *Micrococcus luteus* car la CMI du PHBM vis-à-vis de *M. luteus* est strictement inférieure à 0,2 %.
- non efficace contre *Pseudomonas aeruginosa* car la CMI du PHBM vis-à-vis de *P. aeruginosa* est strictement supérieure à 0,2 %.
- efficace contre *Bacillus licheniformis* car la CMI du PHBM vis-à-vis de *B. licheniformis* est inférieure ou égale à 0,2 %.