

EPREUVE E5. UNITE U51.
ETUDE D'OPERATIONS TECHNIQUES

PROBLEMES D'ACTUALITE DANS L'INDUSTRIE LAITIERE

Calculatrice autorisée

Les trois parties du sujet sont indépendantes

1) Recherche et dénombrement des bactériophages au cours de la fabrication d'un fromage de type Saint-Paulin (24 points)

Dans un laboratoire de recherche laitière, une souche de *Lactococcus lactis* génétiquement modifiée est utilisée en tant que levain lactique dans la fabrication d'une pâte pressée de type Saint-Paulin dans le but d'améliorer les qualités organoleptiques de ce fromage.

Le laboratoire constate, au cours de la fabrication du fromage, un défaut d'acidification dû probablement à une contamination par un bactériophage.

Différents prélèvements P1 à P8 sont effectués pendant la fabrication (**voir document 1**).

1-1) Au cours de la transformation du lait une pasteurisation est réalisée à 74°C pendant 30 secondes ou à 82°C pendant 12 secondes, ces barèmes étant fonction de la propreté du lait. Présenter l'intérêt de la pasteurisation et ses conséquences sur la flore du lait cru.

1-2) Deux épreuves de recherche d'enzymes, la phosphatase alcaline et la peroxydase (**document 2**), permettent de contrôler les barèmes de pasteurisation du lait précisés en **1-1**).

1-2-1) Pourquoi *Mycobacterium tuberculosis* est-il choisi comme référence dans les barèmes de pasteurisation ?

Justifier à l'aide du **document 2**.

1-2-2) Dégager l'intérêt des épreuves de recherche de la phosphatase alcaline et de la peroxydase pour contrôler chacun de ces barèmes.

1-3) La recherche des bactériophages peut être réalisée par la technique au lait tournesolé qui permet de déceler rapidement et simplement leur présence dans le lait.

Une fraction de chaque prélèvement P1 à P8 est testée. Les résultats obtenus sont groupés dans le **document 3**.

1-3-1) Donner la composition du tube correspondant au prélèvement P8 dans le test au lait tournesolé. Indiquer son rôle en le justifiant.

1-3-2) Analyser les résultats du tableau (**document 3**) et, à l'aide du **document 1**, émettre une hypothèse sur l'origine de la contamination par des bactériophages au cours du processus de fabrication du fromage.

1-4) Sur une fraction de certains prélèvements (échantillons 5, 6, 7, 8), on effectue l'épreuve «des microgouttes de Hull» (**document 4**) par obtention de plages de lyse.

1-4-1) Justifier la centrifugation et la filtration.

1-4-2) Présenter sous forme de tableau les résultats obtenus après incubation.

1-4-3) Calculer le nombre de bactériophages présents dans chaque prélèvement par mL.

1-4-4) Que penser des résultats obtenus ?

2) Valorisation des protéines du lactosérum (38 points)

Le **document 5** résume les différentes étapes de fractionnement et de purification de deux protéines du lactosérum :

- la **lactoferrine** (LF), glycoprotéine de masse moléculaire 77 000 d, qui contient deux sites de fixation pour l'ion fer III, est utilisée pour compléter les laits maternisés ;
- la **lactoperoxydase** (LP), métalloenzyme de masse moléculaire 82 000 d, exerce un effet antibactérien ; on l'utilise comme additif dans l'industrie laitière pour la conservation du lait cru.

2-1) Déminéralisation du lactosérum et concentration des protéines : obtention d'un rétentat de lactosérum

Le lactosérum (LS), obtenu après caillage du lait, est très riche en sels minéraux. Leur élimination est indispensable pour faciliter la purification des protéines.

Différentes méthodes sont utilisées par les industriels pour déminéraliser le lactosérum : l'osmose inverse, l'électrodialyse et l'ultrafiltration.

2-1-1) Préciser dans quel(s) cas la déminéralisation s'accompagne d'une concentration du rétentat. Justifier.

2-1-2) Déminéralisation du lactosérum par ultrafiltration.

On traite le lactosérum (LS) sur une unité pilote de surface membranaire de 8 m² et de seuil de coupure de masse moléculaire de 10 000 d. Cette opération conduit à l'obtention d'un rétentat (R) de lactosérum.

2-1-2-1) Commenter les caractéristiques de la membrane.

2-1-2-2) A l'aide du **document 6**, donner la composition qualitative du rétentat (R).

2-2) Purification de la lactoferrine et de la lactoperoxydase à partir du rétentat (R)

La lactoferrine et la lactoperoxydase peuvent être purifiées à l'échelle industrielle de manière satisfaisante, en une seule étape, par chromatographie sur colonne d'échange d'ions.

La présence de lipides dans le rétentat (R) de lactosérum étant un obstacle à la bonne mise en oeuvre de cette technique, on réalise une centrifugation.

On obtient le rétentat dégraissé (Rd).

La résine utilisée est une Carboxyméthyl-Sépharose CL6B fast flow.

Le **document 7** résume les principaux temps de la réalisation de la chromatographie.

Le **document 8** représente le profil d'élution obtenu.

2-2-1) A quel type de résine échangeuse d'ions appartient la Carboxyméthyl-Sépharose CL6B fast flow ? Justifier.

2-2-2) Indiquer les phénomènes qui caractérisent les étapes (1), (3), (4), (5) et (6), en précisant :

- le sens du mot «batch» et l'intérêt de cette technique,
- la composition du filtrat,
- le mode d'élution des deux protéines à purifier ; s'agit-il d'une élution en isocratique, en gradient continu ou en gradient discontinu ? (Justifier la réponse).

Indiquer dans quelles gammes de pH se situent les pHi de ces deux protéines.

2-2-3) Déterminer les volumes d'élution de la lactoferrine et de la lactoperoxydase.

2-3) Vérification de la pureté des fractions A et B par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de Sodium Dodécyl Sulfate (SDS-PAGE)

Une SDS-PAGE est réalisée sur les fractions A et B afin de vérifier leur pureté.

Les conditions de la réalisation de l'électrophorèse, ainsi que l'électrophorégramme obtenu sont donnés dans le **document 9**.

2-3-1) A quoi correspondent les pourcentages mentionnés à propos des gels de concentration et de résolution ? (Justifier la réponse).

2-3-2) Indiquer les rôles :

- de l'acrylamide et du bisacrylamide,
- du SDS,
- du Temed,
- du persulfate d'ammonium,
- du 2-mercaptoéthanol,
- du glycérol,
- du bleu de bromophénol.

2-3-3) En précisant les fonctions respectives des gels de concentration et de résolution, expliquer le principe de base permettant la séparation des protéines dans une SDS-PAGE.

2-3-4) Les fractions A et B sont-elles pures ? (Justifier la réponse).

2-3-5) Tracer sur papier millimétré la courbe de calibration du gel :
 $\log(\text{masse moléculaire}) = f(\text{distance de migration dans le gel de résolution})$.

Données :

Protéines	Masses moléculaires (d)
β -Galactosidase	116 000
Phosphorylase b	97 400
Sérumalbumine bovine	66 000
Ovalbumine	45 000
Anhydrase carbonique	29 000

2-3-6) En déterminant la masse moléculaire des protéines contenues dans les fractions A et B, vérifier leur nature.

3) Validation d'un procédé de thermoprécipitation des protéines du rétentat de lactosérum par des méthodes immunologiques (18 points)

La β lactoglobuline du lait de vache (masse moléculaire : 36000 d, pHi = 5,2) jouerait un rôle important dans les phénomènes allergiques dits "d'intolérance au lait", fréquents chez les nouveau-nés nourris au lait maternisé d'origine bovine. Un procédé de thermoprécipitation des protéines du rétentat de lactosérum (à pH 4,2 et à 65°C) permettrait de sélectionner les protéines d'intérêt alimentaire dans le précipité et d'éliminer la β lactoglobuline indésirable dans le surnageant.

La technique d'immunodiffusion radiale (IDR) de Mancini est adaptée au dosage de la β lactoglobuline à condition de disposer d'anticorps anti β lactoglobuline spécifiques.

1er temps : production d'immunoglobulines chez le lapin

2ème temps : vérification de la spécificité des anticorps produits par immunoélectrophorèse

3ème temps : dosage de la β lactoglobuline par immunodiffusion radiale dans le rétentat de lactosérum et dans le surnageant obtenu après thermoprécipitation.

3-1) Vérification de la spécificité des anticorps produits chez le lapin par immunoélectrophorèse

L'immunoélectrophorèse est une électrophorèse des protéines antigéniques d'un mélange suivie d'une immunodiffusion. La technique est réalisée dans les conditions décrites ci-dessous :

- milieu gélifié, pH 8,2 (tampon barbital-barbital sodé)
- on introduit :
 - puits N°1 : le lactosérum
 - puits N°2 : une solution de β lactoglobuline, sous un volume de 4 μ L
- la migration est effectuée à 100 V - 40 min
- après migration, la gouttière est remplie avec 80 μ L des immunoglobulines produites chez le lapin
- la diffusion dure 24 h en chambre humide
- après lavage en NaCl à 0,85 %, on observe les arcs de précipitation.

Le résultat obtenu est présenté **document 10**.

3-1-1) Justifier le sens de migration de la β lactoglobuline.

3-1-2) Préciser l'intérêt du lavage en NaCl à 0,85 %.

3-1-3) Les anticorps produits par le lapin sont-ils spécifiques de la β lactoglobuline ? Justifier.

3-2) Dosage de la β lactoglobuline par immunodiffusion radiale

Pour valider le procédé de thermoprécipitation, on dose la β lactoglobuline par immunodiffusion radiale :

- d'une part sur le rétentat de lactosérum avant thermoprécipitation : R ;
- d'autre part sur le surnageant obtenu après thermoprécipitation : S.

Les anticorps anti β lactoglobuline produits chez le lapin sont inclus à concentration optimale dans un gel d'agarose coulé en boîte de Pétri. Des puits sont creusés et remplis avec 8 μ L :

- puits 1 à 3 : solutions étalons de β lactoglobuline ;
- puits 4 : R ;
- puits 5 : S.

Après 2 jours d'incubation en chambre humide, on mesure le diamètre des anneaux obtenus. Les résultats sont regroupés dans le tableau ci-dessous :

Puits N°	diamètre en mm (D)
1 : solution étalon de β lactoglobuline à 10 g.L ⁻¹	6
2 : solution étalon de β lactoglobuline à 20 g.L ⁻¹	8
3 : solution étalon de β lactoglobuline à 30 g.L ⁻¹	9,5
4 : rétentat de lactosérum R	8,5
5 : surnageant de thermoprécipitation S	7,5

3-2-1) Donner le principe de la formation des anneaux.

Que se passe-t-il si on diminue la concentration en anticorps dans le gel ?

3-2-2) D'après Mancini, le carré du diamètre de l'anneau est une fonction linéaire de la concentration C en antigène.

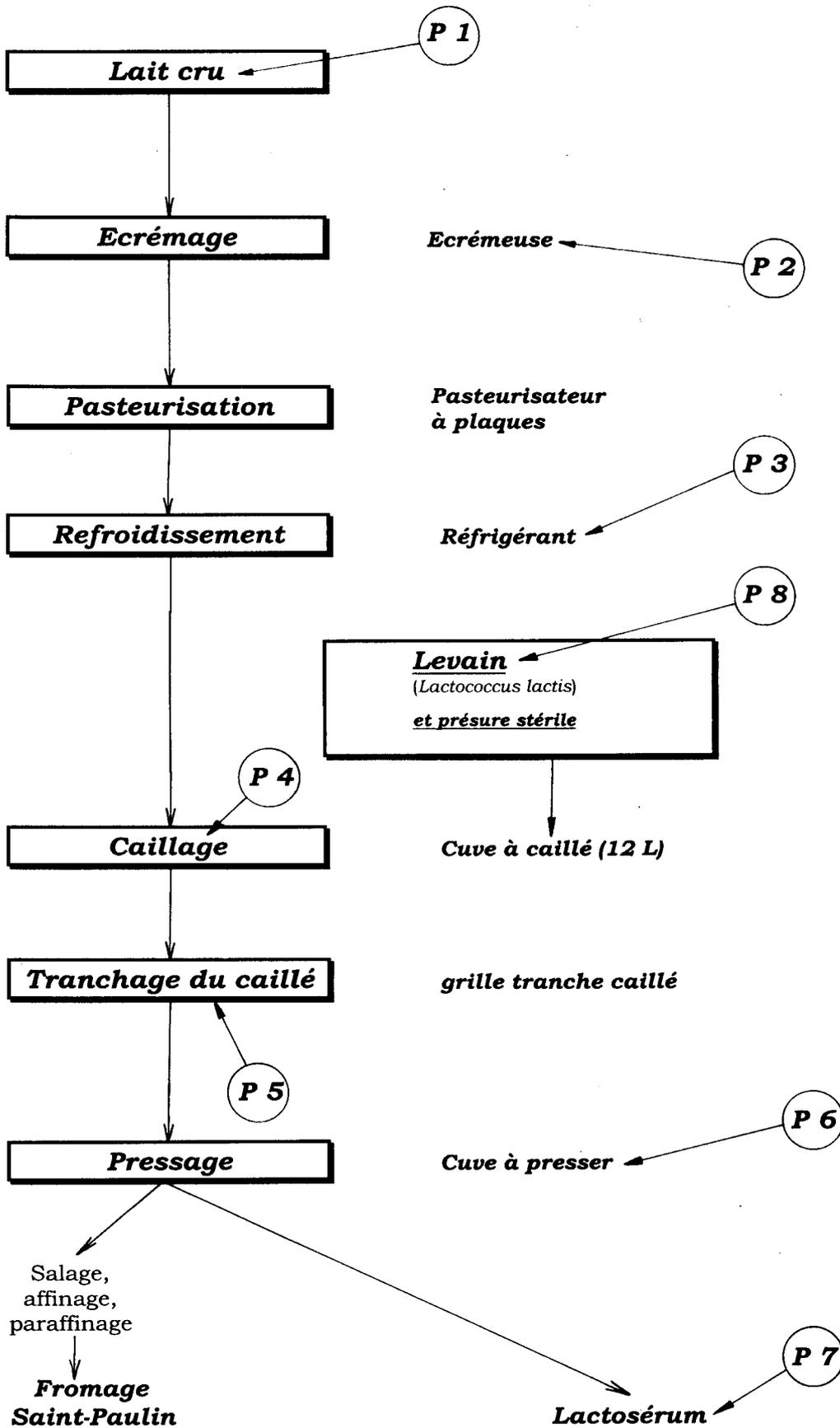
- Tracer, sur papier millimétré, la fonction $D^2 = aC + b$ en utilisant les résultats du tableau.

- Commenter le point du graphe pour lequel la concentration en antigène est égale à 0 g.L⁻¹.

3-2-3) Déterminer graphiquement la concentration en β lactoglobuline de R et de S. Le procédé de thermoprécipitation permet-il d'éliminer totalement la β lactoglobuline contenue dans le rétentat de lactosérum ?

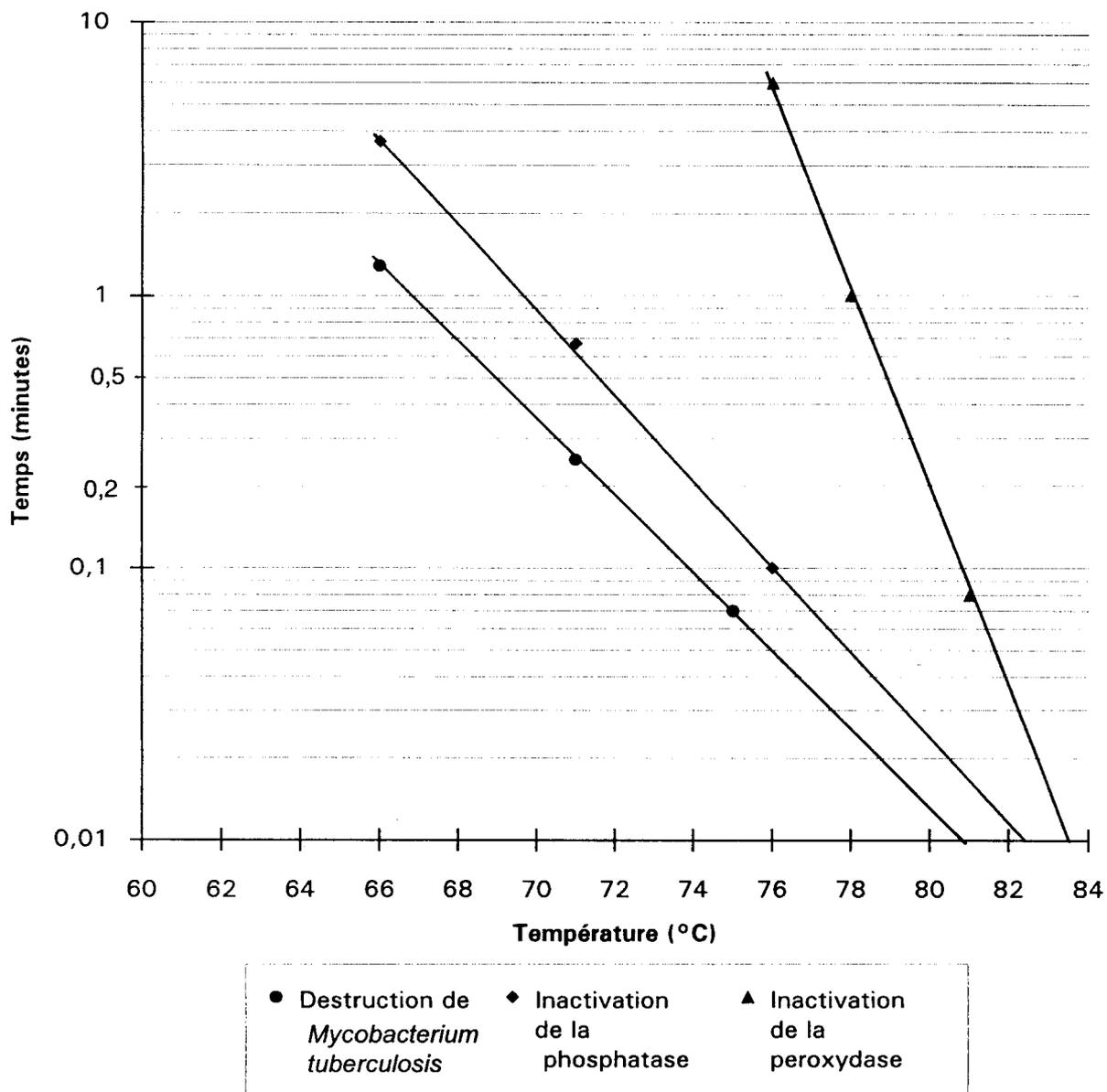
DOCUMENT N°1 :

Diagramme de fabrication des fromages à pâte pressée de type Saint-Paulin



DOCUMENT N°2 :

Le temps et la température nécessaires pour l'inactivation de *Mycobacterium tuberculosis* et de certains enzymes du lait.



DOCUMENT N°3 :**le lait tournesolé****Composition**

Lait écrémé	1 L
Teinture de tournesol	20 mL
pH	7,2

Répartir en tube (10 mL par tube) et autoclaver à 110°C pendant 20 minutes.

Le tournesol est à la fois un indicateur de pH (zones de virage : pH inférieur à 6 : rose, pH supérieur à 8 : bleu) et un indicateur d'oxydo-réduction (réduit : incolore, oxydé : bleu-violacé).

Technique d'utilisation

Dans un tube de lait tournesolé, introduire 0,5 mL de levain (*Lactococcus lactis*) et 1 mL de prélèvement. Incuber 4 heures à 30°C.

Tableau de résultats

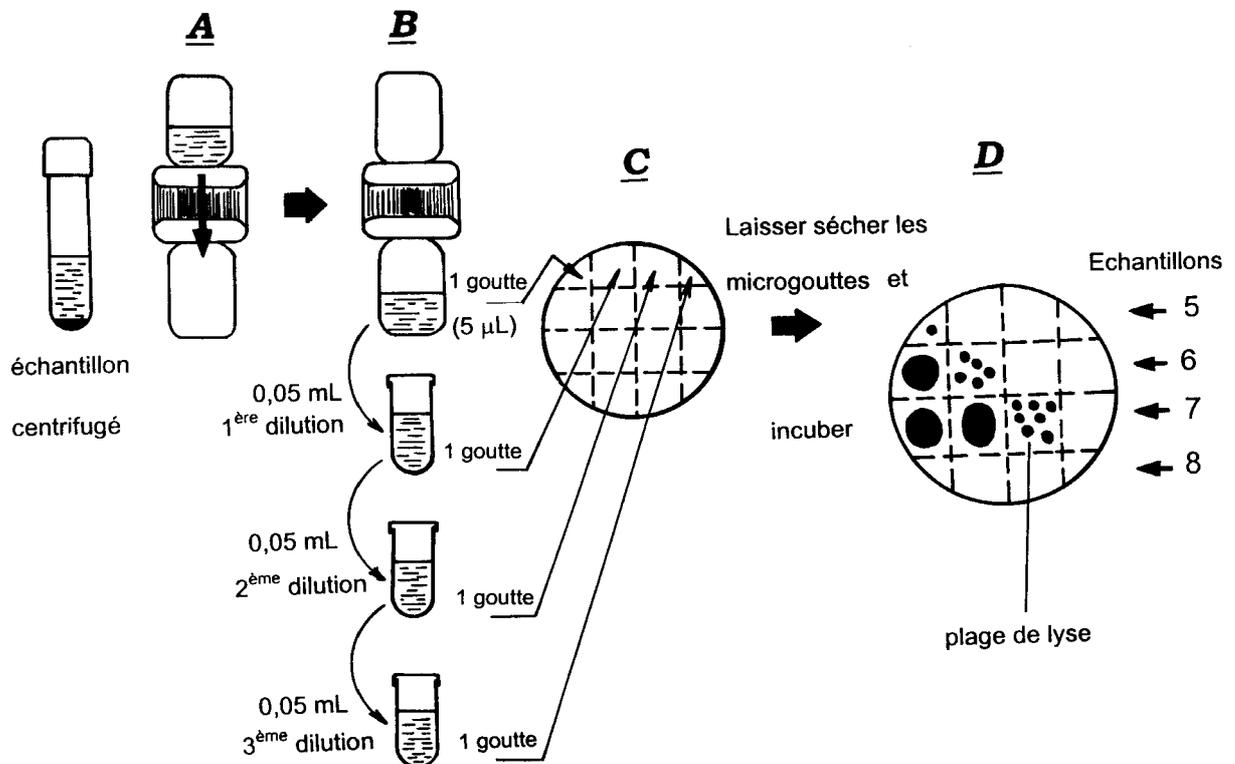
Prélèvement N°	P 1	P 2	P 3	P 4	P 5	P 6	P 7	P 8
Lecture après 2 heures	A	A	-	A	-	-	-	A
Lecture après 4 heures	C R	C R	-	C R	-	-	-	C R

A = acidification

C = coagulation

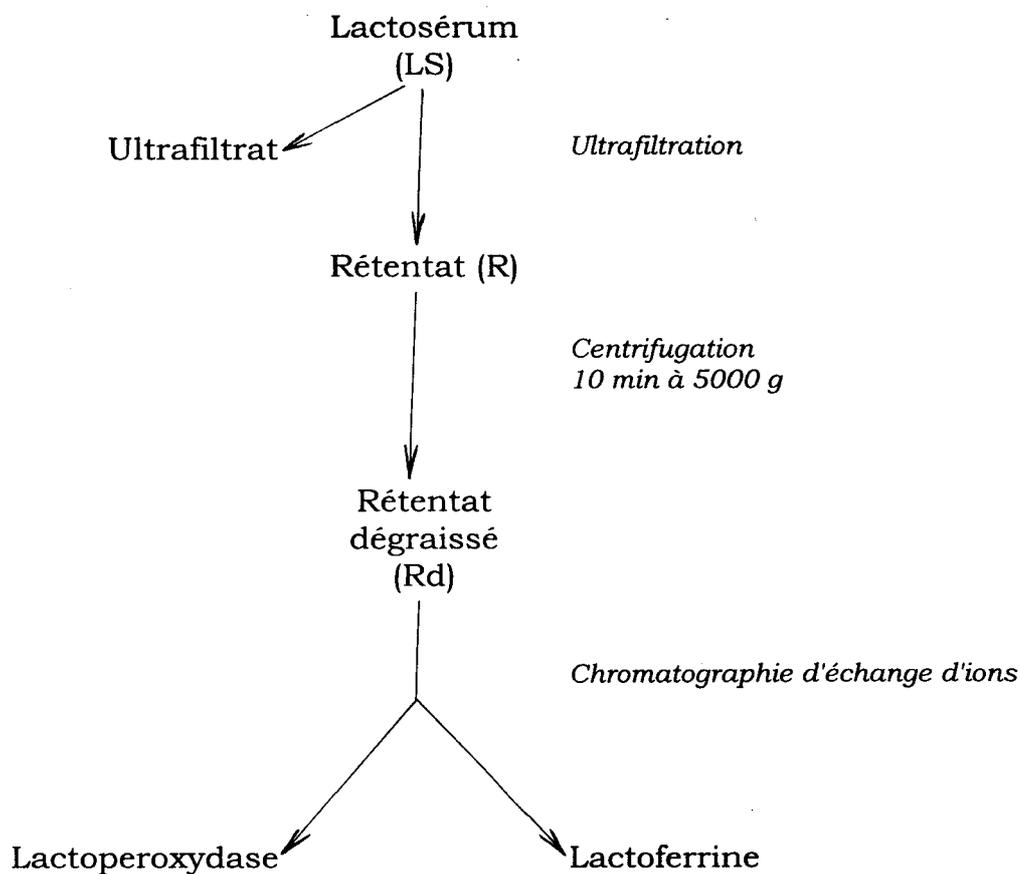
R = réduction

- = absence d'acidification, de coagulation, de réduction.

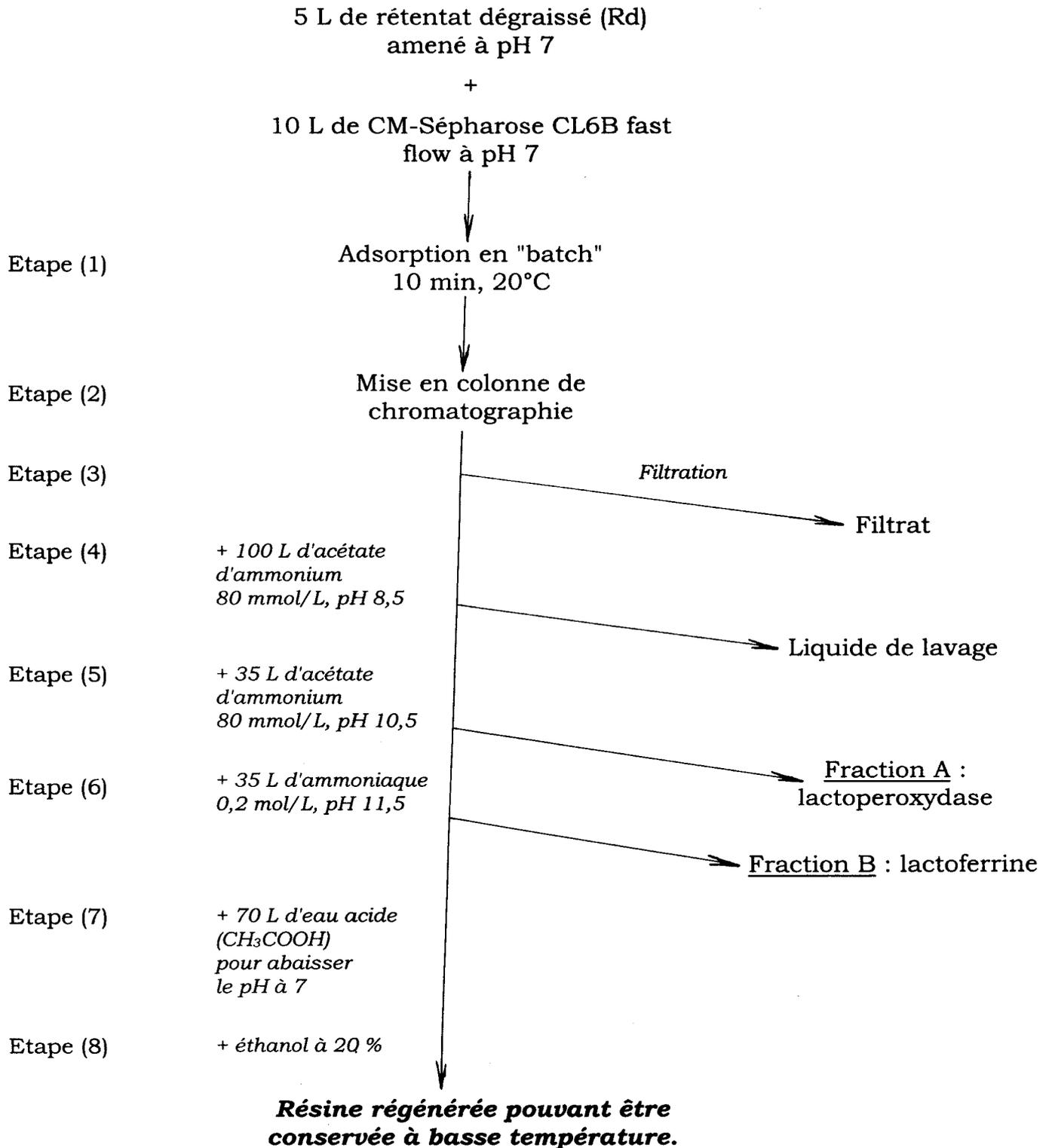
DOCUMENT N°4

Dénombrement des bactériophages par la technique des microgouttes de Hull

- A** : La filtration du surnageant de centrifugation est réalisée sur une membrane filtrante de porosité 0,45 μm .
- B** : Dilutions successives : le volume de diluant (lait écrémé à 0,1 %) est de 4,95 mL.
- C** : Le dépôt des gouttes est réalisé sur une gélose molle M17 préalablementensemencée dans la masse avec *Lactococcus lactis* et l'incubation est de 30°C pendant 6 à 8 heures. Une goutte correspond à 5 μL .
- D** : Résultats obtenus après 6 à 8 heures d'incubation.

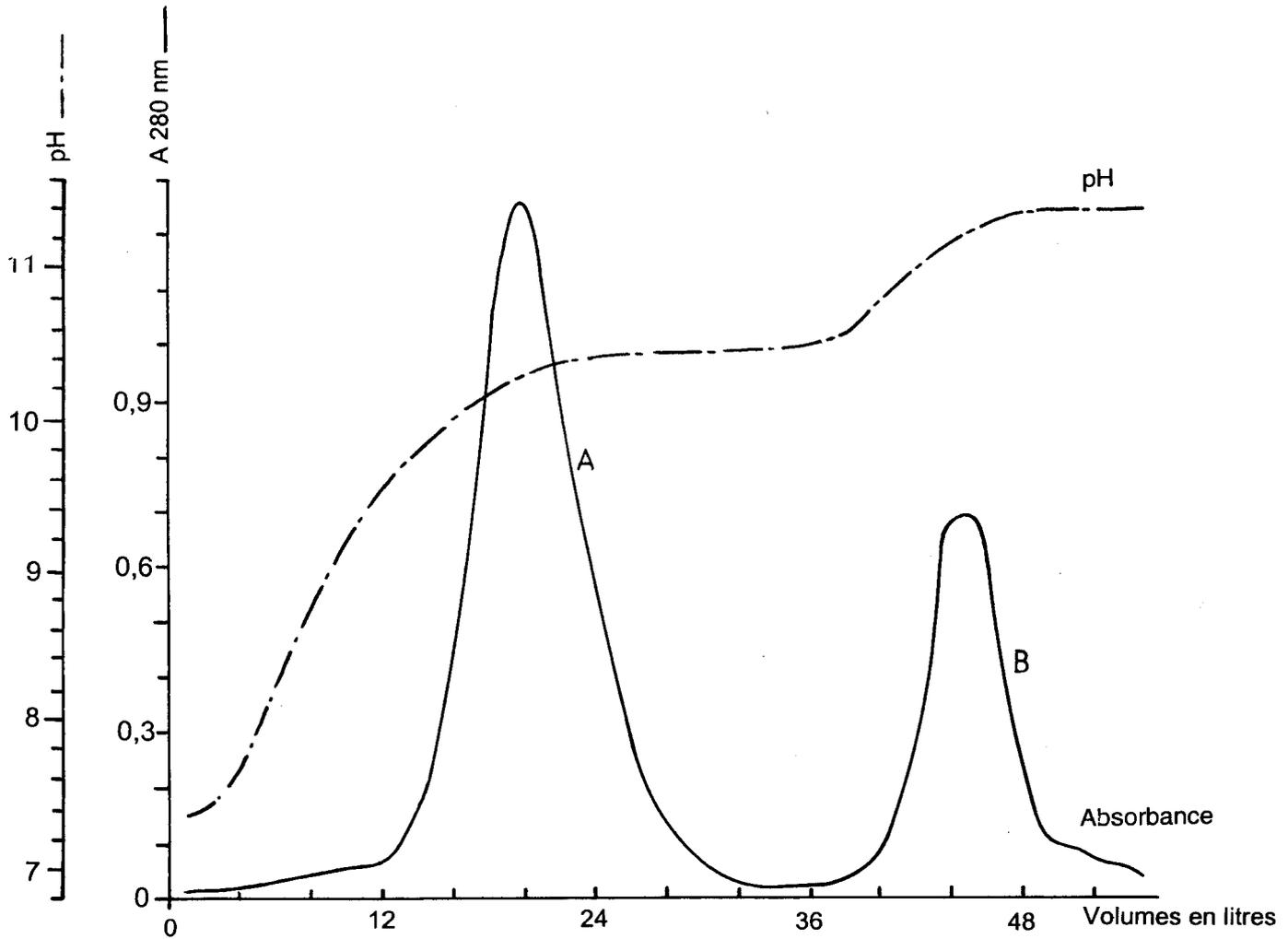
DOCUMENT N°5 :**Schéma général du procédé industriel d'extraction et de purification de protéines du lactosérum****DOCUMENT N°6 :****Composition moyenne du lactosérum en g/100 mL**

	Lactosérum
Eau	93,0
Matières grasses	0,4
Caséines	traces
Protéines solubles	0,9
Lactose	5,0
Sels minéraux	0,6

DOCUMENT N°7 :**Etapes de purification de la lactoferrine et de la lactoperoxydase
par chromatographie d'échange d'ions**

DOCUMENT N°8 :

**Profil d'éluion de la lactoperoxydase (fraction A)
et de la lactoferrine (fraction B) obtenu par chromatographie d'échange d'ions
sur CM-Sépharose CL6B fast flow**



DOCUMENT N°9 :**Conditions de réalisation de la SDS-PAGE et électrophorégramme obtenu**

On utilise une solution stock d'acrylamide contenant 29,2 g d'acrylamide et 0,8 g de bisacrylamide pour 100 mL.

Deux gels sont préparés et coulés successivement entre deux plaques de verre :

	gel de concentration à 4,5 %	gel de résolution à 12,6 %
solution stock d'acrylamide	1,5 mL	4,2 mL
tampon pH 8,8	940 µL	2,5 mL
SDS	100 µL	100 µL
eau	7,35 mL	3,12 mL
Temed (N,N,N',N'- tétraméthylènediamine)	10 µL	5 µL
persulfate d'ammonium	100 µL	75 µL

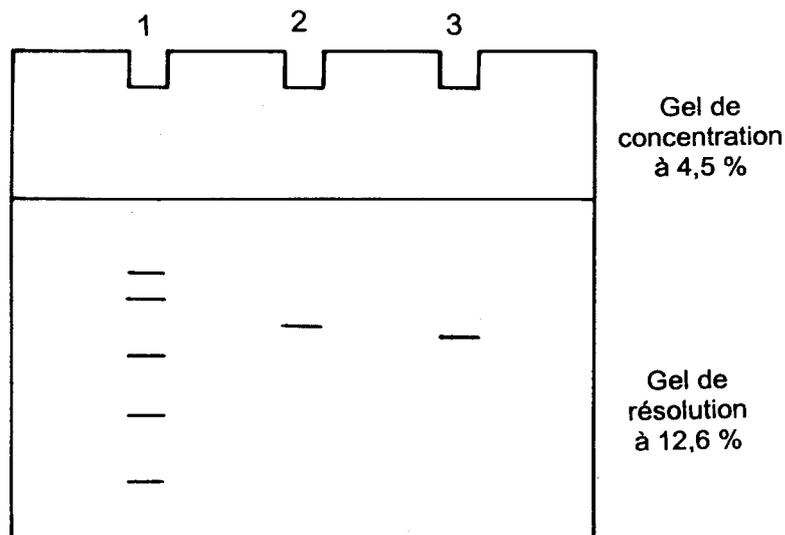
Tous les échantillons à déposer sont traités au bain-marie à ébullition pendant 5 minutes en présence de SDS, de 2-mercaptoéthanol, de bleu de bromophénol et de glycérol.

Trois dépôts sont effectués dans des puits aménagés dans le gel de concentration :

- puits 1 : 2 µL de marqueurs de masses moléculaires connues,
- puits 2 : 2 µL de fraction A,
- puits 3 : 2 µL de fraction B.

On laisse migrer pendant 1h30 à 150 V dans un tampon d'électrophorèse pH 8,3.

Le gel est alors démoulé, plongé dans un bain de coloration (bleu de Coomassie) et décoloré ; on obtient l'électrophorégramme suivant, représenté à l'échelle réelle obtenue :



DOCUMENT N°10 : Immunoélectrophorèse

