

BTS QUALITÉ DANS LES INDUSTRIES ALIMENTAIRES ET LES BIO-INDUSTRIES

Session 2001

E3 BIOCHIMIE – BIOLOGIE – U3

Durée : 4 heures

Coefficient : 5

L'usage de la calculatrice est autorisé.

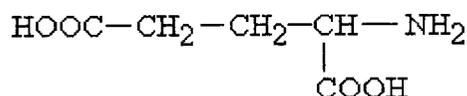
LES EXHAUSTEURS DE GOÛT

Un exhausteur de goût est une substance qui, présente dans un aliment, accentue sa saveur sans en apporter elle-même. Les véritables exhausteurs de goût sont le glutamate monosodique (E 621), la guanosine 5' monophosphate (GMP - E 631) et l'inosine 5' monophosphate (IMP - E 627). Ces additifs sont utilisés pour des produits tels que les soupes, le bouillon de viande, la chair à saucisse, le concentré de tomate etc...

BIOCHIMIE (45 points)

Le glutamate monosodique est produit par *Corynebacterium glutamicum* qui, cultivée sur un substrat glucosé, sécrète cet acide aminé en grande quantité dans le milieu.

1. La formule de l'acide glutamique est la suivante :



Les pK des fonctions ionisables sont :

$$\begin{array}{l} \text{pK } \alpha\text{COOH} = 2,19 \\ \text{pK } \alpha\text{NH}_2 = 9,67 \\ \text{pK } \gamma\text{COOH} = 4,25 \end{array}$$

- 1.1. Ecrire les différentes formes ioniques de l'acide glutamique en fonction du pH.
 - 1.2. Définir et calculer le pHi (pH isoionique) de cet acide aminé.
 - 1.3. Quelle est la forme ionique de l'acide glutamique en solution dans l'eau ?
En déduire le pH de cette solution.
 - 1.4. Ecrire la formule du glutamate monosodique.
2. Pour séparer l'acide glutamique des autres constituants présents dans le milieu de culture, on peut effectuer une chromatographie d'échange d'ions. Le milieu est amené à pH 2 puis traité sur une résine polystyrénique substituée par des radicaux sulfonate (- SO₃⁻).

2.1. Quel est le principe de la chromatographie d'échange d'ions ?

2.2. Dans ces conditions l'acide glutamique est-il retenu par la résine ou élué ? Justifier votre réponse.

Donnée : les radicaux sulfonate - SO_3^- sont totalement ionisés à pH 2.

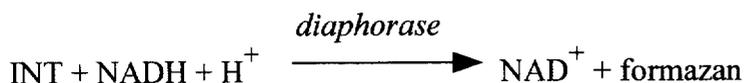
3. L'acide L glutamique est dosé dans les produits finis afin de vérifier si la proportion trouvée correspond aux spécifications. Ce dosage est réalisé par une méthode enzymatique.

Le dosage de l'acide L glutamique est réalisé de la façon suivante :

En présence de glutamate déshydrogénase (*GLDH*) et de NAD^+ , l'acide L glutamique subit une désamination en 2 oxoglutarate. Cette réaction est réversible.



Le NADH formé, en présence de *diaphorase*, réduit le chlorure d'iodonitrotétrazolium (INT) en formazan qui absorbe à 492 nm. Cette réaction est irréversible.



Le mode opératoire de ce dosage est le suivant :

Tampon pH 8,6	2,50 mL
NAD^+ (6,7 mmol/L)	0,20 mL
INT (1,2 mmol/L)	0,20 mL
Diaphorase (15 U/mL)	0,05 mL
Echantillon	0,10 mL
Mélanger, attendre 3 minutes et lire l'absorbance A1 à 492 nm.	
GLDH (1200 U/mL)	0,05 mL
Mélanger, attendre environ 20 minutes et lire l'absorbance A2 à 492 nm.	

Un témoin "réactifs" est effectué en remplaçant l'échantillon par le même volume d'eau distillée ; les mesures d'absorbances sont notées AT1 et AT2.

Toutes les mesures d'absorbances sont effectuées en réglant le zéro du spectrophotomètre sur l'eau distillée.

3.1. Préciser si cette méthode de dosage est une méthode cinétique ou une méthode en point final. Justifier la réponse.

3.2. Expliquer le rôle du témoin dans cette méthode.

3.3. Etablir une relation entre les absorbances mesurées (A1, A2, AT1 et AT2) et la concentration en acide glutamique de l'échantillon exprimée en $g.L^{-1}$.

3.4. Les spécifications d'un potage déshydraté précisent :

glutamate monosodique : $(28,5 \pm 0,3) \text{ g.kg}^{-1}$

Un dosage de contrôle est effectué sur une solution de potage à 1 g.L^{-1} selon le mode opératoire précédent et les résultats suivants sont obtenus (le trajet optique des cuves utilisées est de 1 cm) :

$$A1 = 0,102$$

$$A2 = 0,216$$

$$AT1 = 0,100$$

$$AT2 = 0,105$$

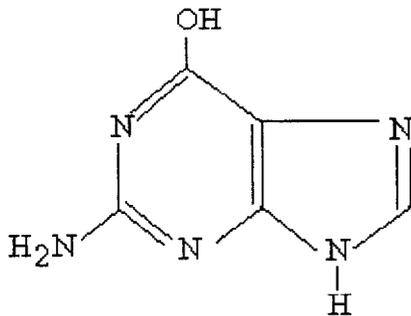
Calculer la concentration en glutamate monosodique du potage déshydraté exprimée en g.kg^{-1} et comparer le résultat obtenu aux spécifications.

Données : masse molaire de l'acide glutamique : 147 g.mol^{-1}

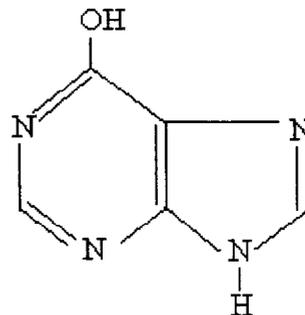
masse molaire du glutamate monosodique : $169,13 \text{ g.mol}^{-1}$

Coefficient d'absorption spécifique molaire du formazan à 492 nm : $1,99 \cdot 10^3 \text{ m}^2.\text{mol}^{-1}$

4. *Corynebacterium glutamicum* est dépourvue de 2 oxoglutarate déshydrogénase. A l'aide de l'annexe 1 expliquer la production importante d'acide glutamique.
5. Le GMP et l'IMP sont des ribonucléotides monophosphates. L'inosine est un ribonucléoside dont la base azotée est l'hypoxanthine. Les structures de la guanine et de l'hypoxanthine figurent ci-dessous.



GUANINE



HYPOXANTHINE

- 5.1. Ecrire les formules du GMP et de l'IMP.
- 5.2. Le GMP entre dans la constitution de certains acides nucléiques. De quels acides nucléiques s'agit-il ? Sous quelles formes les rencontre-t-on ? Schématiser leur structure spatiale.

MICROBIOLOGIE (40 points)

La production industrielle des exhausteurs de goût a fait l'objet de recherches importantes, en particulier au Japon : à titre d'exemple, ce pays produit 2500 tonnes d'inosine-5'-mono-phosphate (5'IMP) par an. Le 5'IMP est produit par fermentation de *Brevibacterium ammoniagenes*.

1. Le milieu de production pour le 5'IMP par *Brevibacterium ammoniagenes* est donné en annexe 2. Cette souche nécessite pour cultiver la présence de nombreux facteurs de croissance.

- 1.1. Donner la définition d'un facteur de croissance et qualifier la souche.
- 1.2. A l'aide d'exemples choisis dans l'annexe 2, indiquer la nature chimique des trois catégories de substances intervenant comme facteurs de croissance.
2. *Brevibacterium ammoniagenes* est un bacille Gram+ aéro-anaérobie facultatif mais se développant mieux dans des conditions d'aérobiose. La production de 5'IMP dans le fermenteur sera donc réalisée en culture aérée à 30°C et à un pH compris entre 7,0 et 8,5.
 - 2.1. Citer les dispositifs nécessaires pour contrôler et réguler ces trois paramètres.
 - 2.2. *Brevibacterium ammoniagenes* est catalase + .
 - 2.2.1. Ecrire la réaction catalysée par cette enzyme.
 - 2.2.2. Montrer l'importance du rôle de cette enzyme dans la cellule bactérienne lorsqu'elle est cultivée en aérobiose.
 - 2.3. *Brevibacterium ammoniagenes* est uréase + .
 - 2.3.1. Cette enzyme lui permet d'hydrolyser la source d'azote du milieu. Ecrire l'équation de la réaction. (formule développée)
 - 2.3.2. Le produit formé alcalinise le milieu de culture. Quels sont les constituants qui maintiennent le pH à une valeur voisine de 7 ? Quel est l'autre rôle de ces constituants ?
3. On a étudié la croissance de *Brevibacterium ammoniagenes* en fonction du temps, en suivant un certain nombre de paramètres : biomasse, pH, concentration en glucose dans le milieu, concentration en hypoxanthine, en 5'IMP. Les courbes obtenues sont présentées en annexe 3.
 - 3.1. Indiquer une méthode de mesure de la biomasse.
 - 3.2. Analyser l'évolution de la concentration du glucose dans le milieu ; quel type de culture a-t-on réalisé ?
 - 3.3. La courbe représentant l'évolution de la biomasse X en fonction du temps a été reportée en annexe 4, sous la forme $\ln X = f(t)$.
 - 3.3.1. Commenter les différentes phases de cette courbe.

3.3.2. Définir et déterminer graphiquement la vitesse maximale spécifique de croissance et le temps de génération.

3.4. Commenter l'apparition du 5'IMP dans le milieu. Comment peut-on expliquer l'évolution de la concentration en hypoxanthine en fonction du temps ?

TOXICOLOGIE (15 points)

Le glutamate monosodique présente, chez la souris, à la dose de 500 mg/kg une activité cytotoxique pour les neurones de certains centres nerveux. Cette activité neurotoxique est accrue par administration simultanée d'aspartame ou d'acide aspartique. L'ingestion de glutamate peut provoquer chez certains sujets différents troubles décrits sous le terme de "syndrome du restaurant chinois" avec nausées, tachycardie, migraines, vomissements, douleurs et raidissement des muscles du cou. La dose journalière acceptable limite est fixée à 120 mg/kg. L'utilisation du glutamate dans les aliments pour bébé est interdite dans certains pays.

1. Etude toxicologique in vivo.

1.1. Définir les termes «toxicité aiguë» et «toxicité chronique».

1.2. Préciser les conditions de l'étude des toxicités aiguë et chronique d'une substance susceptible d'être utilisée comme additif alimentaire.

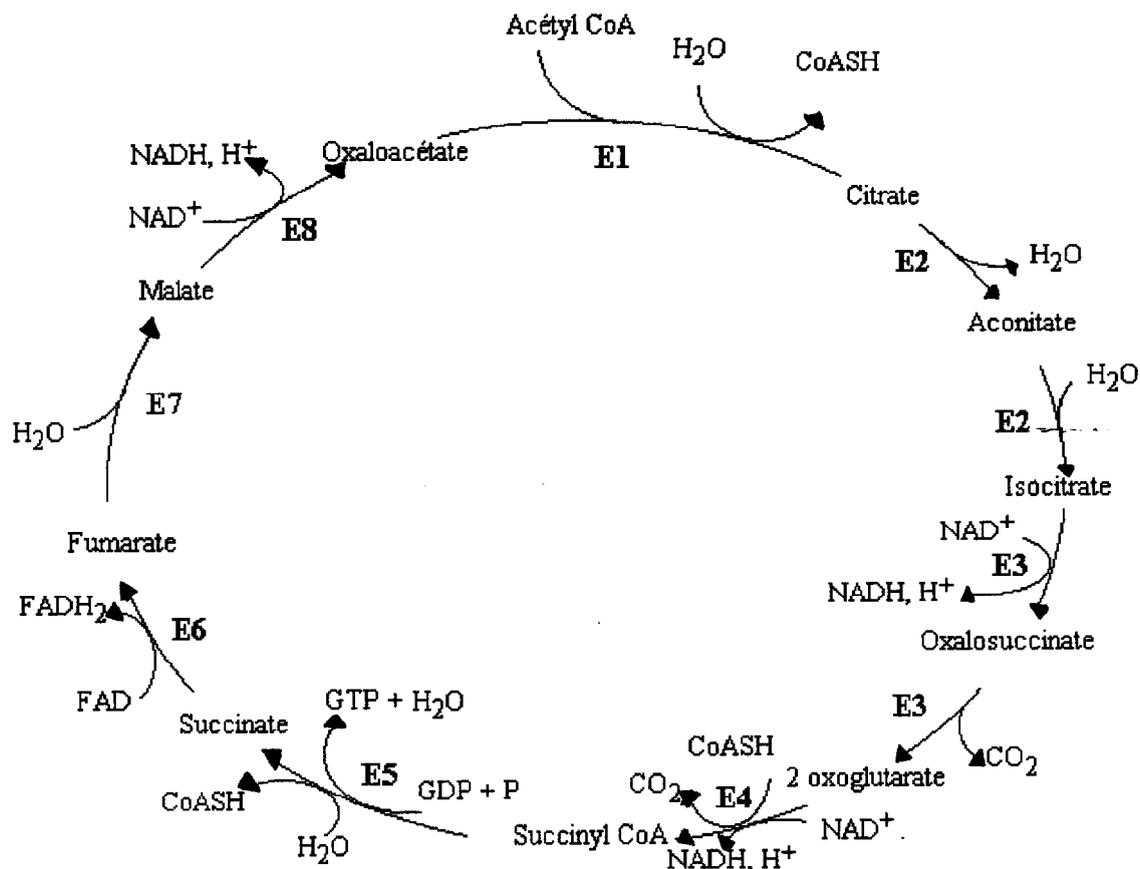
1.3. Définir le terme « effet génotoxique ».

2. Il est conseillé de réhydrater 30 g du potage avec 0,25 L d'eau.

2.1. La spécification de la teneur en glutamate peut-elle garantir la sécurité pour tout consommateur ? On considérera le poids moyen d'un sujet adulte égal à 70 kg.

Rappel : teneur en glutamate monosodique du potage déshydraté : $28,5 \text{ g.kg}^{-1}$

2.2. Pourquoi a-t-on fixé une réglementation particulière pour les bébés ?



- E1 : citrate synthétase
 E2 : aconitase
 E3 : isocitrate déshydrogénase
 E4 : 2 oxoglutarate déshydrogénase
 E5 : succinyl CoA synthétase
 E6 : succinate déshydrogénase
 E7 : fumarase
 E8 : malate déshydrogénase

CYCLE DE KREBS



Composition du milieu de culture pour la production de 5'IMP par *Brévibacterium ammoniagenes* :

KH ₂ PO ₄	10 g
K ₂ HPO ₄	10 g
MgSO ₄	10 g
CaCl ₂	0,1 g
FeSO ₄	0,01 g
Urée	6 g
Cystéine	20 mg
Thiamine	50 mg
Acide nicotinique	50 mg
Panthoténate de calcium	10 mg
Biotine	0,03 mg
MnCl ₂	1 mg
Adénine	40 mg
Glucose	100 g
Eau	qsp 1L
pH 8	

