

BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR
QUALITÉ DANS LES INDUSTRIES ALIMENTAIRES
ET LES BIO-INDUSTRIES

E3 – BIOCHIMIE - BIOLOGIE

Durée : 4 heures

Coefficient : 5

Les calculatrices de poche sont autorisées conformément à la circulaire n° 99-186 du 16 novembre 1999.

Tout autre document est interdit

Une feuille de papier millimétré est nécessaire pour la réalisation de cette épreuve.

La clarté du raisonnement et la qualité de la rédaction interviennent pour une part importante dans l'appréciation des copies.

Documents à rendre avec la copie : annexes 5 et 6, pages 9/11 et 10/11

Ce sujet comporte 11 pages, numérotées de 1 à 11.
Assurez-vous qu'il est complet dès qu'il vous est remis.

BTS QUALITÉ DANS LES INDUSTRIES ALIMENTAIRES ET LES BIO-INDUSTRIES

Session 2006

E3 – Biochimie - Biologie

PROBIOTIQUES ET PRÉBIOTIQUES

Un probiotique est défini comme une préparation intégrant une ou plusieurs espèces de micro-organismes vivants, qui exercent un rôle bénéfique sur la flore intestinale de l'hôte.

Un prébiotique est un ingrédient non digestible par l'hôte, qui l'affecte positivement en agissant sur sa flore intestinale.

Certains aliments traditionnels fermentés répondant aux définitions ci-dessus sont déjà reconnus comme bénéfiques à la santé : tel est le cas des yoghourts, dont la fabrication est largement industrialisée, tel est le cas également du kéfir, boisson fermentée acidulée et légèrement alcoolisée originaire des pays d'Europe de l'Est.

Le protocole de préparation du kéfir de lait est présenté en annexe 1.

Les grains de kéfir, ferments originels de la boisson, sont constitués d'une microflore complexe (annexe 2) enchassée dans une matrice polysaccharidique, le kéfirane. La préparation peut être réalisée à partir d'une solution de saccharose aromatisée par des fruits (kéfir de fruit) ou à partir du lait (kéfir de lait).

Quelques propriétés biochimiques et microbiologiques du kéfir sont étudiées ici.

BIOCHIMIE (46 POINTS)

1. Le kéfirane est un mucopolysaccharide (MPS) synthétisé et excrété par certains composants de la microflore. Il présente une structure variable suivant les conditions de culture et les souches utilisées.

On connaît bien le polymère de D-glucopyranose libéré par *Leuconostoc mesenteroides*, exopolysaccharide de type α 1-3, α 1-4 et α 1-6. Les liaisons α 1-6 sont prédominantes.

1.1. Écrire la formule chimique d'un fragment d'au moins 4 résidus de cette molécule, en représentant les trois types de liaison présents.

1.2. Dans la définition du prébiotique, apparaît l'expression "non digestible par l'hôte". Expliquer comment le polymère ci-dessus répond à cette définition.

2. La boisson fermentée présente une teneur en galactose de l'ordre de 20 à 25 g.L⁻¹. Pour optimiser les conditions de culture, on étudie l'évolution en cours de fermentation de la concentration en lactose et en galactose dans le milieu.

2.1. Le protocole de dosage est donné en annexe 3.

2.1.1. Écrire la première réaction en précisant le nom de l'enzyme et en indiquant la nature de X. Les formules sont attendues.

2.1.2. Justifier :

- la lecture à 340 nm,
- l'utilisation de deux tampons différents,
- la nécessité de réaliser des témoins.

2.1.3. Préciser la différence entre l'essai lactose et l'essai galactose.

2.1.4. Justifier les coefficients multiplicateurs utilisés dans les relations littérales permettant le calcul des concentrations massiques en galactose et en lactose dans l'échantillon.

2.2. Le suivi de fermentation a donné les résultats présentés en annexe 4.

2.2.1. Sachant qu'on a effectué une dilution au 1/50^{ème} du milieu de culture, reproduire et compléter le tableau. Tracer les courbes représentant les variations des concentrations dans le milieu de culture en fonction du temps pour les deux glucides.

2.2.2. Interpréter les courbes obtenues.

3. Au cours de la fabrication du kéfir, les souches de *Lactobacillus* et *Leuconostoc* utilisent essentiellement la fermentation hétérolactique présentée en annexe 5.

3.1. Durant la première phase, les voies A et B sont actives, la voie A étant cependant prédominante. Compléter le document.

3.2. Au cours de la deuxième phase de préparation, une légère alcoolisation du kéfir a lieu. A l'aide de l'annexe 5, justifier l'incubation en récipient hermétiquement fermé.

4. Pour faire proliférer le ferment dans un objectif de conservation, on travaille au contraire en fermenteur, avec agitation et aération. Préciser quelle est la voie privilégiée dans ce cas. Justifier le choix de ce protocole de fabrication.

TOXICOLOGIE (9 POINTS)

Les probiotiques apparaissent aujourd'hui comme une alternative à l'utilisation systématique des antibiotiques en tant qu'accélérateurs de croissance chez les animaux d'élevage. En effet, une prise de conscience des dangers de cette pratique a conduit à leur interdiction progressive, avec interdiction définitive en 2006.

1. Préciser quelles sont les conséquences pour l'homme de la présence d'antibiotiques dans l'alimentation animale.
2. D'autres substances peuvent être présentes dans les produits d'origine animale provenant soit d'une contamination industrielle, soit d'une contamination agricole, soit d'une contamination biologique. Donner un exemple pour chacun de ces cas.
3. On utilise alors un paramètre spécifique, la Limite Maximale de Résidus (LMR).
 - 3.1. Donner sa définition.
 - 3.2. Indiquer l'intérêt de sa prise en compte dans l'entreprise.

MICROBIOLOGIE (45 points)

1. Le tableau de l'annexe 2 présente les différents micro-organismes isolés à partir du kéfir de lait ; ce sont des bactéries et des levures.
 - 1.1. Donner les principales différences entre les cellules procaryotes et les cellules eucaryotes.
 - 1.2. Compléter le schéma de l'annexe 6 à rendre avec la copie.
2. Le rôle bénéfique des probiotiques sur la flore intestinale est interprété de deux manières :
 - synthèse de facteurs de croissance activateurs de la flore intestinale,
 - compétition avec des micro-organismes pathogènes.

2.1. Les facteurs de croissance

- 2.1.1. Définir un facteur de croissance.
- 2.1.2. Donner deux exemples différents de facteur de croissance.
- 2.1.3. Expliquer le rôle bénéfique des facteurs de croissance sur la flore intestinale.

2.2. Le pouvoir pathogène

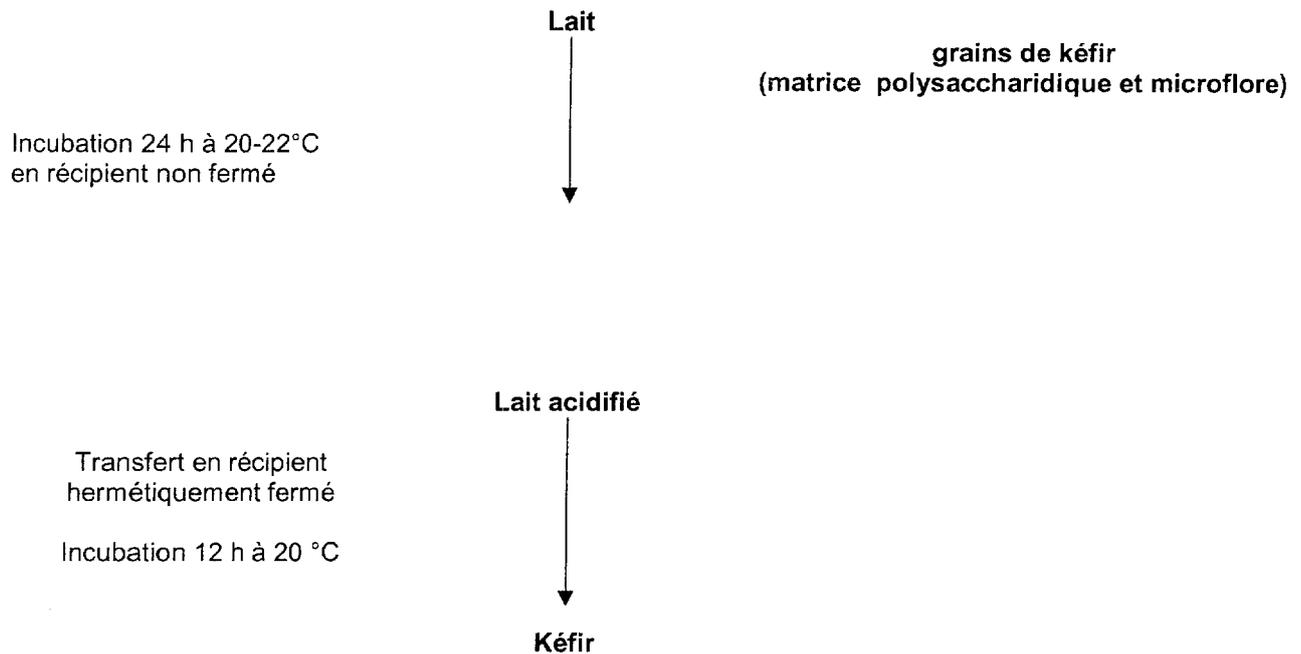
La présence des probiotiques dans l'intestin permet de lutter contre certains micro-organismes pathogènes notamment *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*.

- 2.2.1. Ces deux bactéries sont responsables de toxi-infections alimentaires. Définir ces termes.
- 2.2.2. Pour que *Escherichia coli* s'installe dans l'intestin, il lui faut se fixer sur des sites d'adhésion aux cellules épithéliales. Nommer deux structures bactériennes responsables de l'adhésion.

- 2.2.3. Les toxi-infections à *Listeria monocytogenes* sont consécutives à la consommation de produits réfrigérés. Classer cette bactérie en fonction de sa température optimale de croissance et préciser la valeur de celle-ci.
- 2.2.4. Expliquer le rôle des probiotiques dans la lutte contre les micro-organismes pathogènes.
3. La consommation de probiotiques, comme par exemple le kéfir, permet de prévenir l'apparition de certaines diarrhées d'origine microbienne suite à une antibiothérapie.
- 3.1. Les β -lactamines (pénicilline par exemple) sont des antibiotiques couramment utilisés en médecine humaine.
Expliquer le mécanisme d'action de cette famille d'antibiotiques sur une bactérie à Gram positif. Préciser si l'antibiotique est bactériostatique ou bactéricide et justifier la réponse.
- 3.2. L'étude de l'effet de cet antibiotique sur deux micro-organismes M_1 et M_2 de la flore commensale d'un enfant a été réalisée. La concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'antibiotique a été déterminée en milieu liquide. Le tableau de l'annexe 7 propose les résultats obtenus pour les souches M_1 et M_2 après 24 heures d'incubation à 37°C.
- 3.2.1. Définir la CMI d'un antibiotique.
- 3.2.2. Déterminer la valeur de la CMI pour chaque souche M_1 et M_2 .
- 3.2.3. Lors d'un traitement par cet antibiotique, la concentration utilisée est de $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ et l'antibiotique se trouve dilué au 1/10 dans l'intestin.
Indiquer quel sera l'effet de cet antibiotique sur les souches M_1 et M_2 .
Conclure sur l'effet de la prise d'antibiotique sur la flore commensale de l'enfant.
4. Dans le but d'industrialiser la production de kéfir, les différents micro-organismes le composant sont produits séparément en fermenteur industriel : l'étude porte sur la production de biomasse de *Saccharomyces kefir*. Cette levure a les caractéristiques suivantes : aéro-anaérobie, mésophile.
- 4.1. Préciser les conditions de pression partielle en dioxygène et de température optimales pour cette production. Justifier les réponses.
- 4.2. Deux principes de fermenteurs différents peuvent être utilisés : fermenteur en discontinu (milieu non renouvelé) ou fermenteur en continu (milieu renouvelé). Indiquer le principe de chaque fermenteur et préciser celui qui est le plus adapté à la production de biomasse, en justifiant la réponse.

ANNEXE 1

Diagramme de fabrication du kéfir de lait



ANNEXE 2

Micro-organismes isolés à partir du kéfir de lait

Lactobacilles	Streptocoques lactiques	Levures
<i>Lb. alactosus</i>	<i>Streptococcus cremoris</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Lb. brevis</i>	<i>Str. faecalis</i>	<i>S. kefir</i>
<i>Lb. casei</i> subsp. <i>casei</i>	<i>Str. lactis</i>	<i>S. florentinus</i>
<i>Lb. casei</i> subsp. <i>pseudopiantarum</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>S. pretoriensis</i>
<i>Lb. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i>	<i>Pediococcus damnosus</i>	<i>Candida valida</i>
<i>Lb. casei</i> subsp. <i>tolerans</i>		<i>C. lambica</i>
<i>Lb. coryneformis</i> subsp. <i>torquens</i>		<i>Kloeckera apiculata</i>
<i>Lb. fructosus</i>		<i>Hansenula yalbensis</i>
<i>Lb. hilgardii</i>		
<i>Lb. homohiochi</i>		
<i>Lb. plantarum</i>		
<i>Lb. pseudopiantarum</i>		
<i>Lb. Yamanashiensis</i>		

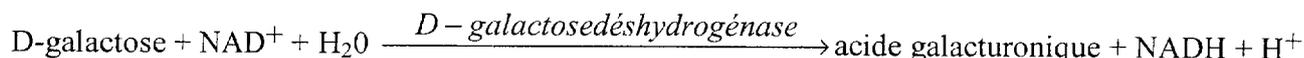
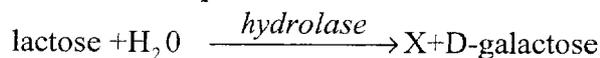
Lb. : *Lactobacillus*
 Str. : *Streptococcus*
 S. : *Saccharomyces*

ANNEXE 3

Dosage du lactose et du galactose par méthode enzymatique

D'après Kit ENZYTEC Lactose/D-galactose ID-N° 1 002 784

1. Principe



2- Réactifs

Flacon 1 : tampon citrate pH 6,6 ; 35 mg de NAD⁺

Flacon 2 : 1,7 mL d'hydrolase (environ 100 UI) en suspension

Flacon 3 : 34 mL de tampon phosphate pH 8,6

Flacon 4 : 1,7 mL de D-galactose déshydrogénase (environ 40 UI) en suspension

3- Mode opératoire

longueur d'onde : 340 nm

trajet optique : 1 cm

température : 20-25°C

zéro contre l'air ou contre l'eau désionisée

domaine de linéarité : de 0,1 à 1 g/L de lactose et galactose dans l'échantillon

Introduire dans les semi microcuvettes :	Témoin lactose	Essai lactose	Témoin galactose	Essai galactose
Flacon 1 : tampon citrate pH 6,6 (mL)	0,200	0,200	0,200	0,200
Flacon 2 : β-hydrolase (mL)	0,050	0,050	-	-
Echantillon (mL)	-	0,100	-	0,100
<i>Homogénéiser et incuber 20 minutes à 20-25 °C.</i>				
Flacon 3 : tampon phosphate pH 8,6 (mL)	1,000	1,000	1,000	1,000
Eau désionisée (mL)	2,000	1,900	2,050	1,950
<i>Homogénéiser puis lire l'absorbance A1 après 3 minutes.</i>				
Flacon 4 : D-Galactose déshydrogénase (mL)	0,050	0,050	0,050	0,050
<i>Homogénéiser. Incuber 30 minutes à 20-25°C. Lire l'absorbance A2.</i>				

Pour le galactose :

$$\Delta A_{\text{galactose}} = (A2 - A1)_{\text{essai galactose}} - (A2 - A1)_{\text{témoin galactose}}$$

Pour le lactose :

$$\Delta A_{\text{lactose}} = [(A2 - A1)_{\text{essai lactose}} - (A2 - A1)_{\text{témoin lactose}}] - [(A2 - A1)_{\text{essai galactose}} - (A2 - A1)_{\text{témoin galactose}}]$$

4. Résultats

$$\text{galactose} : C (\text{g.L}^{-1}) = 0,9436 \times \Delta A$$

$$\text{lactose} : C (\text{g.L}^{-1}) = 1,793 \times \Delta A$$

Données : $\epsilon_{\text{NADH } 340 \text{ nm}} = 630 \text{ m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$

$$M_{\text{lactose}} = 342,3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$

$$M_{\text{galactose}} = 180,16 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$

ANNEXE 4

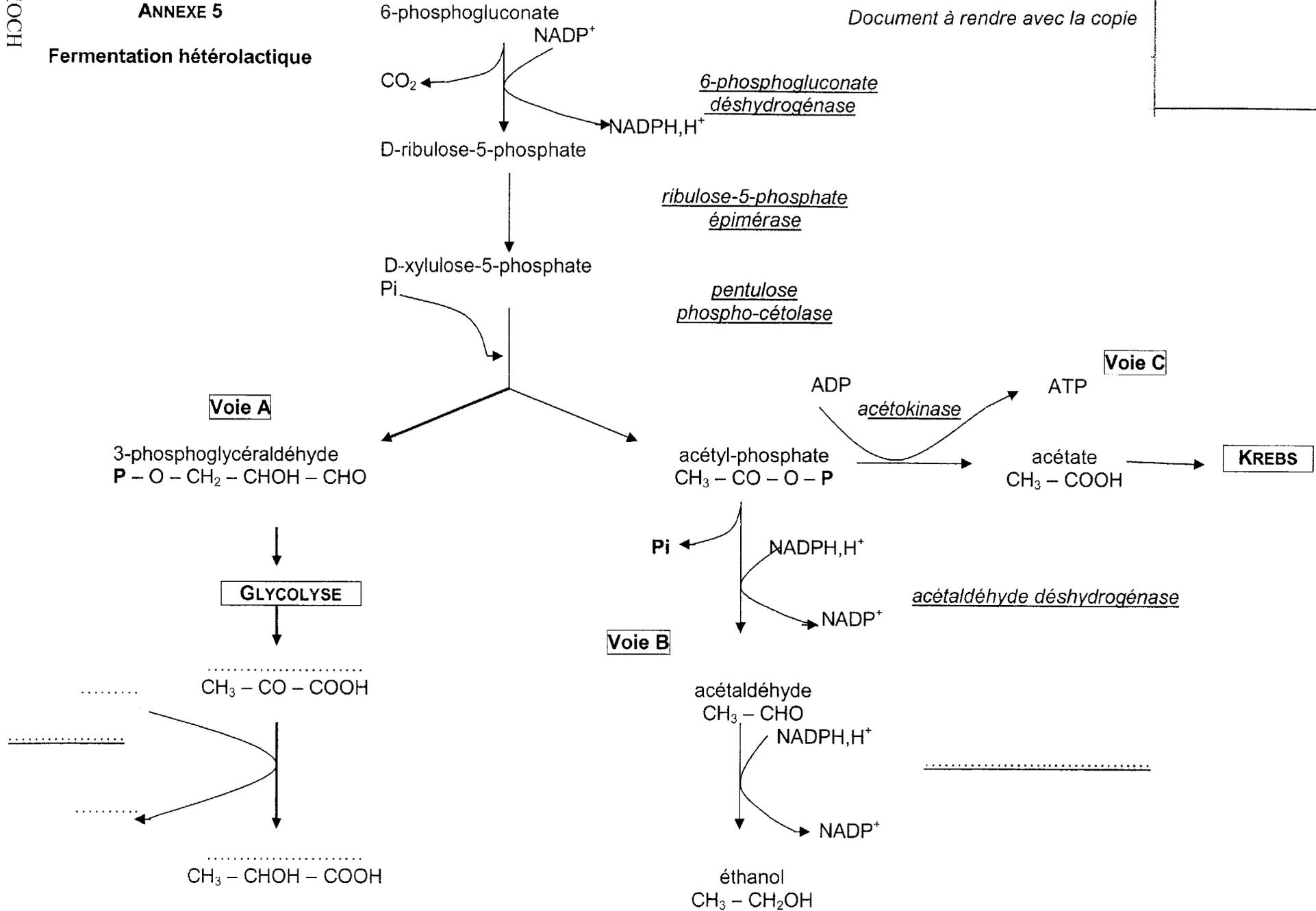
Tableau de résultats

Temps (h)	galactose			lactose		
	$\Delta A_{\text{galactose}}$	C (g.L ⁻¹) échantillon	C (g.L ⁻¹) milieu de culture	$\Delta A_{\text{lactose}}$	C (g.L ⁻¹) échantillon	C (g.L ⁻¹) milieu de culture
0	0,000			0,468		
5	0,170			0,346		
10	0,297			0,245		
15	0,403			0,178		
20	0,487			0,134		

ANNEXE 5

Document à rendre avec la copie

Fermentation hétérolactique



L'examinateur ou concourants : _____
 Spécialité/option : _____
 Repère de l'épreuve : _____
 Épreuve/sous-épreuve : _____
 (Préciser, s'il y a lieu, le sujet choisi)

Numérotez chaque page (dans le cadre en bas de la page) et placez les feuilles intercalaires dans le bon sens.

Spécialité/option :

Repère de l'épreuve :

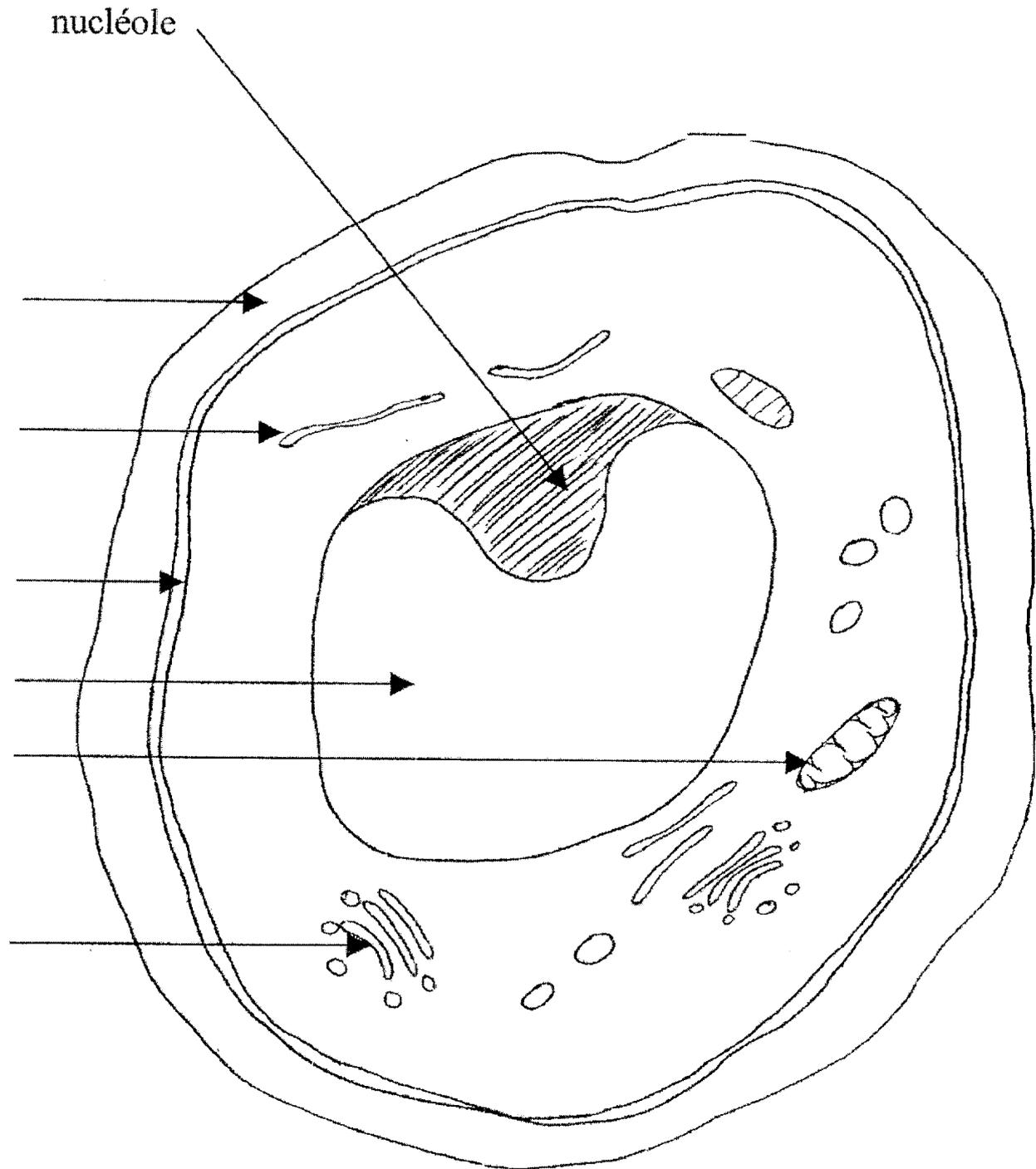
Épreuve/sous-épreuve :

(Préciser, s'il y a lieu, le sujet choisi)

Numérotez chaque page (dans le cadre en bas de la page) et placez les feuilles intercalaires dans le bon sens.

ANNEXE 6

Structure schématique d'une levure



ANNEXE 7

Détermination de la CMI en milieu liquide pour les souches M₁ et M₂ Aspect après 24 heures de culture à 37°C

[antibiotique] en $\mu\text{g.mL}^{-1}$	0	0,5	1	2	4	8	16	32
Souche M ₁	+	+	-	-	-	-	-	-
Souche M ₂	+	+	+	+	+	+	+	-

Légendes : + croissance visible

- absence de croissance visible