

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.

Ce sujet comporte 13 pages, numérotées de 1 à 13
Assurez-vous qu'il est complet dès qu'il vous est remis.

BTS QUALITÉ DANS LES INDUSTRIES ALIMENTAIRES ET LES BIO-INDUSTRIES

Session 2007

E3 – BIOCHIMIE - BIOLOGIE

FABRICATION DE VIN ROUGE

L'élaboration d'un vin rouge est complexe. L'œnologue, par ses compétences, assure la qualité microbiologique et biochimique des fermentations ainsi que l'innocuité de son produit.

MICROBIOLOGIE (40 points)

Divers micro-organismes, présents naturellement sur les baies de raisins, interviennent successivement dans l'élaboration du vin :

- des levures : la fermentation alcoolique du jus de raisin est assurée d'abord par des levures apiculées non sporogènes des genres *Kloeckera*, *Hansenula*, *Hanseniasopora* ; les espèces appartenant au genre *Saccharomyces* prennent ensuite le relais ;

- des bactéries lactiques réalisant la fermentation malolactique.

D'autres micro-organismes ont un rôle néfaste en provoquant des altérations plus ou moins importantes des bactéries acétiques et des moisissures.

1. ÉTUDE DES LEVURES DU RAISIN

1.1. Structure

L'annexe 1 présente une coupe transversale de levure.

1.1.1. Légender ce document (numéro et légendes à reporter sur la copie).

1.1.2. Indiquer en le justifiant si une cellule de levure est une cellule procaryote ou eucaryote.

1.2 Reproduction des levures

1.2. Les levures du genre *Saccharomyces* peuvent, selon les conditions de culture, bourgeonner ou donner des ascospores présentes dans une asque.

1.2.1. Schématiser une asque et la légender.

1.2.2. Nommer le processus de reproduction correspondant à un bourgeonnement.

1.3 Optimisation de la vinification

Afin d'optimiser la vinification, l'œnologue peut ajouter des levures sélectionnées et améliorées.

1.3.1. Citer un critère de sélection essentiel à la fermentation alcoolique.

1.3.2. Proposer une méthode utilisable pour améliorer les souches de levures.

2. ÉTUDE DES BACTÉRIES LACTIQUES

Les bactéries lactiques se différencient :

- par leur morphologie microscopique (bacilles, coques) ;
- par leur type fermentaire (homofermentaire ou hétérofermentaire).

Oenococcus oeni (anciennement *Leuconostoc oenos*) est un coque à Gram positif hétérofermentaire qui présente un intérêt particulier pour la fermentation malolactique.

2.1. Classification

2.1.1. Définir les bactéries lactiques. Différencier en le justifiant les deux types fermentaires de bactéries lactiques.

2.1.2. Citer deux autres genres de bactéries lactiques.

2.2. La paroi des bactéries à Gram positif

2.2.1. Représenter, par un schéma orienté et annoté, la structure de la paroi d'une bactérie à Gram positif en soulignant son principal composant.

2.2.2. Expliquer pourquoi la présence de lysozyme influencerait négativement la fermentation malolactique. Préciser le mode d'action du lysozyme.

2.3 Fermentation malolactique

Pour optimiser la fermentation malolactique, il est conseillé d'ensemencer « le vin » avec une préparation bactérienne sélectionnée de concentration connue d' *Oenococcus oeni*.

Ces bactéries, incapables de se développer sur milieu minimum, sont mises à cultiver sur un milieu spécifique, dont la composition est en annexe 2.

2.3.1. Donner le rôle des différents constituants de ce milieu.

2.3.2. Préciser les types trophiques de ces bactéries en fonction de leurs exigences nutritionnelles vis-à-vis de la source de carbone, de la source d'énergie et des facteurs de croissance. Justifier chacune des réponses.

L'annexe 3 présente les résultats du suivi de la population d' *Oenococcus oeni* au cours d'une fermentation malolactique en vinification.

2.3.3 Tracer, sur papier millimétré, la courbe de croissance $\ln N = f(t)$.

Échelle : 2 cm pour 1 jour ; 1 cm par unité de \ln .

2.3.4. Délimiter les différentes phases apparentes de la croissance et les interpréter.

2.3.5. Définir les paramètres de la croissance : vitesse spécifique et temps de génération.

2.3.6. Déterminer graphiquement ces deux paramètres ; le mode de détermination devra apparaître sur la copie et sur la courbe.

2.4 Résistance des bactéries lactiques aux bactériophages

Les bactéries lactiques sélectionnées doivent répondre à un certain nombre de critères et notamment résister aux bactériophages virulents.

2.4.1. Expliquer l'expression « bactériophage virulent ».

2.4.2. A l'aide d'un schéma annoté, décrire le cycle de multiplication d'un bactériophage virulent.

2.4.3. Le mécanisme de résistance aux bactériophages peut être lié à la présence d'un plasmide. Définir un plasmide.

3. ALTÉRATIONS D'ORIGINE FONGIQUE

Des moisissures du genre *Aspergillus* et *Penicillium* parfois localisées sur les raisins, pourraient être à l'origine de la présence d'ochratoxine A dans le vin.

L'annexe 4 représente une structure cellulaire de moisissure.

Indiquer sur la copie les légendes des éléments désignés de a à e.

Préciser à quel genre appartient cette moisissure. Justifier la réponse.

BIOCHIMIE (40 points)

1. LES ENZYMES DU RAISIN

De nombreuses enzymes participent à la vinification : certaines proviennent des baies de raisin, d'autres des micro-organismes fermentaires associés au fruit ou apportés par l'œnologue.

1.1. Indiquer la nature biochimique des enzymes.

1.2. Les enzymes sont des catalyseurs de réaction ; définir un catalyseur.

Parmi les enzymes trouvées dans les baies de raisin se trouvent des peptidases (se reporter à l'annexe 5).

- 1.3. Construire un dipeptide en précisant les différentes fonctions chimiques et la nature de la liaison.
 - 1.4. Préciser l'action d'une endopeptidase, d'une aminopeptidase, d'une carboxypeptidase.
- Les baies de raisin apportent également une invertase.
- 1.5. Ecrire la réaction catalysée par l'invertase.
 - 1.6. Justifier le terme invertase.
 - 1.7. Donner la représentation de Haworth d'un des produits de la réaction.

2. LE VIN EN COURS DE FABRICATION

Le jus de raisin subit des fermentations successives : la fermentation alcoolique et la fermentation malolactique.

2.1 Fermentation alcoolique

La fermentation alcoolique est assurée par des levures qui transforment le glucose et le fructose en éthanol.

- 2.1.1. Donner l'équation bilan de la transformation du glucose en pyruvate. Préciser le nom de cette voie métabolique.
- 2.1.2. À partir du pyruvate, écrire les réactions de fermentation éthanolique et préciser le nom des enzymes impliquées. Indiquer le rôle de la fermentation éthanolique.
- 2.1.3. Établir la réaction bilan de la fermentation alcoolique du glucose.
- 2.1.4. En présence de dioxygène, la fermentation alcoolique est immédiatement stoppée au profit de la respiration. Expliquer ce phénomène au niveau du transfert d'électrons.

2.2 Fermentation malolactique

Après la fermentation alcoolique, les vins contiennent en général 3 à 8 g/L d'acide malique. Une nouvelle fermentation se produit, la fermentation malolactique, au cours de laquelle l'acide malique est transformé en acide lactique par des bactéries lactiques (en général *Oenococcus oenos*). Cette fermentation diminue l'acidité totale du vin (annexe 5).

L'œnologue veut contrôler la concentration en cours de fabrication, et après la fermentation alcoolique, de l'acide L-malique du vin, forme naturelle des moûts et des vins.

Le principe et le mode opératoire du dosage enzymatique de l'acide L-malique sont donnés en annexe 6.

Les résultats suivants sont obtenus :

Les absorbances sont lues contre l'air à 340 nm.

$$\Delta A_T = A_2 - A_1 \text{ (témoin)} = 0,320$$

$$\Delta A_E = A_2 - A_1 \text{ (essai)} = 0,720$$

2.2.1. Le dosage présenté ici est une méthode en point final. La réaction (2) est présentée comme une réaction réversible. Expliquer la condition nécessaire pour que la réaction (2) catalysée par l'ASAT transforme la totalité d'oxaloacétate produit lors de la réaction (1).

2.2.2. Indiquer l'intérêt de la première mesure d'absorbance A1.

2.2.3. Expliquer l'évolution de l'absorbance A2 dans ce dosage.

2.2.4. Montrer que la dilution au 1/20 permet de respecter la quantité de L-malate à introduire dans la cuve. La concentration d'acide malique dans le vin est de l'ordre de 8 g/L.

Données : La quantité de L-malate dans la cuve devant être comprise entre 2 μ g et 50 μ g, il convient de diluer le vin de telle manière que la concentration en malate soit comprise entre 0,02 et 0,5 g/L.

2.2.5. Établir l'expression littérale permettant de déterminer la concentration molaire de l'acide L-malique dans la cuve. Réaliser l'application numérique exprimée en mol/L.

2.2.6. En déduire l'expression littérale de la concentration massique de l'acide L-malique dans le vin. Effectuer l'application numérique.

2.2.7 Après la fermentation malolactique la totalité de l'acide malique a été transformée en acide lactique. Expliquer, d'après les formules des molécules des deux acides, la raison de l'augmentation du pH.

Données

M-acide L-malique = 134,09 g/mol

l = trajet optique de la cuve 0,01 m

$\epsilon_{\text{NADH},\text{H}^+}$ à 340 nm = 630 m².mol⁻¹

TOXICOLOGIE (20 points)

Une coopérative vinicole fabrique du vin rouge ordinaire destiné à une commercialisation sur le territoire français. Elle reçoit le résultat d'analyse du produit fini :

SO ₂	235 mg.L ⁻¹
Plomb	0,1 mg.L ⁻¹
Acide sorbique	100 mg.L ⁻¹
Cadmium	20 µg.L ⁻¹
Carbamate d'éthyle	0,03 g.L ⁻¹
Cuivre	0,9 mg.L ⁻¹
Histamine	15 mg.L ⁻¹
Sulfates	1,00 g.L ⁻¹
Zinc	3 mg.L ⁻¹
Ferrocyanate de potassium	Absence

1. CONFORMITÉ TOXICOLOGIQUE D'UN VIN

Ce vin a été déclaré non conforme. D'après l'annexe 7, déterminer sur quels critères la non-conformité a été établie.

2. LES PHASES DE L'INTOXICATION

Un phénomène d'intoxication se déroule en trois phases :

- la phase d'exposition,
- la phase toxicocinétique,
- la phase toxicodynamique.

Au cours de la deuxième phase, les molécules se distribuent dans l'organisme ; au niveau du foie, les substances toxiques peuvent subir différentes modifications. Au cours de cette période, une partie de ces molécules peut être éliminée de l'organisme par les voies naturelles.

- 2.1. Écrire les réactions réalisées par la voie microsomiale. Indiquer les conséquences sur le plan toxique.
- 2.2. Préciser les deux voies principales d'élimination des molécules produites en 2.1.
- 2.3. D'après le tableau donné en annexe 7, deux molécules dosées dans le vin sont des métaux lourds. Ces métaux provoquent des maladies de surcharge (séquestration).
 - 2.3.1. Donner les noms des deux métaux lourds dosés.
 - 2.3.2. Expliciter la notion de maladie de surcharge.

3. LE DIOXYDE DE SOUFRE

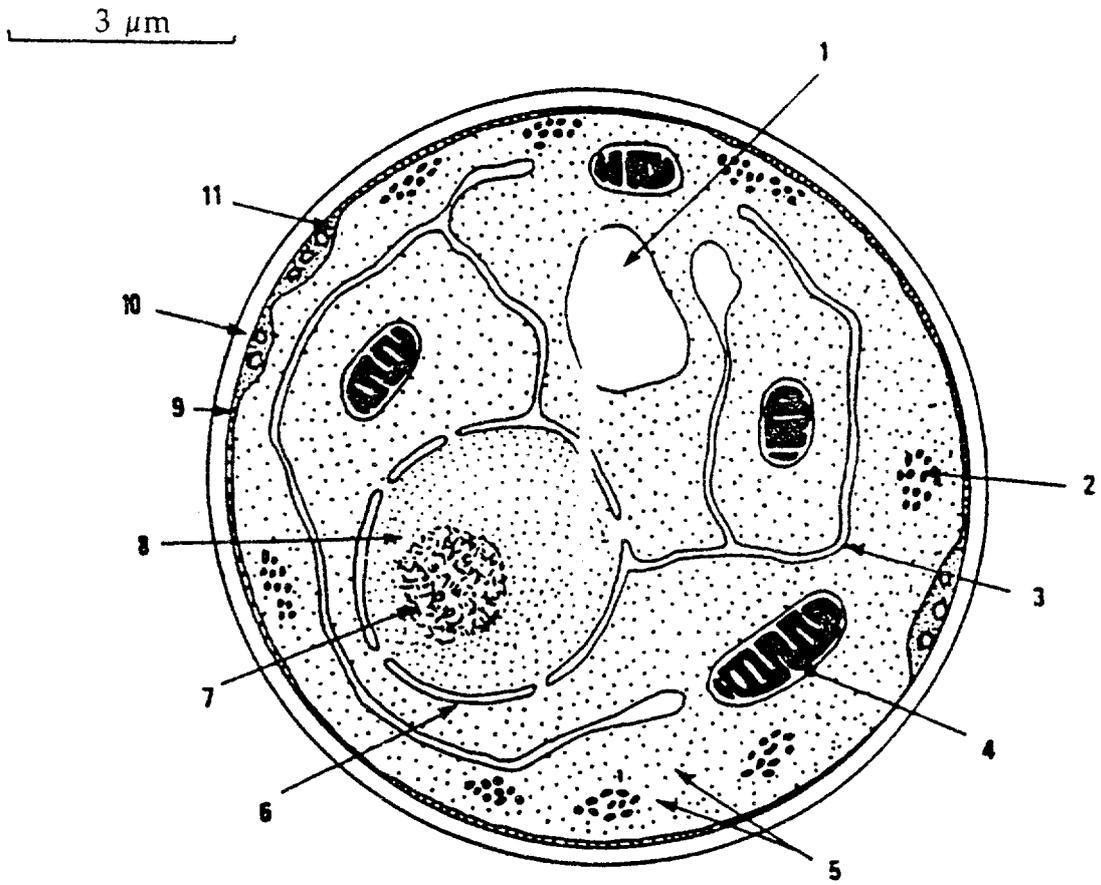
Le dioxyde de soufre est utilisé lors de la vinification essentiellement pour protéger le vin contre l'oxydation.

Des études menées dans des conditions d'intoxication chronique ont montré que « par voie orale dans la nourriture du rat, de la souris, du cobaye et du singe, l'hydrogénosulfite HSO_3^- n'induit pas de toxicité jusqu'à la dose de 72mg/kg/j. Au delà, arrêt de la croissance, perte de poids, atrophie viscérale, osseuse et médullaire, inflammation de l'estomac, polynévrite et œdème testiculaire apparaissent.

- 3.1. Déterminer la dose journalière admissible en SO_2 .
- 3.2. Calculer la quantité de vin qu'un individu de 70 kg devrait consommer pour s'exposer à une intoxication chronique au SO_2 .
- 3.3. Indiquer le volume maximal du vin à analyser consommable pour ne pas dépasser la DJA. Conclure sur le facteur de sécurité à employer pour le calcul de la DJA.

Annexe 1

Schéma d'une coupe transversale d'une cellule fongique



Annexe 2

Milieu de culture spécifique des bactéries lactiques

Acides aminés de caséine	5g
Extrait de levure	4g
Glucose	5 g
Fructose	3,5g
Acide malique	10g
Tween 80	1g
KH ₂ PO ₄	0,6g
KCl	0,45g
CaCl ₂	0,13g
MgSO ₄ ,7H ₂ O	0,13g
MnSO ₄ ,H ₂ O	3mg
Agar-agar	20g
Eau distillée	qsp
	1 litre

pH ajusté à 4,5

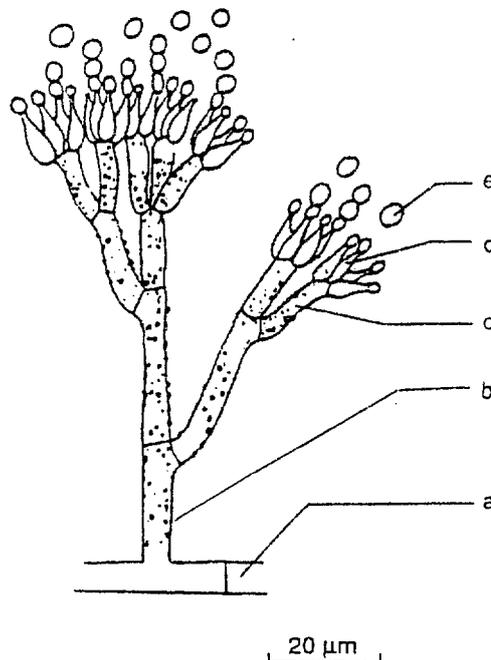
Annexe 3

Suivi de la population d'*Oenococcus oeni* N= nombre de bactéries /mL

Temps en jour	Ln N
0	4.6
1	4.6
2	4.6
3	5.0
4	6.2
5	7,4
6	9.0
7	10.4
8	11.9
9	13.3
10	14.7
11	15.6
12	15.9
13	15.9
14	15.9

Annexe 4

Structure cellulaire de moisissure



Annexe 5

L'ÉQUIPEMENT ENZYMATIQUE DU RAISIN (D'après Cordonnier, 1980)

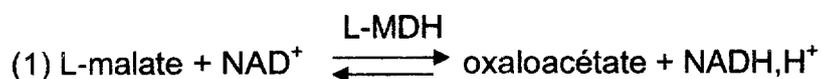
ENZYMES	SUBSTRATS	PRODUITS DE LA RÉACTION	CONSÉQUENCES TECHNOLOGIQUES
oxygénase + alcool déshydrogénase tyrosinase et catalase	acides linoléique et linoléique	aldéhydes et alcools en C ₆	flaveurs herbacées
	composés phénoliques + O ₂	quinones et polymères	effets souvent négatifs sur l'arôme, la couleur ; inactivation d'enzymes
pectolytiques	protopectines + pectines des parois cellulaires de la baie	acides galacturonique et polygalacturonique ; méthanol	effets positifs sur l'extraction et la clarification
peptidases + aminopeptidases	protéines + peptides	peptides + acides aminés	favorable aux fermentations + modification de la stabilité physicochimique
invertase	saccharose	glucose + fructose	transformation de sucre non fermentescible en sucres fermentescibles
glucosidases	hétérosides terpéniques et polyphénoliques	terpénols et anthocyanidols	révélation d'arômes à partir de précurseurs ; renforcement de la couleur
métabolisme anaérobie ; multienzymes	multisubstrats	éthanol + produits secondaires ; catabolisme du malate ; remaniements des formes azotées, etc.	arômes spécifiques ; extractions sélectives ; fermentations facilitées

Annexe 6

DOSAGE DE L'ACIDE L-MALIQUE PAR MÉTHODE ENZYMATIQUE

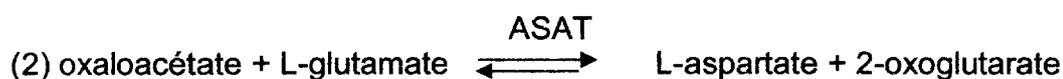
1. Principe

En présence de L-malate-déshydrogénase (L-MDH), l'acide L-malique (L-malate) est oxydé en oxaloacétate par le nicotinamide-adénine-dinucléotide (NAD⁺) :



L'équilibre de cette réaction est favorable à la formation de malate.

L'extraction de l'oxaloacétate du système réactionnel entraîne le déplacement de l'équilibre en faveur de l'oxaloacétate. La réaction enzymatique catalysée par l'aspartate aminotransférase (ASAT) convertit l'oxaloacétate en L-aspartate en présence de L-glutamate :



La formation de NADH,H⁺ (1), mesurée par l'augmentation de l'absorbance à la longueur d'onde de 340 nm, est proportionnelle à la quantité de L-malate présente.

2. Mode opératoire

Le dosage du L-malate s'effectue sur le vin dilué au 1/20.

	TÉMOIN	ESSAI
Solution de travail en mL :		
- tampon glycyl-glycine pH = 10,0 - acide L-glutamique - NAD ⁺ - ASAT	2,10	2,10
Vin dilué à doser (mL)	-	0,10
Eau désionisée (mL)	0,10	-
Mélanger. Lire l'absorbance A1 à 340 nm après environ 3 minutes.		
L-malate déshydrogénase (mL)	0,01	0,01
Mélanger. Lire l'absorbance A2 à 340 nm après environ 5 à 10 minutes.		

Annexe 7

TABLEAU RÉCAPITULATIF DES LIMITES CRITIQUES

SUBSTANCES CHIMIQUES	TENEURS MAXIMALES AUTORISÉES	SOURCES ET DEGRÉ D'OBLIGATION: DÉCRET → OBLIGATOIRE CEE → OBLIGATOIRE OIV → RECOMMANDÉ
Acide sorbique	200 mg/l	CEE
Dioxyde de soufre total à la consommation :		
- rouge	160 mg/l	CEE
- blanc et rosé	210 mg/l	
- rouge (sucres > 5 g/l)	210 mg/l	
- blanc et rosé (sucres < 5 g/l)	260 mg/l	
- issus d'appellations d'origine contrôlée définies (de type moelleux - doux - liquoraux,...)	300 ou 400 mg/l	
- mousseux de qualité (VMQPRD)	185 mg/l	
- mousseux	235 mg/l	
- vin doux naturel, vin de liqueur (sucres > 5 g/l)	200 mg/l	
- vin doux naturel, vin de liqueur (sucres < 5 g/l)	150 mg/l	
Vin de pays (teneurs autorisées à l'agrément) :		
- rouge	125 mg/l	
- blanc et rosé	150 mg/l	
- rouge (> 5 g/l)	150 mg/l	
- blanc et rosé (< 5g/l)	175 mg/l	
Cadmium	0,01 mg/l	OIV
Carbamate d'éthyle		Réglementation du Canada
- vin	0,03g/l	
- eau de vie	0,4 mg/l	
Cuivre	1 mg/l	CEE
Histamine	10 mg/l	Réglementation de la Suisse
Plomb	0,20 mg/l	OIV

SUBSTANCES CHIMIQUES	TENEURS MAXIMALES AUTORISÉES	SOURCES ET DEGRÉ D'OBLIGATION: DÉCRET → OBLIGATOIRE CEE → OBLIGATOIRE OIV → RECOMMANDÉ
Sulfates (exprimés en sulfate de potassium) pour les vins :	1 g/l	OIV
- ayant fait l'objet d'une période de vieillissement en fûts de deux ans au moins	1,5 g/l	
- édulcorés	1,5g/l	
- obtenus par adjonction à des moûts ou à des vins d'alcool ou d'eau de vie	1,5g/l	
- additionnés de moûts concentrés	2g/l	
- naturellement doux	2g/l	
- obtenus « sous voile »	2,5g/l	
Zinc	5 mg/l	OIV
Ferrocyanure de potassium	Absence de ferrocyanure ou de dérivés de ferrocyanure.	Décret du 19 août 1921 modifié par le décret n° 62-17 du 22 septembre 1962 (JO du 27 septembre 1962)

Sources :

- CEE = règlement (CEE) n° 822/87 portant organisation commune du marché viti-vinicole.
- OIV = recueil des méthodes d'analyse OIV.
- réglementations nationales.