

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

**Session 2008**

**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

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

Ce sujet comporte 10 pages numérotées de 1/10 à 10/10.  
Assurez-vous qu'il est complet dès qu'il vous est remis.

# BTS QUALITÉ DANS LES INDUSTRIES ALIMENTAIRES ET LES BIO-INDUSTRIES

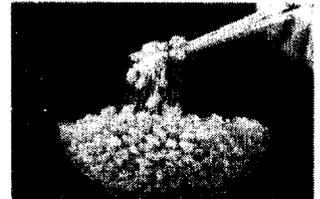
SESSION 2008

## E3 – BIOCHIMIE – BIOLOGIE

### LE NATTO

Le natto est un plat traditionnel japonais préparé à partir de fèves de soja cuites à la vapeur puis fermentées. La fermentation génère des arômes spécifiques recherchés par les amateurs de natto et de longs filaments (voir photo ci-contre).

Depuis quelques années, le natto suscite l'intérêt des occidentaux de par ses qualités nutritionnelles et ses propriétés pharmaceutiques. En effet, des activités antibiotiques, fibrinolytiques voire anticancéreuses ont été attribuées à certains de ses composés. C'est pourquoi le natto est à présent produit à échelle industrielle dans le monde entier.



Il est proposé d'étudier certaines caractéristiques biochimiques, microbiologiques et toxicologiques de ce produit agro-alimentaire.

#### 1. BIOCHIMIE (37,5 points)

Le natto est composé d'environ 30% de glucides, 30 % de protéines et 40 % de lipides.

##### 1.1. Les glucides du natto

Le natto contient des polysides.

1.1.1. Définir le terme polyside.

1.1.2. Donner un exemple en précisant sa composition et sa structure (aucune formule n'est demandée).

Le natto contient aussi des glucides monomères.

1.1.3. Donner un exemple avec sa formule développée cyclique en configuration  $\alpha$ .

##### 1.2. Les filaments du natto

Les filaments du natto sont composés d'acide polyglutamique, obtenu par polymérisation via des liaisons peptoïdes (de type peptidique) entre les groupements  $\alpha$ -aminé et  $\gamma$ -carboxylique de l'acide glutamique.

1.2.1. La chaîne latérale de l'acide glutamique correspond à la séquence :  $-(CH_2)_2 - COOH$ . Écrire la formule semi-développée de l'acide glutamique. Citer une propriété de l'acide glutamique, liée à sa chaîne latérale.

1.2.2. Construire une molécule d'acide polyglutamique, telle qu'elle existe dans le natto, comportant au moins trois molécules d'acide glutamique. Mettre en évidence les liaisons peptoïdes.

Les filaments du natto sont utilisés industriellement pour la fabrication de films et de résines très résistants, mais biodégradables.

1.2.3. Citer un type d'enzyme qui pourrait être utilisé pour dégrader ces matériaux.

### 1.3. Les protéines et les lipides du soja

Les protéines du natto, comme les protéines du soja non fermenté, sont riches en acides aminés essentiels.

1.3.1. Définir le terme « acide aminé essentiel ». Donner un exemple.

Certaines protéines de soja se sont montrées efficaces pour abaisser le taux sanguin de LDL et de cholestérol total.

1.3.2. Donner la signification du sigle LDL.

1.3.3. Faire un schéma légendé d'une LDL. Expliquer la localisation de chaque type de molécule dans la LDL.

### 1.4. La nattokinase

#### 1.4.1. Caractérisation de l'enzyme

La nattokinase est extraite du natto. Cette enzyme possède en particulier une activité fibrinolytique qui a été mise en évidence in vitro. Elle permet, plus ou moins directement, la dissolution des caillots de fibrine responsables de problèmes circulatoires (infarctus, attaque cérébrale...).

La nattokinase peut être comparée à l'urokinase, une enzyme extraite de l'urine humaine, actuellement utilisée en médecine par voie intra-veineuse pour ses propriétés fibrinolytiques.

L'urokinase porte le numéro de classification EC 3.4.21.73. ; celui de la nattokinase est EC 3.4.21.62.

1.4.1.1. Justifier le fait que ces deux enzymes catalysent des réactions chimiques similaires.

1.4.1.2. En utilisant l'annexe 1, décrire le plus précisément possible le type de réaction catalysée par l'urokinase et la nattokinase.

#### 1.4.2. Calcul d'activité

La nattokinase commercialisée sous forme de gélules pourrait être prescrite aux personnes présentant un risque cardiovasculaire supérieur à la moyenne.

On se propose de vérifier, in vitro, l'efficacité de la nattokinase.

Une solution de nattokinase (NK) est préparée à partir du contenu d'une gélule, dissout dans 250 mL de tampon sodium tétraborate : chaque gélule contient 50 mg de nattokinase, correspondant à 650 FU (unités d'activité fibrinolytique).

15  $\mu$ L de cette solution (NK) sont placés dans plusieurs puits d'une boîte de Pétri contenant un milieu agarose-fibrinogène-thrombine (voir annexe 2a), puis la boîte est incubée 21 heures. La moyenne des diamètres des zones transparentes de fibrinolyse autour des puits est égale à 0,36 cm.

Parallèlement, on effectue une gamme-étalon en disposant 15  $\mu$ L de solution de plasmine de concentrations d'activité fibrinolytique allant de 0 à 10 FU/mL dans 6 puits d'une autre boîte de Pétri contenant le même milieu. Après incubation, on obtient la courbe de l'annexe 2b.

1.4.2.1. Calculer la concentration d'activité fibrinolytique de la solution NK et l'activité fibrinolytique totale d'une gélule. Conclure.

1.4.2.2. Calculer l'activité spécifique de la nattokinase présente dans la gélule en FU/mg.

Le natto contient entre 20 et 30 FU/g.

1.4.2.3. Calculer le taux de purification de la nattokinase dans la gélule par rapport à la nattokinase présente dans le natto.

1.4.2.4. Calculer la quantité de natto qu'il est nécessaire d'absorber au petit déjeuner pour obtenir les mêmes effets que lors de l'absorption d'une gélule de nattokinase.

## 2. MICROBIOLOGIE (37,5 points)

### 2.1. Caractères morphologiques

La figure 1 de l'annexe 3 montre la photographie d'un champ microscopique après coloration de Gram, d'un frottis réalisé à partir d'un prélèvement de natto.

2.1.1. Décrire le champ observé.

2.1.2. Fournir un schéma annoté et orienté de la structure responsable de la coloration observée.

Ce germe peut persister longtemps dans le milieu environnemental, grâce à un phénomène particulier dont quelques étapes sont présentées sur la figure 2 de l'annexe 3.

2.1.3. Classer dans l'ordre chronologique les différentes étapes présentées.

2.1.4. Commenter ces étapes.

2.1.5. Annoter la figure correspondant à la dernière étape présentée.

2.1.6. Indiquer le nom et le principe d'une coloration spéciale permettant de visualiser ce phénomène.

### 2.2. Propriétés métaboliques

La consommation japonaise annuelle de natto est de 100 à 200000 tonnes. Les fèves sont cuites à la vapeur dans des containers géants puis recouvertes d'une suspension de *Bacillus natto* pulvérisée et placées dans des conditions propices à la fermentation. Après fermentation, le natto est conservé au réfrigérateur jusqu'à utilisation par le consommateur.

2.2.1. Définir précisément le terme « fermentation ».

2.2.2. Dans le cas de *Bacillus natto*, la fermentation conduit, entre autres produits, à de l'éthanol. Écrire la réaction de formation d'éthanol à partir de l'acide pyruvique (formules demandées).

*Bacillus natto* produit aussi un polymère d'acide glutamique, constituant de sa capsule.

2.2.3. Préciser les rôles de la capsule bactérienne.

### 2.3. Attaque phagique de *Bacillus natto*

Certains phages  $\Phi$  NIT1 ont la possibilité d'infecter les souches de *Bacillus natto*.

2.3.1. Donner la définition détaillée d'un phage. Indiquer les conséquences éventuelles de l'infection du germe, pour la production de natto.

La figure 1 de l'annexe 4 montre une électrographie d'un phage de *Bacillus*.

2.3.2. Retranscrire les lettres A', B', C', D', A'+B' sur la copie et nommer les structures désignées.

Pour étudier l'action des phages sur *Bacillus*, l'expérience suivante est réalisée : quatre flacons de milieu de culture adapté sont ensemencés de la façon suivante :

- milieu 1 : souche de *Bacillus* non capsulées,
- milieu 2 : souche de *Bacillus* capsulées,
- milieu 3 : souche de *Bacillus* non capsulées,
- milieu 4 : souche de *Bacillus* capsulées.

Au temps  $t_0$ , on inocule à raison de  $10^4$  UFP/mL :  
les flacons 1 et 2 : avec des phages  $\Phi$ NIT1,  
les flacons 3 et 4 : avec des phages BS5.

Pendant l'incubation aux différents temps indiqués sur les courbes de la figure 2 de l'annexe 4, les phages sont numérisés dans chacun des flacons par la technique des plages de lyse.

2.3.3. Donner le principe de cette technique.

2.3.4. Les graphes A et B présentent le nombre d'unités formant phage de lyse (UFP) en fonction du temps.

Analyser les courbes 1 et 2 du graphe A, ainsi que les courbes 3 et 4 du graphe B, de la figure 2 de l'annexe 4. Émettre des hypothèses expliquant l'action des différents phages.

### 3. TOXICOLOGIE (25 points)

#### 3.1. Production et processus d'intoxication

Le soja peut être contaminé par des moisissures du genre *Fusarium* capables de produire un métabolite secondaire présentant un risque pour le consommateur : la zéaralénone.

3.1.1. Donner le nom de ce type de métabolite secondaire toxique et préciser les facteurs favorisant sa production.

La zéaralénone pénètre facilement dans l'organisme des mammifères où elle subit diverses conversions métaboliques. Certains produits de réduction, notamment le zéaralénol, sont biologiquement plus actifs que la zéaralénone.

3.1.2. Citer et définir les trois phases classiquement décrites du processus d'intoxication.

3.1.3. Citer la phase concernée par la transformation de la zéaralénone en zéaralénol et donner le nom de ce phénomène.

#### 3.2. Effets toxicologiques

La zéaralénone et ses dérivés agissent en se fixant de façon compétitive sur les récepteurs intracellulaires des oestrogènes (hormones sexuelles stéroïdes). Ils favorisent la synthèse d'ARN et de protéines ainsi que la prolifération cellulaire ce qui augmente la masse des organes.

3.2.1. Citer les deux principaux effets toxicologiques résultant du mécanisme d'action de la zéaralénone et de ses dérivés.

La zéaralénone et ses dérivés possèdent une très faible toxicité aiguë.

3.2.2. Donner la définition de « toxicité aiguë ». Indiquer les conditions expérimentales permettant de réaliser une étude de toxicité aiguë. Préciser les paramètres que l'on peut déterminer par une telle étude.

Par ailleurs, il a été mis en évidence que la zéaralénone et ses dérivés ne sont pas génotoxiques mais cancérogènes chez l'animal. Ce sont donc des cancérogènes incomplets.

3.2.3. Définir les termes « génotoxique » et « cancérogène ». Citer les deux catégories de cancérogènes incomplets. Indiquer, en justifiant la réponse, à quelle catégorie appartient la zéaralénone et ses dérivés.

Une approche proposée pour l'estimation de la DJT de la zéaralénone chez l'homme est basée sur l'extrapolation de la DSEH (Dose Sans Effet Hormonal) obtenue chez la guenon avec un coefficient de sécurité de 100.

3.2.4. Donner la signification et la définition du terme « DJT ». Définir le coefficient de sécurité. Calculer la DJT de la zéaralénone sachant que la DSEH obtenue chez la guenon est de 50 µg/kg/j.

Outre le soja, d'autres aliments, notamment certaines céréales, peuvent également être contaminés par la zéaralénone.

3.2.5. Calculer la limite maximale de résidus (LMR) pour ces aliments, sachant que la masse moyenne d'un être humain est de 70 kg et que sa consommation moyenne journalière est de 250 g.

3.2.6. Citer le nom d'une technique immunologique utilisée en routine pour quantifier les produits toxiques tels que la zéaralénone.

## ANNEXE 1 : CLASSIFICATION ENZYMATIQUE

### EC 3.4.21 Sérine endopeptidases

- EC 3.4.21.1 chymotrypsine
- EC 3.4.21.2 chymotrypsine C
- EC 3.4.21.3 métridine
- EC 3.4.21.4 trypsine
- EC 3.4.21.5 thrombine
- EC 3.4.21.6 Facteur de coagulation Xa
- EC 3.4.21.7 plasmine
- ...
- EC 3.4.21.62 subtilisine (nattokinase)
- EC 3.4.21.63 oryzine
- EC 3.4.21.64 endopeptidase K
- EC 3.4.21.65 thermomycoline
- EC 3.4.21.66 thermitase
- EC 3.4.21.67 endopeptidase So
- EC 3.4.21.68 activateur du t-plasminogène
- EC 3.4.21.69 protéine C (activée)
- EC 3.4.21.70 endopeptidase pancréatique E
- EC 3.4.21.71 élastase II pancréatique
- EC 3.4.21.72 sérine endopeptidase spécifique des IG-A
- EC 3.4.21.73 activateur du plasminogène (urokinase)

En biochimie, les **sérine protéases ou sérine endopeptidases** (nom le plus récent) appartiennent à une classe de peptidases caractérisée par la présence d'un résidu sérine dans le site actif de l'enzyme. Les sérine protéases sont présentes dans de nombreuses fonctions de l'organisme, comme la coagulation sanguine et l'inflammation. Elles agissent aussi en tant qu'enzymes digestives, aussi bien chez les procaryotes que chez les eucaryotes.

### **Classe 3. Les hydrolases**

Ces enzymes catalysent la rupture par hydrolyse des liaisons C-O, C-N, C-C et quelques autres, y compris des liaisons ester phosphorique.

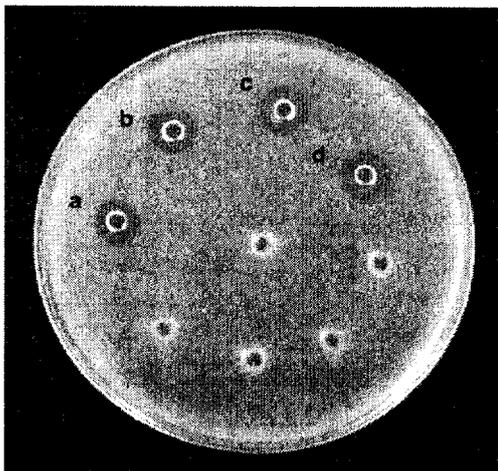
Le second nombre du numéro de code des hydrolases (sous classe), indique la nature de la liaison hydrolysée ; EC 3.1 sont les estérases ; EC 3.2 les glycosylases, etc.

Le troisième nombre précise normalement la nature du substrat : par exemple chez les estérases, les hydrolases d'esters carboxyliques (EC 3.1.1), les thioester hydrolases (EC 3.1.2), les hydrolases de monoesters phosphoriques (EC 3.1.3); Chez les glycosylases, les O-glycosidases (EC 3.2.1), N-glycosylases (EC 3.2.2), etc. Dans le cas des peptidyl-peptides hydrolases, le troisième nombre est basé sur le mécanisme catalytique (c'est le cas pour les sérine-endopeptidases).

## ANNEXE 2 : MESURE DE L'ACTIVITÉ FIBRINOLYTIQUE

La mesure de l'activité catalytique se fait en boîtes d'agarose contenant du fibrinogène et de la thrombine. Le fibrinogène est converti en fibrine sous l'action de la thrombine. La fibrine forme rapidement un réseau opalescent dans lequel sont creusés des puits de dépôt (annexe 2a).

Les solutions dont on veut mesurer l'activité fibrinolytique sont déposées dans les puits, et la boîte est incubée à 37 °C pendant 21 heures. La concentration d'activité fibrinolytique de la solution déposée est proportionnelle au diamètre de la zone de fibrinolyse (la zone claire autour du puits, voir annexe 2a).

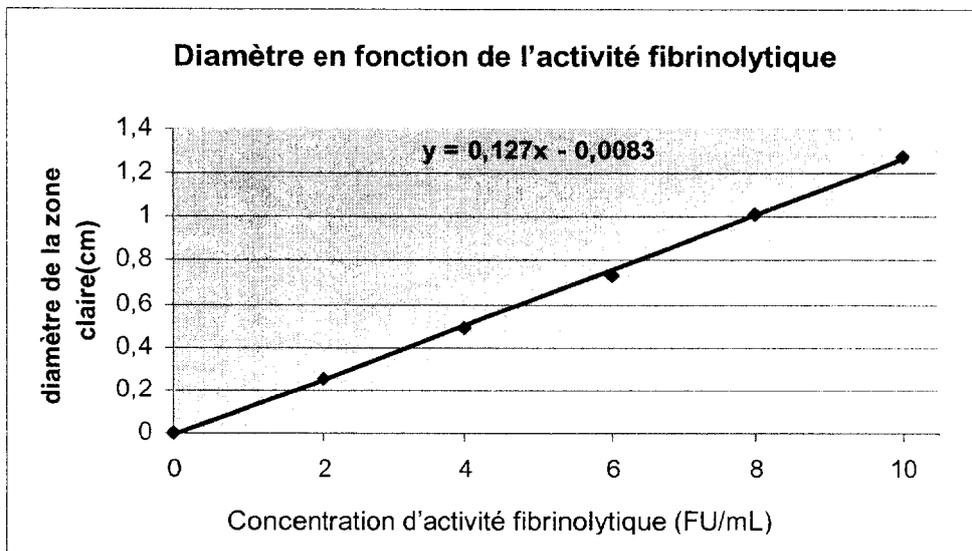


### a- Boîte de Pétri avec réseau de fibrine

L'activité fibrinolytique est proportionnelle au diamètre de fibrinolyse (espace transparent) autour du puits.

On établit une gamme-étalon à partir de solutions de plasmine de concentration d'activité catalytique connue.

### b- Droite d'étalonnage

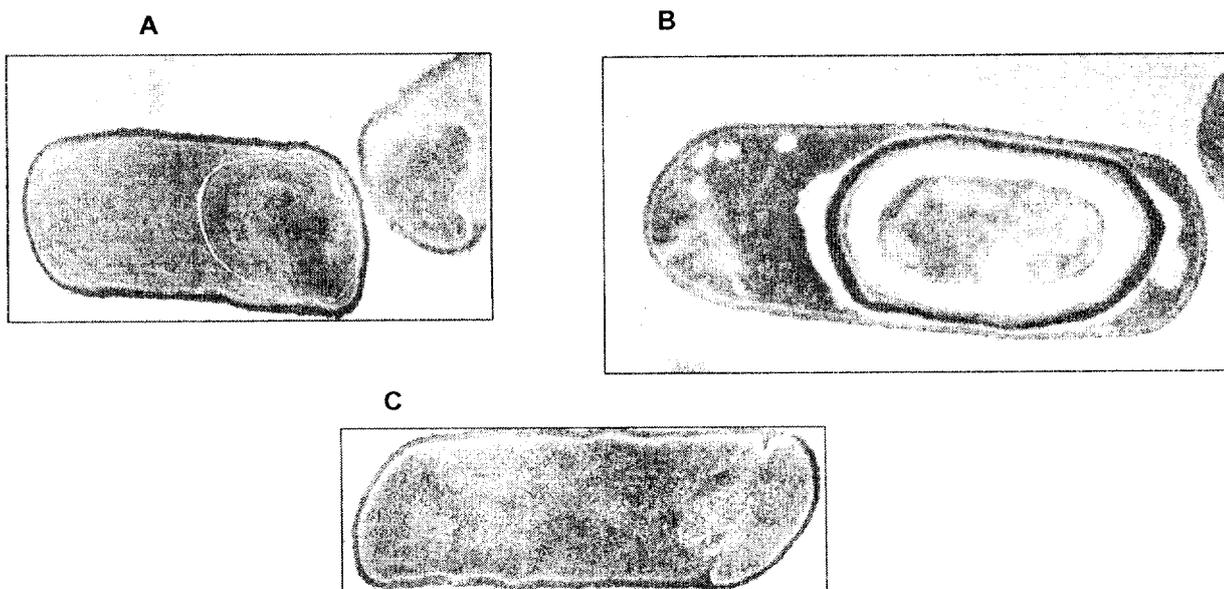


ANNEXE 3  
À RENDRE AVEC LA COPIE

Figure 1 : Observation microscopique de *Bacillus natto* après coloration de Gram (coloration violette)



Figure 2 : électronographies de *Bacillus natto*



## ANNEXE 4

Figure 1 : électronographie d'un phage de *Bacillus*

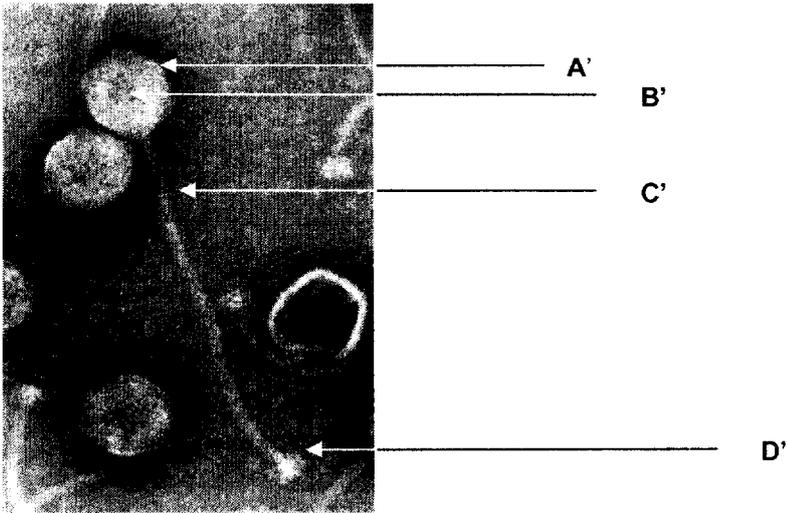


Figure 2 : action de différents phages sur les souches de *Bacillus*

