

BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR

QUALITÉ DANS LES INDUSTRIES ALIMENTAIRES ET LES BIO-INDUSTRIES

E3 – BIOCHIMIE-BIOLOGIE

SESSION 2018

Durée : 4 heures
Coefficient : 5

Matériel autorisé :

L'usage de tout modèle de calculatrice, avec ou sans mode examen, est autorisé.

Document à rendre avec la copie :

Annexe A page 12/12

Les trois parties du sujet sont indépendantes et sont à rédiger sur trois copies séparées.

Dès que le sujet vous est remis, assurez-vous qu'il est complet.
Le sujet se compose de 12 pages, numérotées de 1/12 à 12/12.

BTS Qualité dans les industries alimentaires et les bio-industries		Session 2018
E3 – Biochimie-Biologie	Code : QABIOCH	Page : 1/12

OPTIMISATION DE FERMENTS LACTIQUES

Le yaourt est un lait fermenté dont certaines caractéristiques sont présentées dans le tableau suivant :

Nature des ferments lactiques	<i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Lactobacillus delbrueckii sbsp bulgaricus</i>
Nombre de bactéries	>10 millions par gramme
Teneur en acide lactique	>0,7 %

L'optimisation des ferments lactiques est un enjeu essentiel pour les fabricants de produits laitiers, la sélection des souches bactériennes est en effet primordiale. Une nouvelle technique adaptée d'un phénomène de résistance naturelle de bactéries aux phages permet la modification du génome des bactéries et l'amélioration de leur efficacité. Quelques aspects théoriques et appliqués de la technique Crispr-Cas 9 seront étudiés.

PARTIE BIOCHIMIE (40 POINTS)

1. ASPECTS THEORIQUES DE LA FERMENTATION LACTIQUE

1.1. Lors de la fabrication de yaourt, la fermentation lactique met en jeu le lactose du lait. Représenter la molécule de lactose (β -D galactopyranose 1-4 D glucopyranose) selon Haworth et préciser en justifiant s'il s'agit d'un glucide réducteur.

1.2. Compléter l'annexe A présentant un schéma simplifié du métabolisme assuré par les ferments lactiques et donner le bilan énergétique de la transformation du lactose en acide lactique. Préciser l'intérêt pour les bactéries lactiques de réaliser cette fermentation.

1.3. Le lait utilisé pour fabriquer 100 g de yaourt contient 4,8 g de lactose.

Déterminer la masse de lactose nécessaire pour produire 0,7 g d'acide lactique pour 100 g de yaourt. Calculer le pourcentage de lactose hydrolysé.

Déterminer la teneur en lactose résiduel d'un yaourt et préciser la possibilité de consommation de ce produit par une personne intolérante vis-à-vis du lactose.

Données :

$M_{\text{acide lactique}} = 90,08 \text{ g.mol}^{-1}$, $M_{\text{lactose}} = 342,3 \text{ g.mol}^{-1}$

Le devenir du galactose ne sera pas envisagé et 2 moles d'acide lactique sont produites à partir d'une mole de lactose.

2. DOSAGE DE L'ACIDITE DU YAOURT PAR METHODE ENZYMATIQUE

L'annexe 1 présente le dosage enzymatique de l'acide lactique d'un yaourt.

2.1. Donner en le justifiant le nom de cette méthode de dosage enzymatique.

2.2. Justifier la réalisation de la dilution 1/100 pour l'échantillon.

2.3. Préciser l'intérêt de la mesure de l'absorbance A1 puis de l'absorbance A2.

2.4. Vérifier la formule : $\rho_{\text{(acide lactique, échantillon dilué)}} = 0,3232 \times \Delta A \text{ en g.L}^{-1}$. En déduire la teneur en acide lactique du yaourt et conclure sur sa conformité.

Donnée : densité yaourt = 1,033

BTS Qualité dans les industries alimentaires et les bio-industries	Session 2018
E3 – Biochimie-Biologie	Code : QABIOCH Page : 2/12

3. AMELIORATION DES FERMENTS GRACE A LA TECHNIQUE CRISPR-CAS9

3.1. Structure de l'ADN

L'ADN bactérien est un polynucléotide avec une structure en double hélice.

3.1.1. Indiquer la composition d'un nucléotide. En vous aidant de l'annexe 2, citer les molécules constitutives de l'ADN.

3.1.2. Donner le nom des interactions faibles permettant la formation de la double hélice d'ADN et préciser la nature des bases azotées complémentaires.

3.1.3. Schématiser une partie de l'ADN (enchaînement de 3 paires de bases).

3.2. Modification du génome des ferments par la technique Crispr-Cas9

La technique Crispr-Cas9, consiste à associer à l'enzyme Cas9 un petit ARN reconnaissant la région du génome à modifier (annexe 3). L'enzyme Cas9 coupe l'ADN à l'endroit ciblé. Cette coupure déclenche sa réparation, soit par recollement des deux extrémités séparées, soit par recombinaison avec un fragment d'ADN de synthèse introduit dans la cellule.

3.2.1. Nommer la liaison détruite par Cas9 et préciser la famille de cette enzyme.

3.2.2. Indiquer le nom des molécules A et B et de l'interaction C de l'annexe 3.

3.2.3. En considérant que l'enzyme Cas9 coupe l'ADN au milieu de la séquence guide, écrire les séquences des bases azotées des deux extrémités générées (cinq par brin et par extrémité).

3.2.4. Expliquer pourquoi cette technique peut permettre d'améliorer les ferments lactiques.

PARTIE MICROBIOLOGIE

(39 POINTS)

1. CARACTERISTIQUES DES FERMENTS LACTIQUES DU YAOURT

Le tableau de l'annexe 4 présente plusieurs critères microbiologiques des ferments du yaourt.

1.1. Réaliser un schéma de l'ultrastructure de la paroi de ces deux types de bactéries.

1.2. Indiquer le test enzymatique à réaliser après la coloration de Gram dans une démarche d'identification des deux souches bactériennes.

1.3. Préciser la signification du terme « homofermentaire » et qualifier le comportement des deux souches bactériennes du ferment vis-à-vis de la température.

1.4. Définir l'expression « facteur de croissance » et illustrer par différents exemples. Préciser en le justifiant le type trophique des deux souches bactériennes vis-à-vis des facteurs de croissance.

1.5. Citer trois critères de sélection de ferments lactiques.

BTS Qualité dans les industries alimentaires et les bio-industries		Session 2018
E3 – Biochimie-Biologie	Code : QABIOCH	Page : 3/12

2. SUIVI DE CROISSANCE DES FERMENTS LACTIQUES

Les résultats du dénombrement de ferment de yaourt sont présentés en annexe 5.

2.1. Lister les différentes phases de croissance de *Lactobacillus bulgaricus*. Indiquer leur durée.

2.2. Déterminer le temps de génération pour *Lactobacillus bulgaricus*.

2.3. Analyser les courbes de croissance de l'annexe 5. Proposer une hypothèse concernant les interactions entre les deux souches.

2.4. Déterminer la concentration de bactéries (UFC.g⁻¹ de yaourt) en fin de fermentation et conclure sur la conformité du yaourt fabriqué.

3. CRISPR-CAS9 ET ACTIVITE DES FERMENTS LACTIQUES DU YAOURT

3.1. Résistance naturelle des bactéries vis-à-vis des phages grâce au système Crispr-Cas9

Chez les bactéries, Crispr est une région du génome qui a intégré des fragments d'ADN provenant des phages les ayant infectés. En cas de nouvelle infection phagique, les bactéries comparent l'ADN du virus à ces fragments. Si une séquence est reconnue, une enzyme (Cas9) guidée par un court fragment d'ARN, coupe l'ADN viral dans cette séquence, ce qui le détruit.

3.1.1. Définir le terme phage et expliquer les deux types d'infection phagique en nommant les types de phages concernés.

3.1.2. Préciser la conséquence possible de la présence de phages dans le lait lors de la fabrication de yaourt.

3.2. Amélioration des performances des ferments lactiques grâce au système Crispr-Cas9

Le génome d'une souche de *Streptococcus thermophilus* a été modifié afin de rendre la souche plus efficace.

L'annexe 6 présente une expérience comparant la dépendance de la souche modifiée et de la souche native à différents facteurs de croissance.

Le tableau de l'annexe 7 récapitule les caractéristiques cinétiques des deux souches.

3.2.1. Après avoir indiqué la composition et le rôle du témoin, analyser les résultats de cette expérience et conclure sur l'intérêt de la modification génomique de *Streptococcus thermophilus* grâce au système Crispr-Cas9.

3.2.2. Comparer les performances cinétiques de la souche native et de la souche modifiée de *Streptococcus thermophilus* grâce au système Crispr-Cas9.

PARTIE TOXICOLOGIE (21 POINTS)

Les ferments lactiques peuvent être utilisés pour lutter contre les mycotoxines telles que les aflatoxines.

1. POUVOIR TOXIQUE DES MYCOTOXINES

1.1. Définir le terme mycotoxine. Citer 2 types d'aliments concernés par la contamination aux mycotoxines. Nommer un genre microbien producteur de mycotoxine.

1.2. Certaines aflatoxines peuvent être mutagènes, tératogènes et cancérogènes. Définir ces trois termes.

1.3. Les aflatoxines sont métabolisées par diverses enzymes microsomiales et sont ensuite éliminées.

1.3.1. Décrire les deux étapes constituant la voie microsomiale. Préciser les voies d'élimination.

1.3.2. Lors de la métabolisation des aflatoxines, certains dérivés époxydes peuvent apparaître. Nommer ce phénomène, l'expliquer brièvement et indiquer les conséquences possibles pour l'organisme.

1.4. L'aflatoxine B1 a une DSE établie chez le rat à $0,63 \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$, sa DJT dans les aliments est de $0,15 \text{ ng.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$.

1.4.1. Définir DSE et DJT.

1.4.2. Expliquer la technique classique de détermination de la DJT. Préciser en justifiant si cette technique s'applique à l'aflatoxine B1. Proposer une explication.

2. UTILISATION DE FERMENTS LACTIQUES CONTRE LES MYCOTOXINES

Des études sont réalisées pour utiliser les ferments lactiques afin de détruire les mycotoxines ayant pu contaminer des aliments.

L'exemple de l'aflatoxine M1 est présenté en annexe 8.

2.1. Analyser la courbe témoin et proposer une hypothèse d'explication.

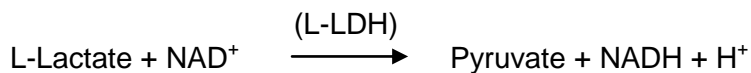
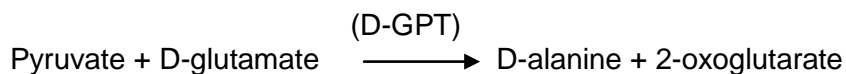
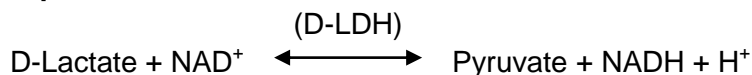
2.2. Préciser pourquoi certaines courbes sont incomplètes.

2.3. Analyser les résultats des laitsensemencés et conclure sur l'efficacité *in vitro* des ferments lactiques dans la destruction des mycotoxines.

2.4. Proposer une application *in vivo* de ces résultats.

ANNEXE 1 : DOSAGE ENZYMATIQUE DE L'ACIDE LACTIQUE

Equations de réaction :



La quantité de NADH formé est mesurée par lecture de l'absorbance à 340 nm.

Réactifs :

Solution 1 : tampon

Suspension 2 : NAD^+

Suspension 3 : D-glutamate pyruvate transaminase

Suspension 4 : L-lactate déshydrogénase

Suspension 5 : D-lactate déshydrogénase

Echantillon : yaourt

Mode opératoire :

Déposer dans les cuves :	Blanc (μL)	Echantillon (μL)
Eau désionisée	1600	1500
Echantillon	-	100
Solution 1	500	500
Solution 2	100	100
Suspension 3	20	20
Mélanger, lire l'absorbance A1 après environ 3 minutes et ajouter :		
Suspension 5	20	20
Suspension 4	20	20
Mélanger, lire l'absorbance A2 après environ 10 minutes.		

Résultats :

	Blanc	Echantillon
A1	0,101	0,103
A2	0,102	0,351

Données :

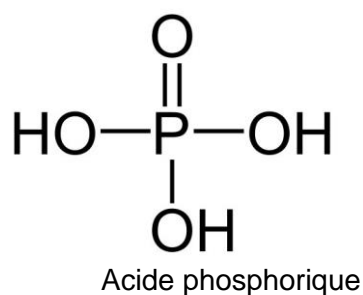
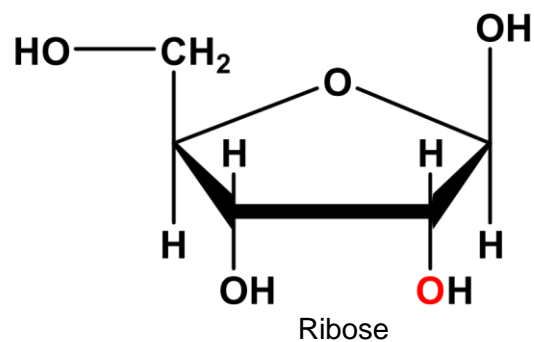
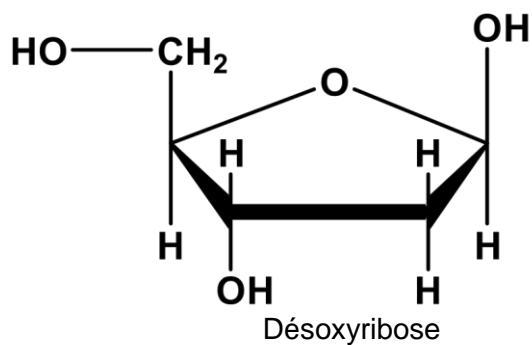
$$\Delta A = (A2_{\text{échantillon}} - A1_{\text{échantillon}}) - (A2_{\text{blanc}} - A1_{\text{blanc}})$$

$$\epsilon_{(\text{NADH}, 340 \text{ nm})} = 6300 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$$

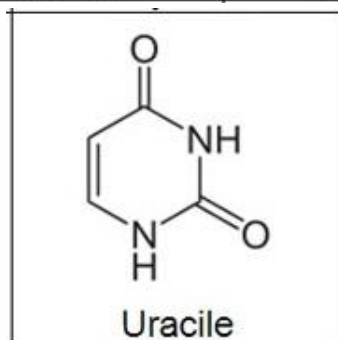
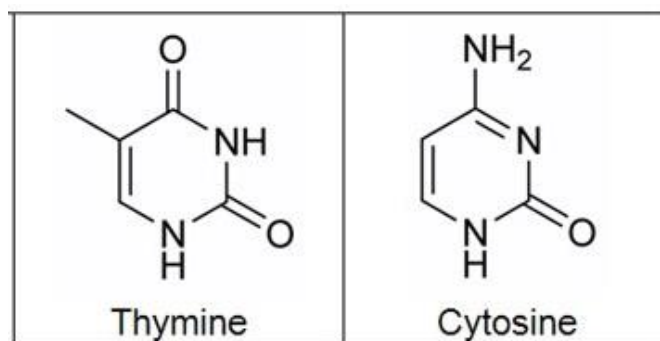
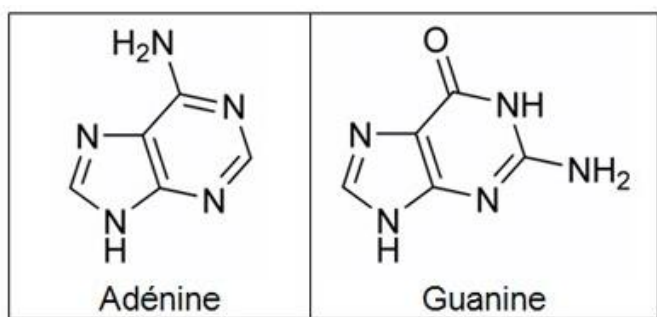
Dilution de l'échantillon :

Concentration estimée d'acide lactique (g/L)	Facteur de dilution
<0,3	1
0,3 – 3	10
3 – 30	100
>30	1000

ANNEXE 2 : FORMULES MOLECULAIRES

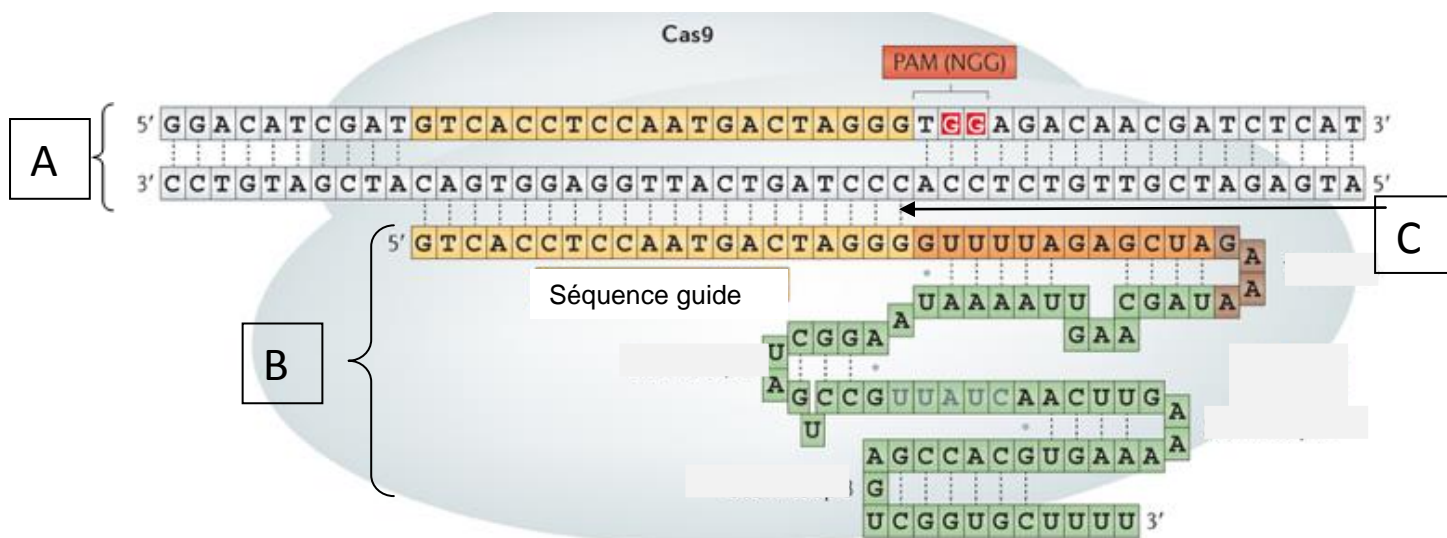


Bases azotées :



ANNEXE 3 : SCHEMA SYNTHETIQUE DU SYSTEME CRISPR-CAS9

Source : Adapté de Kim et Kim. A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nature Reviews Genetics*, 2014,15.5, 321-34



ANNEXE 4 : CRITERES MICROBIOLOGIQUES DES FERMENTS DU YAOURT

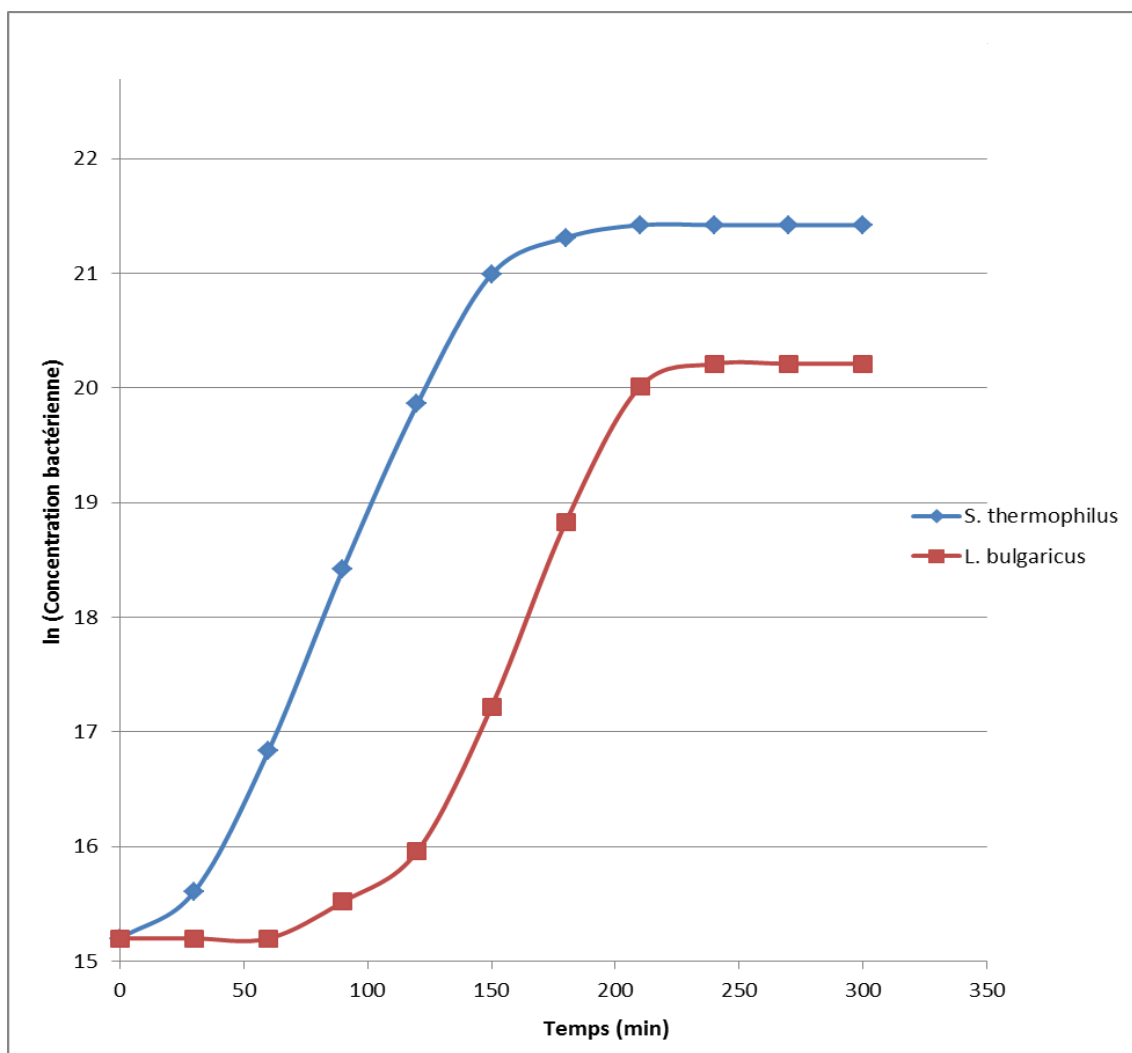
	Morphologie	Type de métabolisme	Température optimale de croissance	Croissance en absence de facteurs de croissance	Sensibilité aux β -lactamines
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Coques Gram+	Homofermentaire	45 °C	Non	Oui
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> sbsp <i>bulgaricus</i>	Bacilles Gram+	Homofermentaire	45 °C	Non	Oui

ANNEXE 5 :

DENOMBREMENT DE FERMENTS DE YAOURT

Temps (min)	ln (concentration bactérienne en UFC.g ⁻¹)	
	<i>S. thermophilus</i>	<i>L. bulgaricus</i>
0	15,20	15,20
30	15,61	15,20
60	16,84	15,20
90	18,42	15,52
120	19,86	15,96
150	20,99	17,22
180	21,31	18,83
210	21,42	20,01
240	21,42	20,21
270	21,42	20,21
300	21,42	20,21

SUIVI DE CROISSANCE DES FERMENTS LACTIQUES



ANNEXE 6 : DEPENDANCE DES SOUCHES ETUDIEES VIS-A-VIS DE DIFFERENTS FACTEURS DE CROISSANCE

Mode opératoire :

Deux boîtes de gélose exempte de facteurs de croissance sontensemencées, la première avec la souche native de *Streptococcus thermophilus* et la deuxième par la souche modifiée grâce à Crispr-Cas9.

Trois disques sont déposés à la surface de la gélose :

- un témoin,
- un disque imprégné du facteur de croissance 1,
- un disque imprégné du facteur de croissance 2,
- un disque imprégné du mélange des facteurs de croissance 1 et 2.

Résultats :

Les diamètres des zones de croissance (en mm) sont indiqués dans le tableau :

	Boîte <i>Streptococcus thermophilus</i> native	Boîte <i>Streptococcus thermophilus</i> Modifiée (Crispr-Cas9)
Témoin	0	0
Disque Facteur de croissance 1	0	20
Disque Facteur de croissance 2	0	0
Disque mélange de facteurs croissance 1 et 2	20	30

ANNEXE 7 : CARACTERISTIQUES CINETIQUES DES SOUCHES BACTERIENNES ETUDIEES

	Souche <i>Streptococcus thermophilus</i> native	Souche <i>Streptococcus thermophilus</i> modifiée (Crispr-Cas9)
Temps de génération (min)	30	13
Productivité (UFC.g ⁻¹ .min ⁻¹)	6.10 ⁶	6.10 ⁷

ANNEXE 8 : INFLUENCE DES SOUCHES ETUDIEES SUR L'ELIMINATION DE L'AFLATOXINE EN COURS DE FERMENTATION

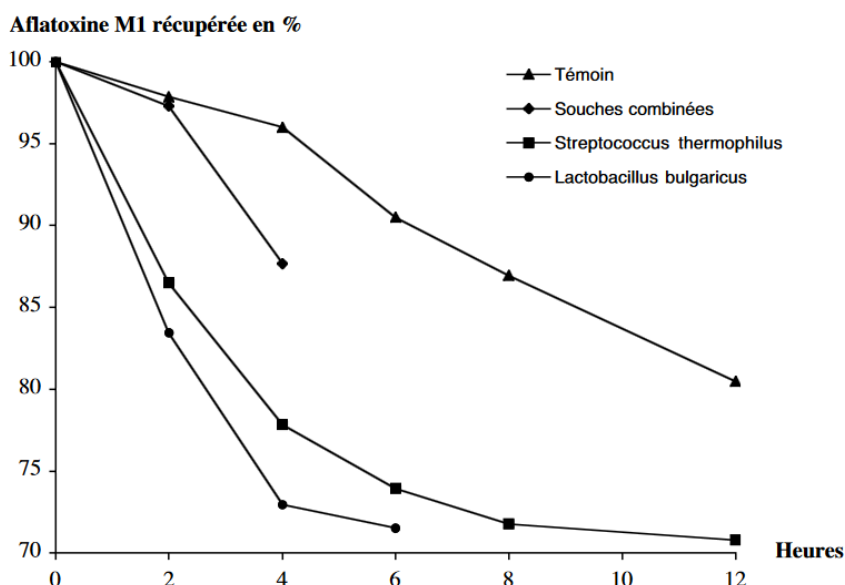
Mode opératoire :

Des laits sont contaminés avec une solution d'aflatoxine M1, ils sont ensuiteensemencés soit avec *Lactobacillus bulgaricus*, soit avec *Streptococcus thermophilus*, soit avec les deux souches combinées. Un témoin sans ensemencement est également réalisé. L'ensemble est incubé à 44 °C.

Afin de suivre l'évolution de la concentration en aflatoxine M1 au cours des différentes fermentations, des prélèvements sont réalisés à des intervalles de temps réguliers. L'incubation est arrêtée lorsque l'acidité Dornic du mélange atteint 90 °D, valeur obtenue après 6 h pour *Lactobacillus bulgaricus* et 4 h pour les deux souches combinées.

L'aflatoxine résiduelle est ensuite extraite, purifiée et dosée par chromatographie haute performance. **L'efficacité de l'extraction diminue avec la durée de contact entre l'aflatoxine et les protéines du milieu.**

Résultats :



Effet de deux bactéries lactiques en cultures pures ou combinées sur l'évolution de la concentration d'aflatoxine M1 d'un lait contaminé.

Source : M. KHADDOR et al. Destruction de l'aflatoxine M1 par les bactéries lactiques du Lben marocain et du yaourt. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 2003, 142, 101-112.

ANNEXE A

A COMPLETER ET A REMETTRE AVEC LA COPIE

