

BTS QUALITÉ DANS LES INDUSTRIES ALIMENTAIRES ET LES BIO-INDUSTRIES

SESSION 2002

E3 – BIOCHIMIE – BIOLOGIE –U 3

Durée : 4 heures

Coefficient : 5

Calculatrice autorisée

LES PRODUITS DE LA MER

La chair de poisson constitue une source de protéines dont la qualité nutritive est souvent supérieure à celle de la viande. Or aujourd'hui, seules quelques espèces sont directement consommées en alimentation humaine. Cette sélectivité du consommateur peut tenir à diverses raisons : habitudes alimentaires, mais aussi faible appétence des produits, dégradation rapide après la mort de l'animal ...

L'altération qui commence dès la mort, est un processus complexe mettant en jeu des phénomènes physiques, chimiques et bactériologiques.

Les changements enzymatiques *post mortem* sont d'abord dus aux enzymes tissulaires et digestives, qui restent remarquablement actives à basse température. Ils aboutissent à la formation d'un grand nombre de molécules de faible poids moléculaire, constituant avec les autres composés extractibles de la chair les premiers substrats de la croissance bactérienne. D'autre part, les enzymes digestives détruisent la barrière intestinale, permettant aussi la dissémination des germes.

Quelques aspects biochimiques et microbiologiques de la technologie des produits de la mer seront abordés ici.

BIOCHIMIE (40 points)

1- Dégradation de la chair de poisson (13 points)

L'évolution du muscle après la mort de l'animal est représenté en annexe 1.

- 1-1- Quels sont les phénomènes biochimiques à l'origine de la rigidité cadavérique?
- 1-2- A quelle voie métabolique correspond l'expression "glycolyse anaérobie" ? Ecrire la réaction enzymatique permettant d'aboutir à l'acide lactique. Justifier cette orientation du métabolisme de la cellule musculaire, à cette phase de l'évolution du muscle.
- 1-3- L'histamine est une substance dont la présence dans la chair de poisson peut entraîner des réactions physiologiques graves chez le consommateur. C'est une amine qui dérive de l'histidine (annexe 1) au cours de la dégradation. Ecrire l'équation de la réaction chimique responsable de l'apparition d'histamine en précisant le nom de l'enzyme.
- 1-4- La dégradation de l'ATP et de l'AMP (adénosine monophosphate), par désamination oxydative, aboutit à des métabolites tels que l'IMP (inosine 5' mono phosphate), l'inosine et l'hypoxanthine. Cette dégradation dépendant autant des conditions que de la durée de conservation, ces métabolites sont de bons indicateurs de l'état de fraîcheur du poisson. Ils sont mis en évidence par coloration (tests de fraîcheur). D'après les données de l'annexe 2, écrire la formule de l'AMP (adénosine 5' monophosphate) et de l'hypoxanthine.

2- Exemples de valorisation des produits de la mer. (27 points)

2-1- Préparation d'hydrolysats protéiques : la fermentation des produits marins est utilisée depuis l'Antiquité, à des fins diverses : conservation, modification des propriétés organoleptiques... Le procédé de production traditionnel des sauces de poisson dans de nombreux pays d'Asie est simple : les poissons sont mélangés avec 20 à 40 % de sel et stockés à température ambiante (température tropicale) pendant 6 à 12 mois. L'hydrolysats protéique obtenu est prélevé, filtré et conditionné. Il s'agit d'un autolysat ; seules sont intervenues des enzymes endogènes.

2-1-1- Écrire l'équation générale d'hydrolyse qui a lieu au cours de cette transformation. Quel type d'enzyme peut intervenir ?

Pour contrôler et optimiser cette production, par exemple en diminuer la durée, il est possible d'ajouter des enzymes exogènes (enzymes bactériennes ou végétales). Dans cet objectif, on étudie un extrait de papaïne (EC.3.4.22.2), enzyme protéolytique du latex du papayer. On détermine ses paramètres cinétiques (K_M et V_m) sur l'enzyme libre et sur l'enzyme immobilisée sur gel de Sephadex.

2-1-2- Que signifie le terme "enzyme immobilisée" ? Quel est l'intérêt de cette technique dans le cas étudié ?

2-1-3- La réaction enzymatique étudiée est l'hydrolyse d'un substrat synthétique, le p-nitrophényl carbobenzoxy-tyrosine. Il y a libération de p-nitrophénol. La cinétique de la réaction est suivie par mesure de l'absorbance à 405 nm. Dans le tableau, en annexe 2, sont reportées les valeurs des vitesses initiales obtenues pour diverses concentrations de substrat.

Déterminer dans chaque cas K_M et V_m , en utilisant la représentation de Lineweaver-Burk, $1/v_i = f(1/[S])$. Comparer et conclure.

2-1-4- Sachant que pour la mesure des vitesses initiales, on a ajouté 0,050 mL d'extrait enzymatique à 2,000 mL de solution de travail (substrat ; tampon pH 6) calculer la concentration d'activité catalytique de l'extrait utilisé. Le résultat sera exprimé en unités d'enzyme par centimètre cube d'extrait ($U \cdot cm^{-3}$).

Donnée : une unité d'enzyme correspond à la quantité d'enzyme transformant une micromole de substrat en une minute.

2-2- Supplémentation des aliments.

Les huiles de poisson sont riches en acides gras polyinsaturés ω_3 EPA (acide éicosapentaénoïque, C20:5 n-3) et DHA (acide docosahexaénoïque, C22:6 n-3). Elles ont été incorporées avec succès dans certains aliments, grâce à l'utilisation d'un procédé de séchage par atomisation.

2-2-1- Écrire les formules chimiques de ces deux acides gras.

2-2-2- L'instabilité de ces acides gras implique le recours au procédé cité ci-dessus : d'où provient cette instabilité ? Quels types de produits de dégradation obtient-on ?

TOXICOLOGIE (14 points)

Le mercure est l'unique métal qui s'accumule avec l'âge chez les animaux marins, essentiellement chez les prédateurs. Le mercure inorganique Hg^0 qui provient autant de l'activité humaine que d'un dégazage naturel de l'écorce terrestre, pénètre peu dans les cellules. Par contre, le méthylmercure (CH_3HgCl) et le diméthylmercure (CH_3HgCH_3) présentent 100% de pénétration dans les cellules et une forte affinité pour les tissus nerveux. Ces dérivés organiques sont formés par des bactéries sulfatoréductrices en milieu fortement anaérobie.

- 1- Comment peut-on expliquer le comportement de ces dérivés du mercure dans l'organisme ? En reprenant le cycle du mercure, expliquer le phénomène de concentration chez les poissons prédateurs et chez l'homme.
- 2- L'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) a défini, pour le mercure, une Dose Journalière Tolérable (DJT) de méthylmercure de $0,47 \mu g/kg/jour$.
Comment détermine-t-on une DJT ? Cette donnée est-elle suffisante dans le cas présent ?
La DHTP (Dose Hebdomadaire Tolérable Provisoire) est la dose qui peut être consommée de façon hebdomadaire pour la vie entière, sans incidence négative sur la santé. Estimer cette valeur pour un individu de 60 kg.
- 3- Ce sont cependant des législations nationales qui définissent le seuil de contamination pour la commercialisation des produits : ainsi, en Europe, la limite de mercure total dans le poisson commercialisable est fixée à $0,5 \mu g/g$ de produit frais, à l'exception de 20 espèces (thon, espadon, raie...) pour lesquelles on tolère une limite à $1 \mu g/g$.
Dans ces conditions, on peut préconiser de "**limiter à un repas par semaine la consommation d'espadon, de requin ou de thon, frais ou congelé. Pour les jeunes enfants et les femmes en âge de procréer, la limite recommandée pour ces espèces est de un repas par mois**".
Justifier ces directives.

MICROBIOLOGIE (46 points)

En ce qui concerne la qualité microbiologique du poisson et des produits de la pêche, deux aspects sont à considérer :

- l'aspect économique, les produits de la mer, fragiles, devant répondre au moment de la commercialisation à divers critères organoleptiques.
- l'aspect sanitaire, le consommateur devant être protégé contre la présence de microorganismes pathogènes.

1 – Dégradation et conservation de la chair de poisson (23 points)

1-1 Quelques aspects de la dégradation de la chair de poisson

L'évolution du muscle après la mort de l'animal est représentée en annexe 1. Par comparaison avec le muscle du mammifère (viande de boucherie), la chair de poisson est caractérisée par une hydratation plus importante, une faible diminution initiale du pH, insuffisante pour inhiber le développement bactérien et par la présence de bactéries psychrophiles.

La chair d'un animal sain est stérile. Par contre, la peau, les branchies et les intestins (lorsque le poisson s'alimente) hébergent une flore commensale plus ou moins abondante.

La flore de surface des poissons pêchés en eaux froides ou tempérées est nettement dominée par des bactéries à Gram négatif, psychrophiles (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Vibrio* : 90 %), les bactéries à Gram positif étant nettement moins représentées (corynéformes, *Micrococcus* 10 %).

Après une phase de latence correspondant à la *rigor mortis*, les bactéries vont se développer de façon exponentielle.

- 1-1-1 Donner la définition du terme psychrophiles.
- 1-1-2 Le tableau 1 de l'annexe 3 présente l'évolution de la flore microbienne de steaks d'espadon conditionnés sous air et stockés à 3,5°C. Commenter ces résultats.
- 1-1-3 Le tableau 2 de l'annexe 3 présente les résultats du dénombrement de la flore totale de la chair de Merlu après stockage à 0°C ou à 5°C.
 - 1-1-3-1 Tracer sur la même feuille les courbes de croissance ($\text{LnN} = f(\text{temps})$) à chaque température de stockage.
 - 1-1-3-2 Déterminer le temps de génération moyen de la flore totale à 0°C et à 5°C, ainsi que la vitesse de croissance de la flore totale à ces deux températures.
 - 1-1-3-3 Commenter ces résultats.

1-2 Quelques aspects de la conservation des produits de la mer.

Afin de préserver plus longtemps les qualités du poisson frais, différents procédés sont utilisés, dont le conditionnement sous atmosphère contrôlée et le traitement en surface par du lysozyme. Le conditionnement sous atmosphère contrôlée permet en particulier une augmentation de la pression partielle en dioxyde de carbone au contact de l'aliment.

1-2-1 Donner des hypothèses sur le mode d'action de l'augmentation de la pression partielle en dioxyde de carbone au contact de l'aliment.

Le traitement par du lysozyme peut être réalisé en surface du poisson au cours du stockage. Le lysozyme agit en altérant la structure de la paroi bactérienne.

1-2-2 Schématiser la structure de la paroi sur laquelle agit le lysozyme.

1-2-3 Indiquer sur ce schéma le site d'action du lysozyme.

2- Quelques aspects des toxi-infections dues aux produits de la mer. (23 points)

Les poissons pêchés dans des eaux non polluées ne portent que très rarement des bactéries pathogènes pour l'homme, en dehors en particulier de *Vibrio parahaemolyticus*, qui sont des contaminants naturels du poisson.

Vibrio parahaemolyticus est une bactérie adaptée au milieu marin et responsable de gastro-entérites. Les produits incriminés sont essentiellement des coquillages et crustacés consommés crus ou peu cuits, et sans étape de réfrigération préalable.

2-1 Recherche de *Vibrio parahaemolyticus* dans les coquillages et crustacés.

Ce germe qui présente une halophilie modérée mais obligatoire, est détruit par la chaleur (48°C) et par le froid (0-5°C). Il n'utilise pas le saccharose et ne produit pas d'H₂S.

Sa recherche fait l'objet d'une technique normalisée (norme NF-45-111). Il s'agit d'une technique semi quantitative comprenant trois phases successives :

- une étape d'enrichissement en milieu sélectif (eau peptonée + NaCl 30 g.L⁻¹) à pH 8,6. Cet enrichissement a lieu sur un volume important de chair de coquillage (25 ou 50 mL).
- Une étape d'isolement réalisée à partir de l'enrichissement incubé 7 à 8 heures à 37°C. Le milieu TCBS (Thiosulfate-Citrate-Bile-Saccharose) classiquement employé pour la recherche des *Vibrio* est utilisé le plus fréquemment. Sa composition est fournie en annexe 4. Après incubation à 37°C pendant 18 à 24 heures, les colonies suspectes apparaissent lisses, vertes, d'un diamètre de 2 à 3 mm.
- Une étape de confirmation : les colonies suspectes doivent être confirmées soit sur des milieux classiques, soit sur galerie API20E ou API20NE. Dans tous les cas, les milieux ou le diluant pour suspensions doivent être additionnés de sel (30 g.L⁻¹ NaCl).

- 2-1-1 Donner la définition du terme halophile.
- 2-1-2 Quel est l'intérêt de l'étape d'enrichissement ? Donner les caractéristiques d'un milieu d'enrichissement.
- 2-1-3 Donner le(s) rôle(s) de chaque composant du milieu TCBS. Justifier l'aspect des colonies suspectes après l'étape d'isolement.
- 2-1-4 Quel est le rôle de l'étape de confirmation ?
- 2-1-5 Pourquoi faut-il utiliser des milieux contenant 30 g.L⁻¹ de NaCl ?

2-2 Toxi-infections dues à la consommation de produits de la mer.

- 2-2-1 La pathogénicité de *V. parahaemolyticus* est liée à la production d'une entérotoxine. Décrire les étapes d'une toxi-infection due à un germe entérotoxique.
- 2-2-2 Le virus de l'hépatite A appartient à la famille des picornavirus (virus nu de structure icosaédrique à ARN ⊕).
 - 2-2-2-1 Citer les caractéristiques et propriétés retenues pour établir la classification des virus animaux.
 - 2-2-2-2 Schématiser et commenter le cycle de réplication du virus de l'hépatite A.
 - 2-2-2-3 Comment expliquer la présence à forte concentration de ce virus dans les coquillages ?
 - 2-2-2-4 Citer un traitement efficace pour détruire le virus de l'hépatite A dans l'alimentation.

PHASE DE PRE-RIGOR

Phase d'excitabilité musculaire et de contractions fibrillaires

pH voisin de 7

Beaucoup de protéines extractibles

Fermeté, cohésion, dureté, hydratation après cuisson dépendent du degré de contraction du muscle

Glycolyse anaérobie → acide lactique

PHASE DE RIGIDITÉ CADAVÉRIQUE

Rigor Mortis de 1 à 7 heures après la mort

Le pH descend vers 6

Peu de protéines extractibles

Chair dure après cuisson

PHASE DE RÉOLUTION DE LA RIGIDITÉ CADAVÉRIQUE

Post Rigor

Rupture de la structure du collagène

Le pH remonte vers 7

Beaucoup de protéines extractibles

Chair hydratée, juteuse, plastique, tendre après cuisson

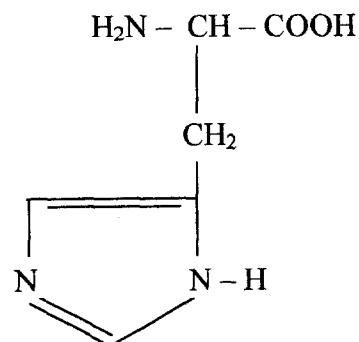
Enzymes endogènes et enzymes bactériennes

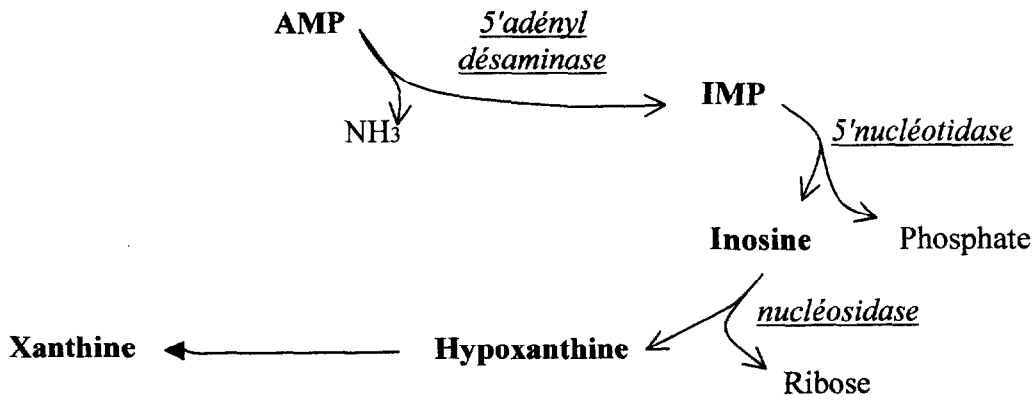
PHASE D'AUTOLYSE

Le pH est supérieur à 7

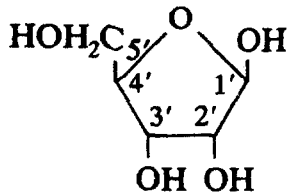
Protéines de plus en plus hydrolysées

Chair molle et gluante, se liquéfiant

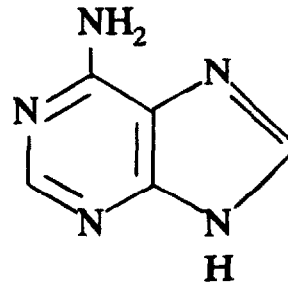
Évolution du muscle de poisson après la mort**Histidine**



Dégradation de l'ATP



Ribose



Adénine

| Concentration en substrat dans le milieu réactionnel [S] en mol.dm ⁻³ | Enzyme libre Vitesse d'apparition du produit Vi en μ mol.min ⁻¹ | Enzyme immobilisée Vitesse d'apparition du produit Vi en μ mol.min ⁻¹ |
|--|---|---|
| 0,25.10 ⁻³ | 0,152 | 0,068 |
| 0,50.10 ⁻³ | 0,238 | 0,120 |
| 1,00.10 ⁻³ | 0,340 | 0,203 |

Étude de la papaïne

Tableau 1 :

Évolution de la flore microbienne de steaks d'espadon conditionné sous air et stockés à 3,5°C.

| durée du stockage (jours) | Flore microbienne (exprimée en % de la flore aérobie mésophile) | | | | | |
|---------------------------|--|---------------------------------|---------------------------------|----------------|--------------|----------------------------------|
| | <i>Pseudomonas spp</i> | <i>Alteromonas putrefaciens</i> | <i>Moraxella/ Acinetobacter</i> | Flavobacterium | Corynéformes | <i>Brochothrix thermosphacta</i> |
| 0 | 26,2 | 0,6 | 13,8 | 53,1 | 5,5 | |
| 2 | 75,2 | | 3,6 | 12,4 | 8,8 | |
| 5 | 100,0 | | | | | |
| 8 | 100,0 | | | | | |
| 11 | 91,6 | 0,8 | | | | 7,6 |

Tableau 2 :

Évolution de la flore totale de la chair de Merlu stocké à 0°C sous glace et à 5°C.

| Stockage sous glace | | Stockage à 5°C | |
|---------------------|----------------------------|----------------|----------------------------|
| Jours | Flore totale (/g de chair) | Jours | Flore totale (/g de chair) |
| 0 | $2,2 \cdot 10^4$ | 0 | $2,1 \cdot 10^4$ |
| 4 | $2,0 \cdot 10^5$ | 1 | $6,0 \cdot 10^4$ |
| 7 | $1,5 \cdot 10^6$ | 3 | $2,9 \cdot 10^5$ |
| 11 | $9,3 \cdot 10^6$ | 6 | $1,2 \cdot 10^7$ |
| 14 | $2,0 \cdot 10^7$ | | |

Composition du milieu TCBS (Thiosulfate-Citrate-Bile-Saccharose)**Pour 1 litre de milieu :**

| | |
|-----------------------|--------|
| Peptones | 10,0 g |
| Extrait de levure | 5,0 g |
| Saccharose | 20,0 g |
| Citrate de sodium | 10,0 g |
| Citrate de Fer (III) | 1,0 g |
| Bile de bœuf | 8,0 g |
| Bleu de bromothymol | 40 mg |
| Bleu de thymol | 40 mg |
| Thiosulfate de sodium | 10,0 g |
| NaCl | 10,0 g |
| Agar | 14,0 g |
| pH 8,6 | |