

**Session 2005**

**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

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 0 à 9  
Assurez-vous qu'il est complet dès qu'il vous est remis.

## Contrôles dans une laiterie

Après avoir procédé à la collecte du lait dans les fermes, les laiteries doivent procéder à un certain nombre de contrôles de qualité avant sa transformation.

### 1 Biochimie (7,5 points)

Le lait est un milieu particulièrement propice à la prolifération microbienne et il est le plus souvent utilisé sous forme pasteurisée. Le contrôle de pasteurisation passe par l'étude de l'inactivation d'une enzyme ubiquitaire, la phosphatase alcaline ou PAL (EC 3.1.3.1).

#### 1.1. Détermination de la masse molaire de la phosphatase alcaline

Pour déterminer la masse molaire de la phosphatase alcaline, une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécylsulfate (SDS) est réalisée. Le SDS est un agent dénaturant des protéines capable de les charger négativement de manière équivalente. Le gel de polyacrylamide permet une séparation selon la masse.

Dans ce type d'électrophorèse, la distance de migration ( $d$ ) d'une protéine dépend uniquement de sa taille et donc de sa masse molaire ( $M$ ), la relation est de type  $y = ax + b$  avec  $y = \ln M$  et  $x = d$ .

Un mélange de protéines de masse molaire connue est déposé sur le gel en même temps que les fractions d'élutions contenant la phosphatase alcaline. Les données et les résultats obtenus sont consignés en annexe 1.

1.1.1 Rappeler la définition d'un agent dénaturant, son effet sur une protéine possédant une structure quaternaire.

1.1.2 En utilisant la droite de régression donnée en annexe 1, calculer la masse molaire obtenue.

La détermination de la masse molaire par chromatographie a donné une valeur de 78,8 kg/mol.

1.1.3. Expliquer ce que l'on peut en déduire pour la structure de la phosphatase alcaline.

1.1.4 En admettant que la masse molaire moyenne d'un acide aminé est de 110 g/mol, calculer le nombre d'acides aminés de la protéine.

#### 1.2. Détermination de l'activité de la PAL sur un lait cru

1.2.1 Indiquer en la justifiant la classe d'enzymes de la phosphatase alcaline.

Pour déterminer son activité, la méthode de référence utilise le protocole proposé en annexe 2.

- 1.2.2 Écrire l'équation catalysée par la PAL.
- 1.2.3 Justifier l'utilisation d'un tampon à pH 10,6, pour le milieu réactionnel.
- 1.2.4 Justifier la phrase « Incuber exactement 30 minutes à 37 °C. »
- 1.2.5 Expliquer pourquoi il faut ensuite porter le milieu à ébullition.
- 1.2.6 Justifier l'addition d'un agent déféquant et la filtration.
- 1.2.7 Utiliser les données proposées en annexe 3 pour déterminer le nombre de  $\mu\text{g}$  de phénol dans le tube essai.  
En déduire le nombre de  $\mu\text{g}$  de phénol libéré par heure et par mL de lait.
- 1.2.8 Sachant que la masse molaire du phénol est de 94,11 g/mol, exprimer le résultat en  $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$ .

## 2 Toxicologie (5 points)

Certaines moisissures produisent des substances préjudiciables à la santé humaine : les mycotoxines. L'aflatoxine B<sub>1</sub> représente, pour les sociétés occidentales, la plus dangereuse d'entre elles. Elle provient d'*Aspergillus flavus* que l'on peut trouver principalement dans les arachides et les céréales. Les bovins étant nourris à partir de tourteaux de graines oléagineuses et de sous-produits céréaliers, la détection des mycotoxines dans le lait est indispensable.

### 2.1 Manifestations de toxicité

L'aflatoxine B<sub>1</sub> n'est pas en fait la molécule toxique ; il s'agit plutôt de l'aflatoxine B<sub>1</sub> époxyde.

- 2.1.1 Indiquer le nom donné à ce phénomène. Préciser où et comment s'est effectuée cette transformation.  
Dans certains pays tropicaux où les arachides sont entreposées à l'extérieur (donc dans une ambiance chaude et humide) avant d'être consommées, on constate une fréquence de cancers du foie beaucoup plus élevée que dans le reste du monde.
- 2.1.2 Définir les processus de mutagenèse et cancérogenèse. Expliquer pourquoi on peut suspecter l'aflatoxine B<sub>1</sub> époxyde.  
Ces résultats épidémiologiques incitent à réaliser une étude de toxicité chronique.
- 2.1.3 Définir la toxicité chronique et justifier ce choix dans le cas présenté.  
L'étude expérimentale a montré un nombre anormalement élevé d'avortements et de malformations congénitales.
- 2.1.4 Donner le nom et la définition du processus ainsi mis en évidence.  
Une autre étude réalisée conjointement chez le chimpanzé et le porc vise à déterminer le NOAEL (DSE) chez ces deux espèces. Les études sont poursuivies sur deux années.
- 2.1.5 Définir le NOAEL ou la DSE.  
Les résultats obtenus sont proposés dans le tableau proposé en annexe 4.
- 2.1.6 Définir la DJT ou DJA et la calculer à partir des résultats proposés en annexe 4.  
Au sein de la Communauté européenne, l'exposition moyenne se situe à 1,6 ng/kg/j.
- 2.1.7 Préciser le risque encouru par :  
un enfant de 10 kg  
un adulte de 60 kg

## 2.2. Étude de la toxicité aiguë

Une étude statistique montre qu'une dose de 7 µg d'aflatoxine B1 par gramme de rat provoque le décès de la moitié des animaux testés.

2.2.1. Définir puis indiquer la valeur de la DL 50 chez le rat.

L'évolution de la concentration plasmatique en aflatoxine B1, chez un rat survivant, est présentée en annexe 5.

2.2.2. Indiquer les phénomènes physiologiques expliquant cette disparition progressive.

2.2.3. En utilisant la droite de régression du graphe de l'annexe 5, déterminer la concentration plasmatique ayant engendré des effets toxiques (en µg/g) et la valeur de la constante d'excrétion  $K_e$ .

## 3. Microbiologie (7,5 points)

En 2004, la plupart des laits destinés à la transformation fromagère avait une charge microbienne inférieure à 10 000 germes totaux par millilitre, principalement des coques et des bacilles Gram + ainsi que des bacilles Gram -.

3.1 Donner le principe de la coloration de Gram et expliquer le résultat obtenu pour une bactérie Gram-.

3.2 Dans les cas de listériose observés, suite à la consommation de fromages au lait cru, *Listeria monocytogenes* (bacille Gram +) est souvent incriminé.

3.2.1 Lors de l'étude de la croissance de cette bactérie à diverses températures, la détermination des temps de génération donne les valeurs suivantes :

- 1,5 jour à 4°C
- 3 heures à 11°C
- 35 minutes à 35°C.

3-2-1-1 Définir le terme « temps de génération » et calculer la vitesse de croissance spécifique de cette bactérie à chacune de ces trois températures.

3-2-1-2 Analyser les résultats ci-dessus et conclure quant au risque induit posé par la présence de cette bactérie dans les aliments.

3-2-2 Le pouvoir pathogène de *Listeria monocytogenes* est dû à sa virulence et à la production de toxines.

Définir le terme toxine et présenter les principales toxines microbiennes impliquées en alimentaire.

3-3 Lorsque le lait est utilisé pour fabriquer les fromages à pâte pressée, il faut :

- inactiver les spores de *Clostridium tyrobutyricum*,
- ne pas inactiver les bactéries lactiques,
- ne pas inhiber la fermentation propionique.

Pour inhiber la croissance des *Clostridium tyrobutyricum* il est possible d'utiliser un antibiotique : la nisine.

3-3-1 Définir le terme « antibiotique ».

3-3-2 Pour être actif sur les bactéries, cet antibiotique doit être utilisé à une concentration finale supérieure ou égale à la CMI.

La concentration mère de la solution de nisine utilisée à cet effet peut être dosée par une méthode microbiologique selon la technique décrite ci-dessous.

Un milieu de Mueller Hinton est ensemencé dans la masse avec une souche test. Après solidification, six puits sont creusés dans celle-ci, à l'intérieur desquels on dépose 40 µL de solution étalon ou de solution-mère à doser. Après 30 minutes à température ambiante, les boîtes sont incubées 18 heures à 37°C et le diamètre d'inhibition est mesuré.

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau en annexe 6.

3-3-2-1 Indiquer la caractéristique que doit présenter la souche-test utilisée.

3-3-2-2 Présenter le principe de ce dosage.

3-3-2-3 Tracer la droite d'étalonnage : diamètre d'inhibition en fonction du logarithme décimal de la concentration en nisine.

Prendre comme échelle :

- sur l'axe des abscisses : 1 cm pour 0,1 unité log

- sur l'axe des ordonnées : 1 cm pour 2 mm.

3-3-2-4 En déduire la concentration de la solution mère disponible.

3-3-3- Au cours de la fabrication de ces fromages à pâte pressée les bactéries lactiques : *Lactococcus thermophilus* et *Lactobacillus helveticus* ne doivent pas être inhibées car elles jouent un rôle majeur dans la technologie de ces fromages. Leur multiplication, minime au cours du travail en cuve, est maximale au cours du pressage.

Ont été suivies au cours du passage sous presse du fromage :

- l'évolution de la température au centre et à la périphérie du fromage,
- la concentration en *Lactobacillus helveticus* et en *Lactococcus thermophilus* au centre et à la périphérie du fromage.

Les résultats sont représentés en annexe 7 (figures 1 et 2) .

3-3.3.1 Commenter l'évolution de la température.

3-3.3.2 Commenter l'évolution de la concentration bactérienne.

3-3.3.3 En déduire l'influence de la température sur les bactéries étudiées. Les qualifier par rapport à ce facteur.

3-3.4 *Lactococcus thermophilus* et *Lactobacillus helveticus* sont des bactéries homolactiques qui fermentent le glucose provenant de l'hydrolyse du lactose du lait.

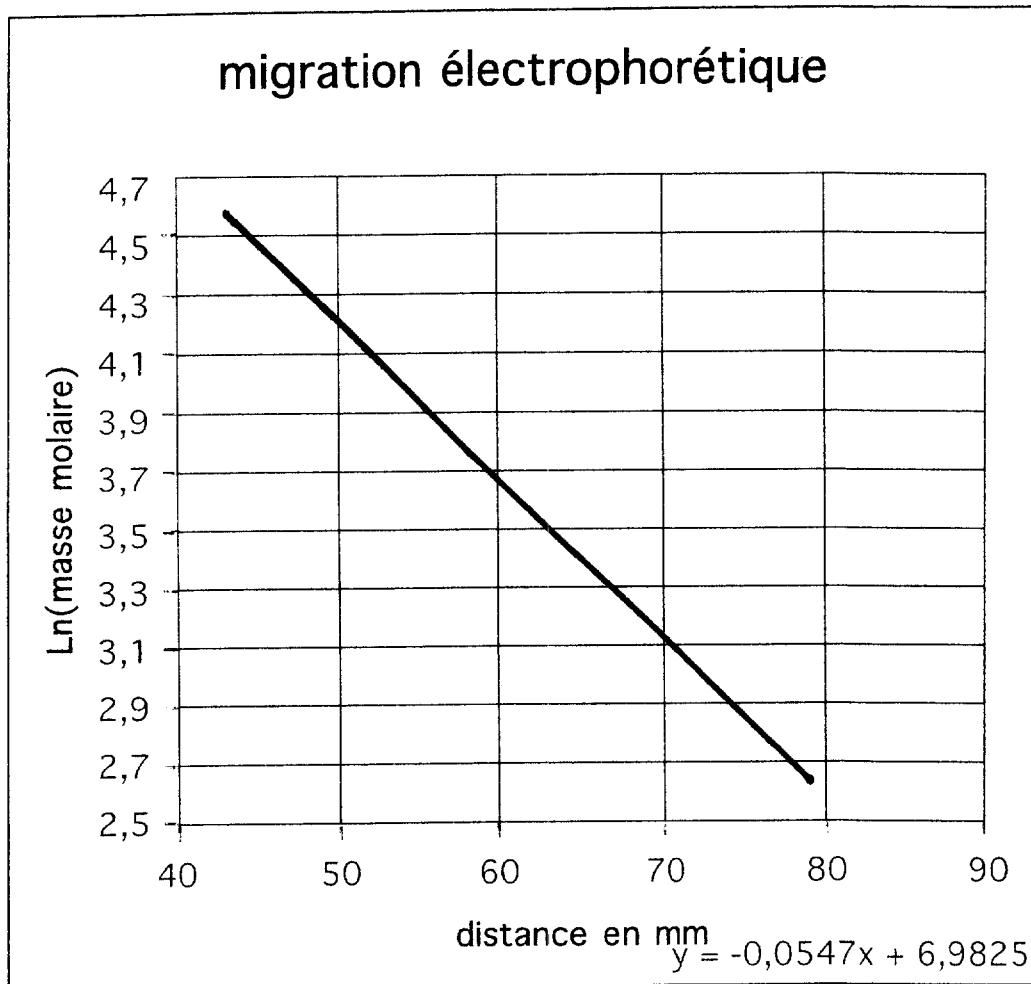
3-3.4.1 L'hydrolyse du lactose implique l'activité d'une enzyme inductible la  $\beta$  galactosidase.

Définir le terme enzyme inductible et décrire un test réalisé au laboratoire pour mettre en évidence la présence de cette enzyme.

3-3.4.2 Définir le terme fermentation et expliquer l'intérêt de la fermentation lactique pour la bactérie.

# Annexe 1

| Protéine             | Masse molaire (Kg/mol) | Distance de migration en mm |
|----------------------|------------------------|-----------------------------|
| Phosphorylase B      | 94                     | 44                          |
| Albumine             | 67                     | 51                          |
| Ovalbumine           | 43                     | 59,5                        |
| Anhydrase carbonique | 30                     | 65,5                        |
| Lactalbumine         | 14                     | 79                          |
| Phosphatase alcaline | ?                      | 60,5                        |



## Annexe 2

### 1 Préparation des essais

|  | Tube essai | Tube témoin |
|--|------------|-------------|
| Lait cru (mL)  | 0,1        | 0,1         |
| <b>Placer le tube T au bain-marie bouillant pendant 2 minutes. Ajouter :</b> |            |             |
| Substrat tamponné pH 10,6 (mL)   | 10,0       | 10,0        |
| <b>Incuber exactement 30 minutes à 37°C puis ébouillanter pendant 2 min</b>  |            |             |
| Agent déféquant (mL)   | 1,0        | 1,0         |
| <b>Agiter énergiquement, laisser reposer puis filtrer.</b>                   |            |             |

### 2 Développement de la coloration

Réaliser directement en cuve pour spectrophotomètre :

|                             | Cuve F <sub>1</sub> | Cuve F <sub>2</sub> | Cuve F <sub>T</sub> |
|-----------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Filtrat (mL)                | 1                   | 1                   | 1                   |
| Solution tampon pH 9,8 (mL) | 2                   | 2                   | 2                   |
| Réactif de Gibbs (µL)       | 50                  | 50                  | 50                  |

Mélanger puis laisser la coloration se développer 15 minutes à température ambiante.

### 3 Établissement de la gamme d'étalonnage et lectures

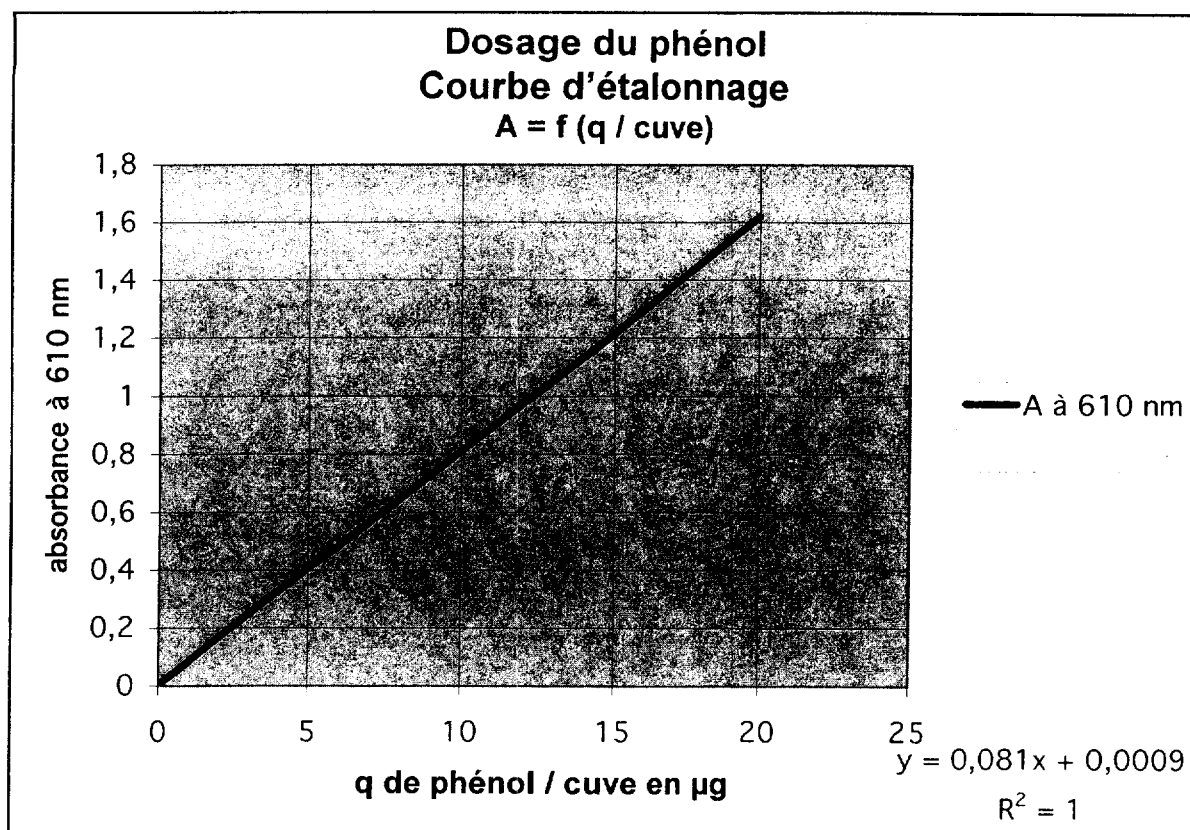
La gamme suivante a été réalisée à partir d'une solution de phénol à 40 mg/L :

| cuves                              | 0   | 1   | 2   | 3   | 4   | 5   |
|------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Solution de phénol (µL)            | 0   | 100 | 200 | 300 | 400 | 500 |
| Eau distillée q.s.p 500 (µL)       | 500 | 400 | 300 | 200 | 100 | 0   |
| Solution de CuSO <sub>4</sub> (µL) | 500 | 500 | 500 | 500 | 500 | 500 |
| Sol tampon pH 9,8 (mL)             | 2   | 2   | 2   | 2   | 2   | 2   |
| Réactif de Gibbs (µL)              | 50  | 50  | 50  | 50  | 50  | 50  |

Après développement de la coloration, la lecture à 610 nm a donné les résultats suivants :

| Cuve n°           | 0 | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | Témoin | Essai |
|-------------------|---|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|
| µg de phénol/cuve | 0 | 4     | 8     | 12    | 16    | 20    |        | ?     |
| A <sub>610</sub>  | 0 | 0,327 | 0,648 | 0,977 | 1,291 | 1,625 | 0,026  | 0,751 |

## Annexe 3

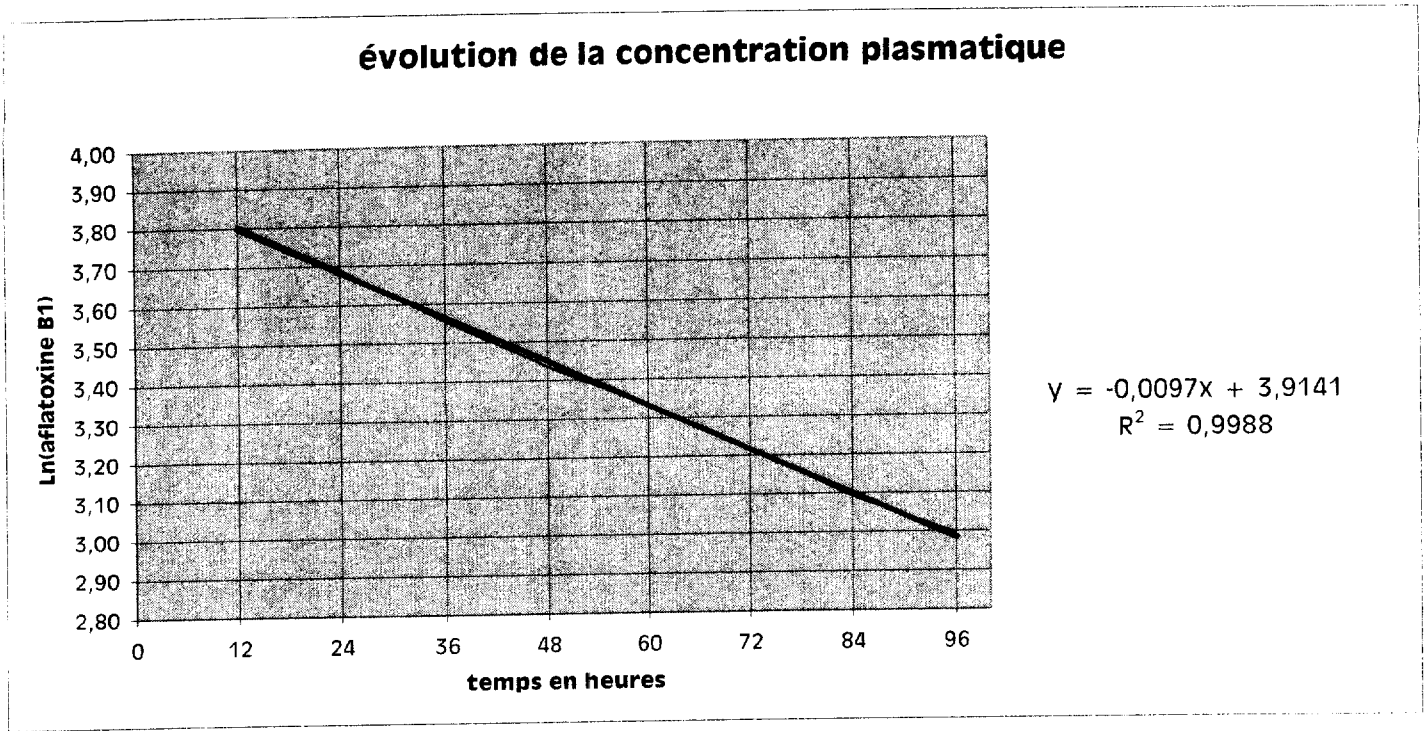


## Annexe 4

| Doses administrées | Hépatomes chez le chimpanzé | Hépatomes chez le porc |
|--------------------|-----------------------------|------------------------|
| 15 ng/kg/j         | 0,00 %                      | 0,00 %                 |
| 30 ng/kg/j         | 0,01 %                      | 0,00 %                 |
| 45 ng/kg/j         | 0,04 %                      | 0,02 %                 |
| 100 ng/kg/j        | 0,7 %                       | 0,1 %                  |
| 150 ng/kg/j        | 3 %                         | 2 %                    |
| 250 ng/kg/j        | 10 %                        | 10 %                   |



## Annexe 5



## Annexe 6 : résultat du dosage microbiologique de la nisine

| Solution introduite            | Solution étalon 1 | Solution étalon 2 | Solution étalon 3 | Solution étalon 4 | Solution à doser diluée au 1/1000 Essai 1 | Solution à doser diluée au 1/1000 Essai 2 |
|--------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|---|---|
| Concentration $\mu\text{g/mL}$ | 10                | 50                | 100               | 125               | ?   | ?   |
| Diamètre d'inhibition (mm)     | 5                 | 19                | 25                | 27                | 13  | 13,2                                      |

# Annexe 7

Figure 1 : Évolution des températures au centre et à la périphérie d'un fromage de Gruyère sous presse

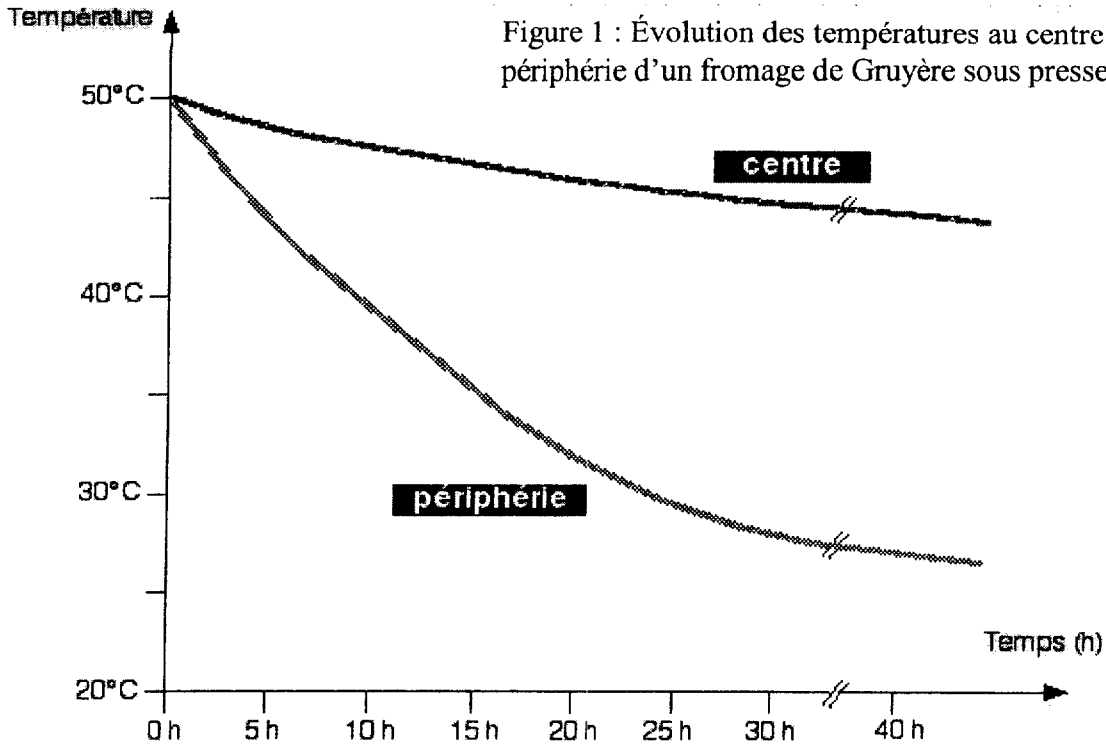


Figure 2 : Évolution de la flore lactique au cours des 48 heures suivant la mise sous presse d'un fromage de Gruyère.

