



SERVICES CULTURE ÉDITIONS  
RESSOURCES POUR  
L'ÉDUCATION NATIONALE

**Ce document a été numérisé par le CRDP de Bordeaux pour la  
Base Nationale des Sujets d'Examens de l'enseignement professionnel**

**Campagne 2009**

Ce fichier numérique ne peut être reproduit, représenté, adapté ou traduit sans autorisation.

# **BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR BIOANALYSES ET CONTRÔLES**

## **Épreuve E3 - Unité U31**

### **Biochimie et technologies d'analyse**

**Calculatrice autorisée**

**Dictionnaire anglais-français autorisé**

**ÉPREUVE E3. UNITÉ U31**  
**Biochimie et technologies d'analyse**

**LES FRUITS ET LÉGUMES FRAIS :**  
**QUELQUES ASPECTS DE LEUR CONSERVATION ET DE LEUR**  
**CONDITIONNEMENT**

La dégradation des fruits et légumes après récolte est essentiellement due à des phénomènes physico-chimiques, biochimiques et à de mauvaises conditions de stockage.

On observe en particulier :

- un flétrissement par déshydratation,
- l'apparition de tâches foncées dues au brunissement enzymatique.

Des études ont été menées pour prévenir ces phénomènes afin d'allonger la période de conservation des fruits et légumes après cueillette et préserver leur aspect.

On se propose d'aborder deux stratégies visant :

- à limiter le phénomène de brunissement enzymatique,
- à améliorer les conditions de stockage par utilisation d'atmosphères contrôlées.

**1 - Prévention du brunissement enzymatique (42 points)**

Les sulfites, longtemps utilisés comme agents anti-brunissement, sont interdits depuis 1996, ce qui a conduit à la recherche de solutions alternatives.

Certaines préparations protéasiques sont reconnues pour avoir une efficacité anti-brunissement. C'est le cas des préparations commerciales de papaine qui proviennent du latex de papaye.

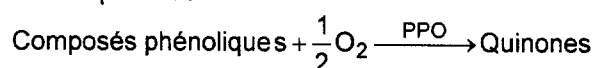
Des recherches ont été menées pour mettre en évidence l'action anti-brunissement d'un extrait de papaine sur les végétaux et pour purifier le ou les agents responsables de cet effet. Leur action inhibitrice sur le brunissement enzymatique et leur non-toxicité pourraient en faire de bons candidats pour remplacer les sulfites.

**1.1 - Purification des polyphénoloxydases (PPO) d'une salade : la scarole**

Le brunissement enzymatique est dû à une oxydation par l'oxygène moléculaire des composés phénoliques présents dans le végétal.

Cette réaction est essentiellement catalysée par les polyphénoloxydases (EC 1.14.18.1) ou PPO présentes dans les végétaux.

Elle conduit à la formation de quinones :



Les quinones se condensent rapidement pour former des polymères bruns ou noirs, de haute masse moléculaire, responsables du brunissement.

Afin d'étudier l'effet anti-brunissement d'un extrait de papaine, on réalise dans un premier temps une extraction-purification des PPO de scarole.

**1.1.1 - Protocole d'extraction-purification.**

Les différentes étapes sont consignées par le **document 1**.

**1.1.1.1** - Expliquer pourquoi les différentes étapes de l'extraction-purification sont menées à 4°C et en milieux tamponnés.

**1.1.1.2** - Calculer le volume d'une solution saturée de sulfate d'ammonium à prélever pour obtenir 30 % de saturation à l'étape 2.

**1.1.1.3** - Expliquer le mécanisme conduisant à la précipitation par le sulfate d'ammonium.

**1.1.1.4** - Justifier l'étape de dialyse.

- 1.1.1.5 - Pourquoi chaque centrifugation est-elle caractérisée par un nombre de g et non par une vitesse de rotation en rpm ?

$$\text{Donnée : } N = \frac{\omega^2 r}{g}$$

N : nombre de g = force centrifuge relative  
 g : accélération de la pesanteur ( $\text{m.s}^{-2}$ )  
 $\omega$  : vitesse angulaire ( $\text{rad.s}^{-1}$ )  
 r : rayon de centrifugation (m)

- 1.1.2 - Suivi de purification des PPO de scarole.

On réalise sur chaque fraction E, S<sub>30</sub>, P<sub>80</sub> et PPOS (**document 1**) :

- une détermination de la concentration en protéines ( $\rho_{\text{Prot}}$ ) ;
- un dosage de la concentration d'activité catalytique ( $C_{\text{cat}}$ ) polyphénoloxidasique selon le protocole du **document 2a**.

Les résultats sont résumés dans le tableau du **document 2b**.

- 1.1.2.1 - Schématiser l'allure de la courbe donnant la concentration en dioxygène en fonction du temps.

- 1.1.2.2 - Définir la vitesse initiale ( $V_i$ ). Comment la détermine-t-on à partir de la courbe précédente ?

- 1.1.2.3 - Pourquoi le mélange réactionnel doit-il être initialement saturé en dioxygène ? Justifier la réponse en utilisant l'équation de Michaelis et Menten.

- 1.1.2.4 - Donner la formule littérale permettant de calculer la concentration d'activité catalytique ( $C_{\text{cat}}$ ) de chaque fraction.

- 1.1.2.5 - Écrire les formules littérales permettant de calculer, pour chaque fraction :

- la masse totale m des protéines (en mg) ;
- l'activité totale AT (en nkat) ;
- l'activité spécifique AS (en nkat.mg<sup>-1</sup>) ;
- le rendement R en pourcentage par rapport à l'extrait brut ;
- le facteur P de purification par rapport à l'extrait brut.

- 1.1.2.6 - Retrouver les valeurs m, AT, AS, R et P de la fraction PPOS du **document 3**.

- 1.1.2.7 - Commenter les valeurs des rendements et les facteurs de la purification finale.

## 1.2 - Effet d'une préparation commerciale de papaine sur le brunissement enzymatique

Des études portant sur une préparation commerciale de papaine (dont un fort effet anti-brunissement avait été remarqué sur des tranches de fruits) ont conduit à formuler les trois hypothèses suivantes :

Hypothèse A : l'effet anti-brunissement est dû à la papaine ( $MM = 21000 \text{ g.mol}^{-1}$ ), principale protéase présente dans l'extrait.

Hypothèse B : l'effet anti-brunissement est dû à la présence de composés piègeurs de quinones.

Hypothèse C : l'effet anti-brunissement est dû à la présence de substances inhibant les polyphénoloxydases.

**Donnée** : la majorité des composés piègeurs de quinone et des substances inhibant les PPO, ont une masse molaire comprise entre 50 et  $1500 \text{ g.mol}^{-1}$ .

Afin de préciser le mode d'action de l'extrait de papaine, une préparation commerciale est solubilisée dans une solution tamponnée à pH 4,4 et soumise à une chromatographie d'exclusion sur Biogel P2, voir **document 4a**.

- 1.2.1 - Après avoir rappelé le principe de la chromatographie d'exclusion, expliquer le but de cette opération sur la préparation de l'extrait de papaine.

- 1.2.2 - Sur les fractions recueillies en sortie de colonne, on réalise :

- un dosage colorimétrique des protéines par la méthode de Bradford ( $\lambda = 595 \text{ nm}$ ) ;
- une mesure de l'effet anti-brunissement.

Les résultats obtenus sont consignés dans le **document 4b**.

Analyser les résultats.

Discuter de la comptabilité des hypothèses A, B et C avec ces résultats.

### 1.3 - Caractérisation de l'effet anti-brunissement

Les fractions à activité anti-brunissement obtenues lors de la chromatographie d'exclusion sont rassemblées et constituent la fraction GF.

Afin de caractériser son effet anti-brunissement, on mesure, en présence de différentes dilutions (de la fraction GF), l'activité PPO dans les conditions suivantes :

- substrat : 4-méthylcatéchol (4MC),
- concentration saturante en dioxygène,
- pH 4.

Le **document 5** représente, reportées en double-inverse (selon LINEWEAVER et BURK), les valeurs de vitesses initiales mesurées en absence (tampon acétate pH 4,4) ou en présence de différentes dilutions de la fraction GF.

**1.3.1** - Commenter le **document 5**. En déduire l'effet des constituants de la fraction GF.

**1.3.2** - À partir des résultats, dégager l'hypothèse (A, B, ou C, question 1.2) expliquant l'origine de l'activité anti-brunissement de l'extrait de papaïne.

**1.3.3** - Expliquer en quoi la méthode de mesure de l'activité PPO (**document 2a**) permet de confirmer avec certitude l'hypothèse retenue.

**1.3.4** - Expliquer le mode d'action des molécules à l'origine de ce type d'effet. Préciser les équations des réactions mises en jeu.

**1.3.5** - Calculer le pourcentage d'inhibition obtenu avec GF pur. Justifier la démarche.

## 2 - Amélioration des conditions de stockage des fruits et légumes frais (18 points)

Les principaux paramètres influençant les conditions de stockage des fruits et légumes frais sont l'humidité relative (HR), la teneur en dioxygène et en dioxyde de carbone et la température de l'atmosphère ambiante. Afin de maîtriser ces paramètres, les fruits et légumes sont stockés sous atmosphère contrôlée.

### 2.1 - Humidité relative

Les fruits et légumes sont entreposés dans des conditions d'humidité relative (HR) allant de 90 à 100 %.

L'activité de l'eau ( $A_w$ ) de ces denrées est en général comprise entre 0,96 et 0,99.

**2.1.1** - Définir l'activité de l'eau ( $A_w$ ).

**2.1.2** - Expliquer pourquoi une HR de 90 à 100 % préserve la qualité des fruits et légumes frais lors de leur stockage.

### 2.2 - Teneur en dioxyde de carbone et température

Une augmentation de la concentration en  $\text{CO}_2$  et un abaissement de la température permettent une meilleure conservation des fruits et légumes en diminuant leur intensité respiratoire.

L'intensité respiratoire correspond à la quantité de dioxygène consommé par unité de temps et par unité de masse végétale.

L'augmentation de la concentration en  $\text{CO}_2$  et la baisse de la température de l'atmosphère de stockage des végétaux provoquent une diminution de l'intensité respiratoire par ralentissement de l'activité de la succinate déshydrogénase.

**2.2.1** - Écrire l'équation de la réaction catalysée par cette enzyme (noms des substrat, produit et coenzyme exigés ; formules des substrat et produit exigées).  
Préciser sa localisation cellulaire.

**Donnée** : Acide succinique =  $\text{HOOC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$ .

**2.2.2** - Cette réaction intervient dans la chaîne respiratoire ou chaîne de transporteurs d'électrons.

**2.2.2.1** - Indiquer le nom des donneurs d'électrons de la chaîne respiratoire.

**2.2.2.2** - Compléter le **document 6** (à rendre avec la copie) en indiquant le trajet des électrons.

**2.2.3** - La succinate déshydrogénase est impliquée dans une autre voie métabolique énergétique.

Citer cette voie métabolique.

Expliquer brièvement son importance fondamentale.

### 2.3 - Teneur en dioxygène

Une diminution de la concentration en dioxygène permet de renforcer les effets liés à l'augmentation du taux de  $\text{CO}_2$ . Il faut cependant éviter des niveaux d' $\text{O}_2$  trop faibles sous peine de provoquer un métabolisme anaérobie conduisant à la production d'éthanol et d'acétaldéhyde.

Écrire la séquence des réactions permettant de transformer le pyruvate en éthanol (noms et formules des substrats et produits, noms des enzymes et coenzymes exigés).

**DOCUMENT 1 :****PROTOCOLE D'EXTRACTION-PURIFICATION DES PPO DE SCAROLE**

Toutes les étapes de l'extraction-purification sont menées à 4°C.

**Étape 1 :**

- 10 g de cœurs de scarole lyophilisés sont broyés, homogénéisés, pendant 1 minute dans 200 mL d'une solution d'extraction tamponnée à pH 7.
- Après centrifugation 40 minutes à 30 000 g, le surnageant est filtré. Les 170 mL de filtrat obtenus constituent l'extrait brut E.

**Étape 2 :**

- Une première précipitation à 30 % de saturation de sulfate d'ammonium est menée pendant 2 heures sur la totalité de l'extrait brut. Le milieu est ensuite centrifugé 30 minutes à 13 000 g et les 175 mL de surnageant obtenu constituent la fraction  $S_{30}$ .
- La fraction  $S_{30}$  subit une précipitation à 80 % de saturation de sulfate d'ammonium pendant 12 heures. Après centrifugation 30 minutes à 20 000 g, le précipité est solubilisé dans un tampon pH 6. On obtient 7 mL d'une fraction notée  $P_{80}$ .

**Étape 3 :**

On réalise une dialyse de la totalité de  $P_{80}$  contre 1 litre de solution tampon pH 6 pendant 12 heures. Les 10 mL de dialysat obtenus constituent l'extrait partiellement purifié de PPO de scarole, noté PPOS.

**DOCUMENT 2 :****SUIVI DE LA PURIFICATION DES PPO DE SCAROLE****2a Protocole :**

- À 2,8 mL d'une solution de substrat (4-méthylcatéchol ou 4MC) à 20 mmol.L<sup>-1</sup>, préparée en milieu tamponné, thermostatée à 30°C et au préalable saturée en O<sub>2</sub> par barbotage d'air, on ajoute 0,2 mL de fraction à étudier.
- On réalise alors une mesure de la concentration en dioxygène dans le mélange réactionnel au cours du temps.

**2b Résultats :**

Fraction	$\rho_{\text{Prot}}$ (mg.mL <sup>-1</sup> )	Ccat (nkat.mL <sup>-1</sup> )
E	1,28	18,4
$S_{30}$	0,81	15,9
$P_{80}$	10,3	221
PPOS	6,47	145

**C.R.D.P.**

75, cours Alsace et Lorraine  
33075 BORDEAUX CEDEX  
Tél. : 05 56 01 56 70

**DOCUMENT 3 :**  
**SUIVI DE LA PURIFICATION DES PPO DE SCAROLE**

Fraction	Volume total (mL)	m (mg)	AT (nkat)	AS (nkat.mg <sup>-1</sup> )	R %	P
E	170	217,6	3128	14,4	100	1
S <sub>30</sub>	175	141,8	2783	19,6	84	1,36
P <sub>80</sub>	7	72,1	1547	21,5	49,5	1,49
PPOS	10	64,7	1450	22,4	46,4	1,56

Fraction S<sub>30</sub>  
choix de la fraction  
calculer 84.  
avec succès.

## DOCUMENT 4 : CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION-DIFFUSION

### Document 4a : Conditions de réalisation.

La chromatographie s'effectue à 20°C à l'aide d'une colonne de type K 26/40 contenant 80 mL de Biogel P2 équilibré avec une solution de tampon acétate (40 mmol.L<sup>-1</sup>) à pH 4,4.

Le domaine de fractionnement du gel est compris entre 100 et 1 800 g.mol<sup>-1</sup>.

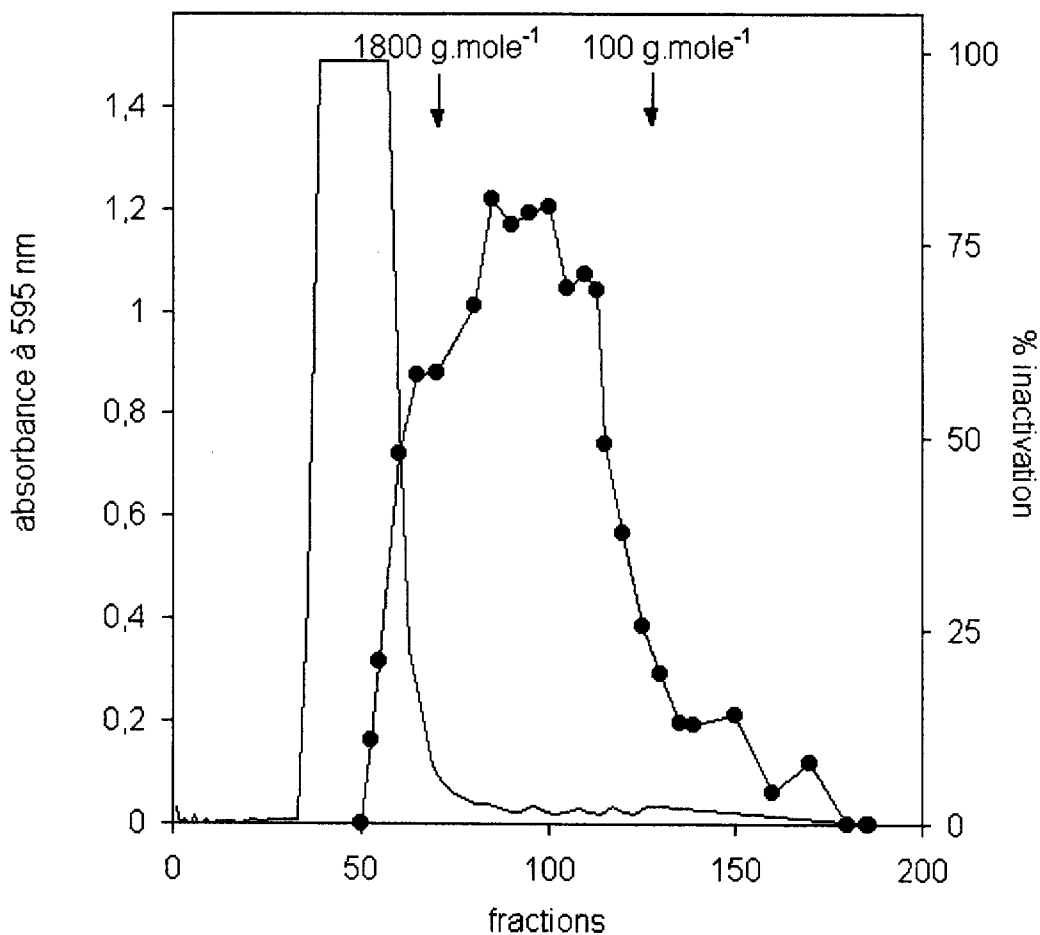
6 mL d'extrait de papaine sont déposés.

Le flux est descendant, avec un débit fixé à 20 mL.h<sup>-1</sup> et suivie par mesure de l'absorbance à 280 nm de l'éluat.

Ce dernier est recueilli par fractions de 3 mL sur lesquelles le dosage des protéines et de l'effet anti-brunissement sont effectués.

Les fractions possédant un effet anti-brunissement sont regroupées et nommées GF.

### Document 4b : Chromatographie d'exclusion de l'extrait brut de papaine.



(-) : Absorbance à 595 nm

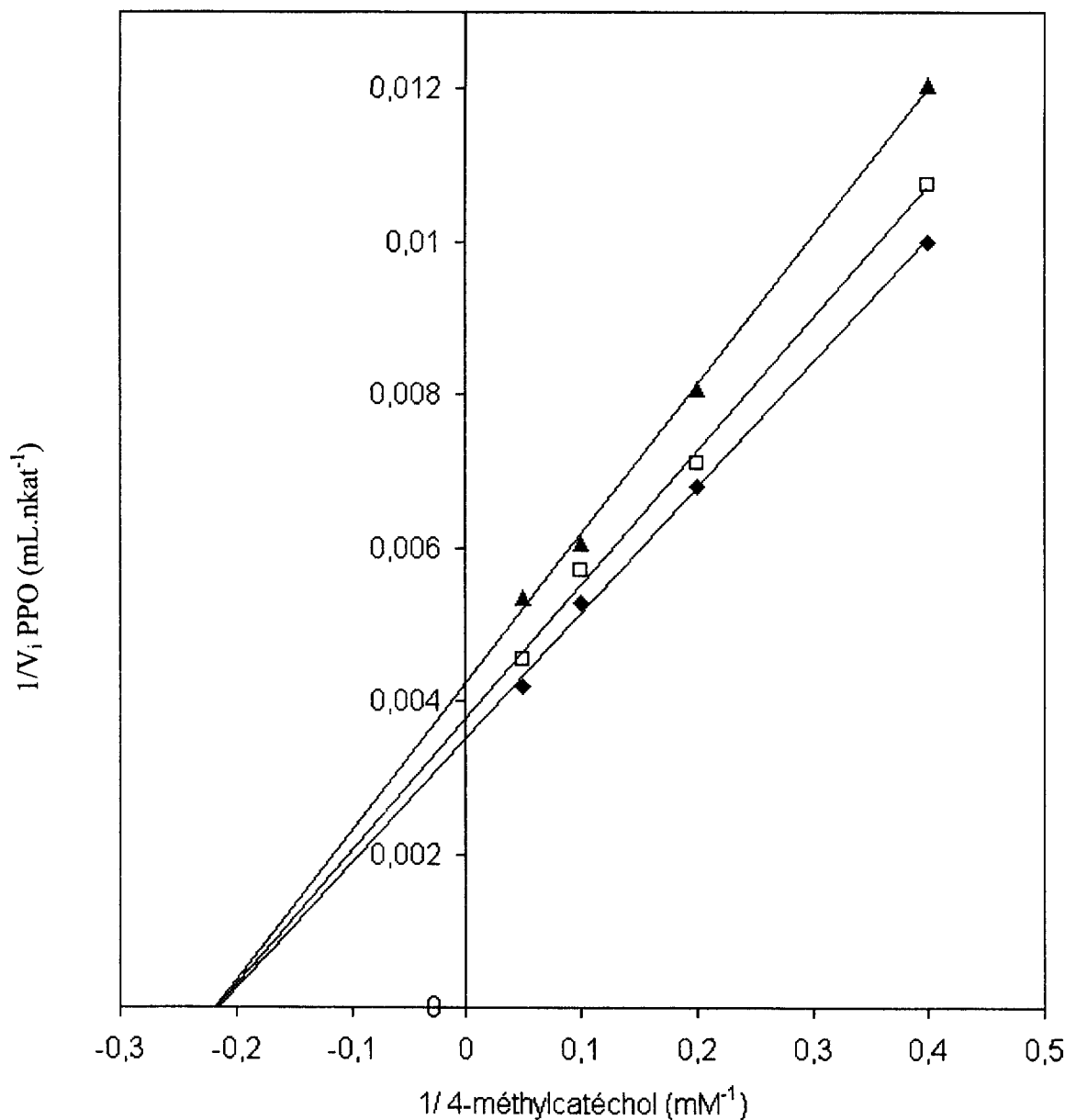
(●) : Effet anti-brunissement exprimé en % d'inactivation



**DOCUMENT 5 :****EFFET INHIBITEUR APPARENT DE LA FRACTION GF SUR L'OXYDATION DU 4 MC PAR LA PPO DE SCAROLE PPOS À pH 4,4**

Représentation selon LINEWEAVER et BURK :  $\frac{1}{V_i} = a \times \frac{1}{[4MC]} + b$

.  $V_i$  PPO en nkat.mL<sup>-1</sup> et [4MC] en mmol.L<sup>-1</sup> (mM)



(▲) : Fraction GF pure ;  $\frac{1}{V_i} = 0,0193 \times \frac{1}{[4MC]} + 0,00421$

(◻) : Fraction GF diluée au ½ ;  $\frac{1}{V_i} = 0,0173 \times \frac{1}{[4MC]} + 0,00376$

(◆) : Tampon acétate pH 4,4 ;  $\frac{1}{V_i} = 0,0160 \times \frac{1}{[4MC]} + 0,00349$

DANS CE CADRE

Académie : \_\_\_\_\_ Session : \_\_\_\_\_

Examen ou Concours \_\_\_\_\_ Série\* : \_\_\_\_\_

Spécialité/option\* : \_\_\_\_\_ Repère de l'épreuve : \_\_\_\_\_

Épreuve/sous-épreuve : \_\_\_\_\_

NOM : \_\_\_\_\_

(en majuscules, suivi s'il y a lieu, du nom d'épouse)

Prénoms : \_\_\_\_\_

Né(e) le : \_\_\_\_\_ N° du candidat

(le numéro est celui qui figure sur la convocation ou la liste d'appel)

\* Uniquement s'il s'agit d'un examen.

NE RIEN ÉCRIRE

Repère : BAE3BT

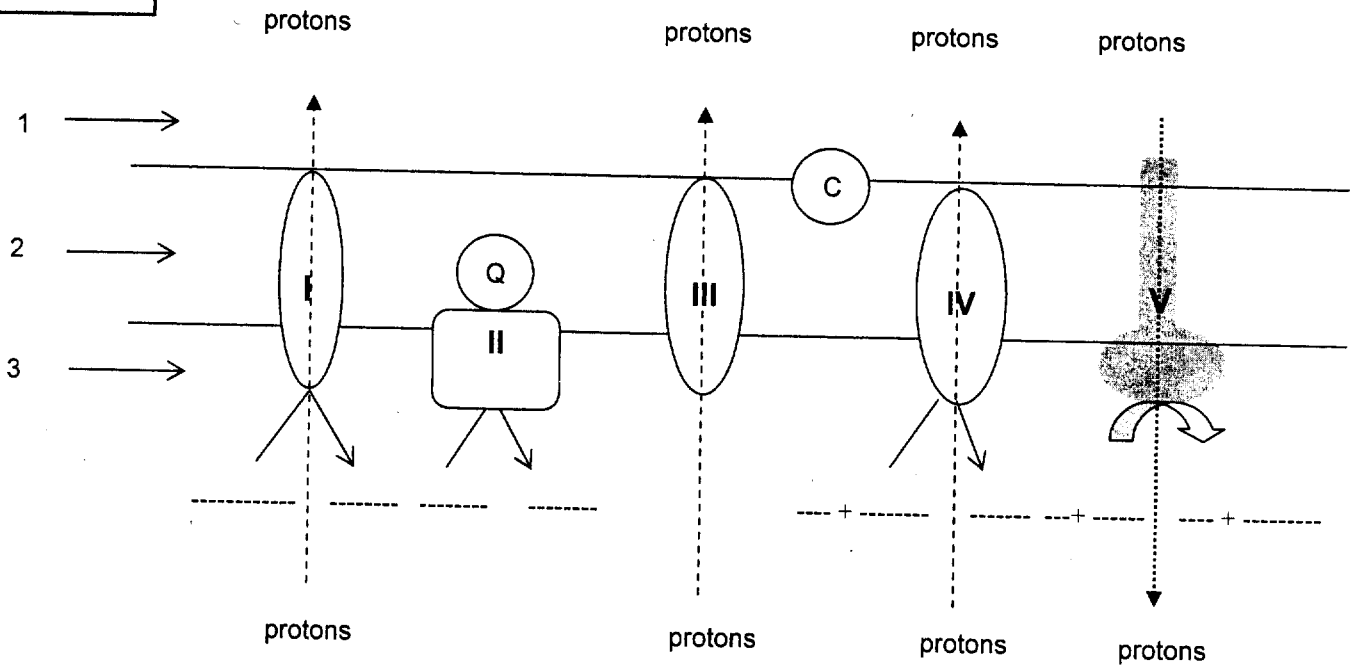
SESSION 2009

Durée : 3 H

Page : 8/8

Coefficient : 3

**DOCUMENT 6 :**  
**(à compléter et à rendre avec la copie)**  
**LA CHAÎNE RESPIRATOIRE**



Légendes :

Q : coenzyme Q

C : cytochrome c

I, II, III, IV et V : complexes I, II, III, IV et V

- 1 : .....
- 2 : .....
- 3 : .....