



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

**Campagne 2010**

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 AGROCARBURANTS**

Les agrocarburants sont produits à partir de matériaux organiques non-fossiles. Il existe deux filières principales :

- la filière alcool,
- la filière huile et dérivés (biodiesel).

D'un point de vue écologique et social, ces filières sont controversées. Malgré tout, les recherches restent actives, car elles donnent des perspectives d'utiliser des réserves agricoles non alimentaires.

**1 - La filière alcool (36,5 points)**

L'alcool est produit à partir d'amidon et de cellulose.

**1.1 - L'amidon et la cellulose sont des homoglycanes de glucose, l'un de réserve et l'autre de structure (7,5 points).**

L'hydrolyse enzymatique de l'amidon est catalysée par des amylases : les  $\alpha$ -amylases catalysent l'hydrolyse des liaisons osidiques en milieu de chaîne ; les  $\beta$ -amylases catalysent l'hydrolyse de l'amidon en maltose à partir de son extrémité non réductrice. Ces amylases sont sans effet sur la cellulose.

**1.1.1 - Expliquer la distinction entre molécule de réserve et molécule de structure.**

**1.1.2 - Quelles différences structurales existe-t-il entre l'amidon et la cellulose. Justifier la réponse par l'écriture chimique de l'enchaînement d'au moins trois résidus glucose. Expliquer l'absence d'effet des amylases sur la cellulose (représentation de Haworth exigée).**

**1.1.3 - Sur la formule de l'amidon, localiser les extrémités non réductrice et réductrice.**

**1.1.4 - Citer la classe et le numéro d'ordre des amylases dans la classification internationale.**

**1.2 - Le glucose nécessaire à la production d'éthanol est obtenu à partir de l'hydrolyse enzymatique de la cellulose (10 points).**

Trois souches de champignons filamenteux sont cultivées et testées pour leur activité cellulasique (**document 1**).

**1.2.1 - Expliquer le rôle du témoin activité (**document 1**).**

**1.2.2 - Expliquer la réalisation du blanc réactif et indiquer son rôle.**

**1.2.3 - Rappeler les conditions opératoires généralement utilisées pour mesurer une activité enzymatique.**

**1.2.4 - La formule de la concentration d'activité catalytique cellulasique est la suivante :**

$$C_{\text{cat}} (\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}) = 0,215 \cdot A.$$

**1.2.4.1 - Écrire la formule littérale exprimant la quantité de glucose apparu après mesure de l'activité cellulasique.**

**1.2.4.2 - Justifier le facteur 0,215 de la formule de calcul de la concentration d'activité catalytique.**

**Données :** Une unité cellulase correspond à la quantité de cellulase faisant apparaître 1  $\mu\text{mole}$  de glucose par minute.

$$M_{\text{glucose}} = 180 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$

**1.2.5 - En déduire la formule littérale donnant l'activité totale de chaque milieu ( $A_T$  en U).**

**1.2.6 - Exprimer littéralement cette activité par g de biomasse ( $A_{\text{biomasse}}$  en  $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$ ). Réaliser l'application numérique pour les 3 souches étudiées. Commenter les résultats pour l'ensemble des souches.**

**1.3 - Le glucose, produit d'hydrolyse de l'amidon ou de la cellulose subit, sous l'action de levures du genre *Saccharomyces* une oxydation en acide pyruvique (8 points).**

L'acide pyruvique subit ensuite une décarboxylation puis une transformation en éthanol.

**1.3.1 - Nommer la voie métabolique conduisant à la transformation du glucose en acide pyruvique.**

**1.3.2 - Écrire la séquence réactionnelle conduisant à la transformation d'acide pyruvique en éthanol (nom des enzymes et formules chimiques exigés).**

1.3.3 - Établir le bilan moléculaire de la transformation d'une molécule de glucose en éthanol.



1.3.4 - Pour conduire à la formation d'éthanol, il est nécessaire que les levures soient cultivées en parfaite anaérobiose.

Justifier cette précaution, en précisant le devenir du glucose si cette condition n'est pas respectée (noms des voies métaboliques et localisation cellulaire exigés).

1.4 - L'éthanol produit par les levures peut être dosé par voie enzymatique en point final (**document 2**) (6 points).

1.4.1 - Présenter la composition qualitative du milieu à mettre en présence de l'échantillon pour réaliser le dosage de l'éthanol par cette méthode.

1.4.2 - Tracer l'évolution de l'absorbance en fonction du temps et justifier le terme « point final ».

Sur le graphe précédent, tracer l'évolution de l'absorbance obtenue avec deux fois moins d'éthanol au départ. Justifier.

1.4.3 - La température d'incubation a-t-elle une influence sur la méthode de dosage en point final.

1.5 - Étude cinétique de l'alcool déshydrogénase (ADH) (5 points).

1.5.1 - À partir d'une certaine concentration en éthanol, la cinétique de l'ADH peut être confondue avec une cinétique michaélienne.

Démontrer que dans ce cas la courbe  $v_i^{-1} = f([S]^{-1})$  est une droite.

1.5.2 - Des résultats expérimentaux (obtenus dans les conditions précédentes) sont présentés ci-dessous.

Présenter dans un tableau les résultats numériques  $V_i^{-1}$  et  $[S]^{-1}$ .

Calculer les paramètres de la droite de régression et en déduire les valeurs des paramètres cinétiques de l'éthanol déshydrogénase dans les conditions opératoires.

$[NAD^+] \mu\text{mol.L}^{-1}$	10	20	40	100
$V_i \text{ en } \mu\text{mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$	14,3	22,2	30,8	40

## 2 - La filière huile (23,5 points)

2.1 - L'huile végétale brute peut être utilisée directement dans certains moteurs ou transformée en biodiesel (aussi appelé diester). L'huile de graines de colza est souvent utilisée pour cette fabrication (7 points).

2.1.1 - Les huiles sont essentiellement constituées de triglycérides (99 %) et d'un peu d'insaponifiables.

2.1.1.1 - Donner la formule générale d'un triglycéride.

2.1.1.2 - Définir le terme insaponifiable.

Citer un exemple de lipide insaponifiable.

2.1.2 - La richesse des graines en huile est un facteur déterminant pour la sélection variétale des plants de colza. Cette richesse est appréciée par RMN ou par la méthode de Soxhlet (**document 3**).

2.1.2.1 - À partir de l'analyse du **document 3** dégager le principe d'extraction des lipides des graines de colza.

2.1.2.2 - Une balance infrarouge (balance munie d'un système de chauffage) permet de déterminer rapidement la teneur en matières sèches du broyat de graines.

Calculer la teneur en matière sèche des graines.

**Données** : Résultat de la balance infrarouge

Masse de broyat de graines = 2,154 g

Masse du broyat de graines après séchage = 1,852 g

2.1.2.3 - Déterminer la teneur en huile des graines en % par rapport à la matière sèche.

**2.2** - L'acide érucique (C22 : 1  $\Delta^{6,13}$ ) est un acide gras que l'on trouve dans certaines variétés de colza, il est responsable de pathologies cardiaques chez le rat.

Les variétés de colza riches en acide érucique sont destinées à l'industrie alors que les variétés pauvres (canola) donnent des huiles alimentaires.

L'union européenne a fixé une teneur maximale autorisée d'acide érucique dans les huiles destinées à la consommation humaine (moins de 2 % des acides gras totaux). La proportion en acide érucique dans l'huile extraite des graines de colza détermine son orientation vers la filière industrielle ou alimentaire (16,5 points).

**2.2.1** - Présenter la formule semi-développée de l'acide érucique. Justifier la réponse en expliquant la notation C22 : 1  $\Delta^{6,13}$ .

**2.2.2** - Les nutritionnistes classent les acides gras insaturés en série « oméga ». Suivant cette classification quelle est l'écriture de l'acide érucique ?

**2.2.3** - La séparation des acides gras et leur dosage sont effectués par chromatographie en phase gazeuse (CPG) (**documents 4 et 5**).  
Compléter le schéma de principe d'un chromatographe en phase gazeuse (**document 4**).

**2.2.4** - Expliquer succinctement le principe de fractionnement par CPG.

**2.2.5** - Les triglycérides subissent une méthyl-trans-estérification par le méthanol. On obtient alors des acides gras méthylés (EMAG) et du glycérol.

Écrire la réaction de trans-estérification d'un triglycéride par le méthanol.

Justifier la méthyl-trans-estérification en préalable à la CPG.

**2.2.6** - L'élution s'effectue à l'aide d'un gradient de température. Justifier son intérêt.

**2.2.7** - Le premier pic du chromatogramme ne correspond à aucun EMAG. À quoi correspond-il ?

**2.2.8** - Sachant que les EMAG sont élués dans l'ordre croissant de leur nombre de carbone et à nombre égal de carbone, dans l'ordre croissant du nombre d'insaturation, identifier les pics du chromatogramme.

Quelle grandeur permet l'identification ? Définir cette grandeur.

**2.2.9** - L'analyse d'une huile de colza dans les mêmes conditions chromatographiques donne les résultats suivants :

$t_R$ en min	8,69	11,15	11,47	12,09	13,00	14,21	14,32	16,11
Hauteur du pic en (mV)	15,75	10,3	312,0	114,3	52,0	10,0	13,5	8,9

Calculer le pourcentage en acide érucique par rapport aux acides gras totaux.

**Donnée** : Pour le calcul, on confondra la surface des pics avec leur hauteur.

**2.2.10** - Conclure quant à la qualité de l'huile de colza analysée.

## DOCUMENT 1 : MESURE DE L'ACTIVITÉ CELLULASIQUE

Trois souches de champignons filamenteux sont cultivées dans 100 mL de milieu liquide afin d'isoler les souches les plus productrices de cellulases extra-cellulaires.

Après 72 heures à 25°C, le milieu de culture est filtré. L'activité cellulasique est mesurée sur 0,5 mL de filtrat. La biomasse recueillie sur le filtre est séchée et pesée.

Le résultat de l'activité cellulasique est exprimé en  $\mu\text{mol}$  de glucose apparu par min et par g de biomasse.

### Mode opératoire

#### Mesure d'activité sur les filtrats de culture

- 0,5 mL de filtrat
- 0,5 mL de carboxyméthyl cellulose à 1 % dans du tampon acétate à 50  $\text{mmol.L}^{-1}$ , pH 6

Incuber 1 heure à 50°C avant de procéder à la colorimétrie au 3,5 DNS.

#### Témoin activité

- 0,5 mL de milieu de culture non ensemencé
- 0,5 mL de carboxyméthyl cellulose à 1 % dans du tampon acétate à 50  $\text{mmol.L}^{-1}$ , pH 6

Incuber 1 heure à 50°C avant de procéder à la colorimétrie au 3,5 DNS.

#### Étalon glucose

- 0,5 mL de solution de glucose à 1  $\text{g.L}^{-1}$
- 0,5 mL d'eau distillée

Réaliser la colorimétrie au 3,5 DNS.

#### Méthode au 3,5 DNS

Ajouter 1,5 mL de 3,5 DNS.

Porter 5 minutes au bain-marie bouillant exactement 5 minutes. Refroidir immédiatement.

Ajouter 7,5 mL d'eau distillée avant de mesurer les absorbances à 530 nm contre un **blanc réactif**.

### Résultats

#### Étalon de glucose

Absorbance de l'étalon glucose mesurée à 530 nm contre le blanc réactif  $A_{Et} = 0,430$ .

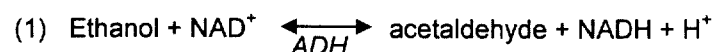
#### Mesure d'activité

	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Trichoderma harzadium</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	Témoin activité
<b>Biomasse en g</b>	10,54	15,63	6,34	0,00
<b>A : Absorbance lue à 530 nm contre le blanc réactif</b>	0,210	0,462	0,301	0,001
<b>Activité cellulasique (<math>\text{U.g}^{-1}</math>)</b>	0,43	0,64	1,02	-----

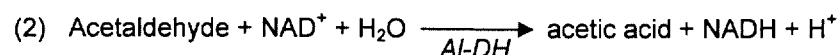
## DOCUMENT 2

### PRINCIPE DU DOSAGE ENZYMATIQUE DE L'ETHANOL

Ethanol is oxidized to acetaldehyde by nicotinamide-adenine dinucleotide (NAD) in the presence of the enzyme alcohol dehydrogenase (ADH) (1).



The equilibrium of this reaction lies on the side of ethanol and NAD. It can be completely displaced to the right side at alkaline conditions and by trapping of acetaldehyde formed. Acetaldehyde is quantitatively oxidized to acetic acid in the presence of aldehyde dehydrogenase (Al-DH) (2)



NADH is determined by means of its light absorbance at 340nm.

## DOCUMENT 3 : PRINCIPE DE LA MÉTHODE DE SOXHLET

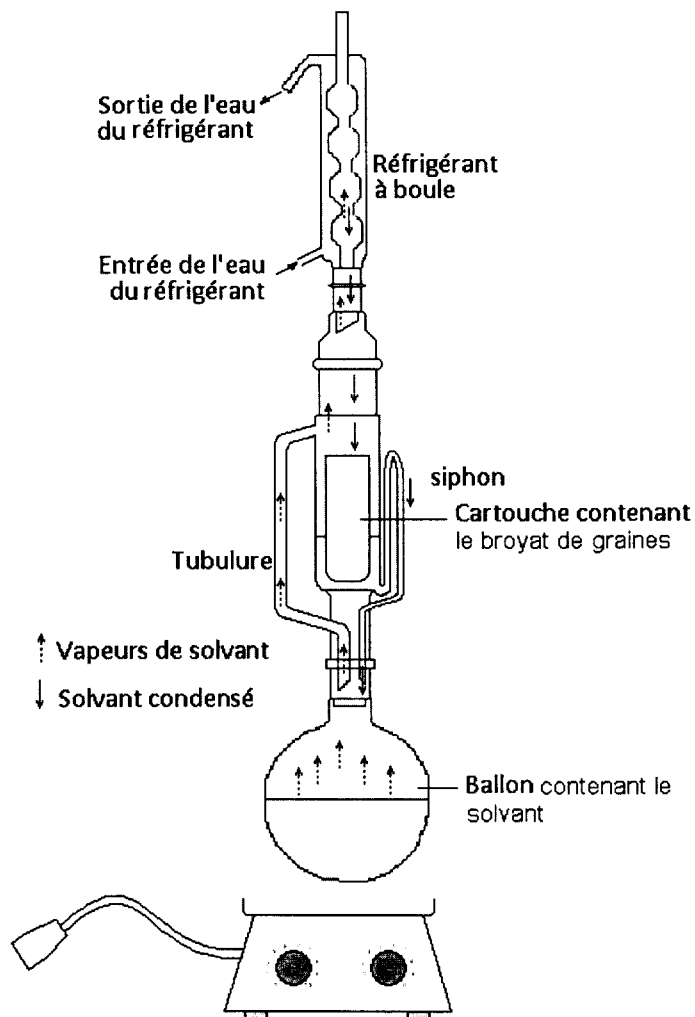
Les graines broyées sont introduites dans l'appareil de Soxhlet (schéma suivant). L'extraction est réalisée par de nombreux passages d'isohexane tiède sur le broyat (environ 8 heures de fonctionnement). En fin d'extraction, l'isohexane est récupéré par évaporation et le ballon contenant l'huile extraite, est pesé.

La quantité d'huile dans les graines est exprimée en g par rapport à 100g de matière sèche de broyat de graines.

### Résultat de l'extraction par la méthode de Soxhlet

- Masse de broyat de graines = 10 g
- Masse du ballon vide = 153,740 g
- Masse du ballon après extraction et évaporation de l'iso-hexane = 155,290 g

### Schéma de fonctionnement de l'appareil de Soxhlet



**Appareil de Soxhlet**

DANS CE CADRE

NE RIEN ÉCRIRE

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 : \_\_\_\_\_ N° du candidat   
Né(e) le : \_\_\_\_\_ (le numéro est celui qui figure sur la convocation ou la liste d'appel)

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

Repère : BAE3BT

SESSION 2010

Durée : 3 H

Page : 6/7

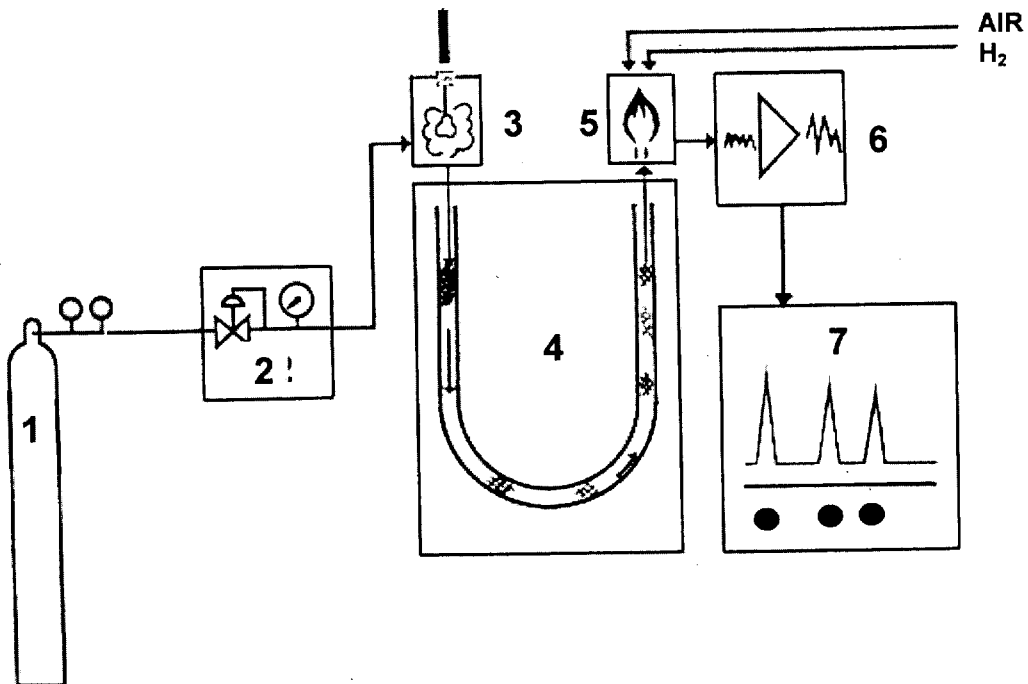
Coefficient : 3

**DOCUMENT 4 :**

**SCHÉMA DE PRINCIPE D'UN CHROMATOGRAPHE EN PHASE GAZEUSE**

**À COMPLÉTER ET À RENDRE AVEC LA COPIE**

- 1 :
- 2 :
- 3 :
- 4 :
- 5 :
- 6 :
- 7 :





**DOCUMENT 5 :****CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE DES ACIDES CONSTITUTIFS  
DES TRIGLYCÉRIDES DE L'HUILE****Chromatographie en phase gazeuse des acides gras constitutifs des triglycérides de l'huile.****Préparation avant injection**

Les acides gras des triglycérides (en solution dans l'heptane), en présence de méthanol, subissent une méthyl-trans-estérification. La réaction est réalisée à chaud en milieu alcalin et en présence de catalyseur ( $\text{BCl}_3$ ). Les esters méthyliques d'acides gras (EMAG) sont extraits dans l'hexane.

Cet extrait est analysé par CPG.

**Conditions chromatographiques**

- Colonne capillaire en silice fondue 50m x 0,25 mm recouverte de cyanopropylsilicone sur 0,2  $\mu\text{m}$
- Volume d'injection : 1  $\mu\text{L}$
- Température de l'injecteur : 250°C
- Température du four : gradient 165°C pendant 5 min puis augmentation de 5°C.min<sup>-1</sup> jusqu'à 200°C
- Température du détecteur : 260°C
- Détecteur ; ionisation de flamme
- Gaz porteur : Hélium à 1,2 mL.min<sup>-1</sup>

**Chromatogramme réalisé avec un mélange EMAG étalons dans l'hexane**

Composition du mélange : C16 : 0 ; C18 : 0 ; C18 : 1 ; C18 : 2 ; C18 : 3 ; C20 : 0 ; C20 : 1 ; C22 : 1.

