



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 2012

**BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR
BIOANALYSES ET CONTRÔLES**

**ÉPREUVE E3 – UNITÉ U31
BIOCHIMIE ET TECHNOLOGIES D'ANALYSE**

SESSION 2012

—————
Durée : 3 heures
Coefficient : 3
—————

Matériels autorisés :

- Toutes les calculatrices de poche y compris les calculatrices programmables, alphanumériques ou à écran graphique à condition que leur fonctionnement soit autonome et qu'il ne soit pas fait usage d'imprimante (Cirulaire n°99-186, 16/11/1999)
- Dictionnaire anglais-français

**Dès que le sujet vous est remis, assurez-vous qu'il est complet.
Le sujet se compose de 10 pages, numérotées de 1/10 à 10/10.**

BTS BIOANALYSES ET CONTRÔLES		Session 2012
Nom de l'épreuve : Biochimie et technologies d'analyse	Code : BAE3BT	Page : 1/10

LA β -FRUCTOFURANOSIDASE :

APPLICATION À LA PRODUCTION DE PRÉBIOTIQUES

Les fructo-oligosaccharides (FOS), exemples de prébiotiques, sont des glucides trouvés dans la nature (banane, oignon, tomate) qui, lorsqu'ils sont consommés, contribuent à apporter de nombreux bénéfices pour la santé (action sur la flore intestinale). On cherche actuellement à les produire par voie enzymatique, par exemple à l'aide de la β -fructofuranosidase (FFase).

Dans ce but, on se propose de purifier et de caractériser la FFase, en vue d'une production industrielle de FOS.

1 - Activités enzymatiques de la β -fructofuranosidase (FFase) (27,5 points)

Selon la nomenclature internationale, la β -fructofuranosidase (FFase) est appelée EC 3.2.1.26.

Elle est plus communément connue sous les noms d'invertase et de saccharase.

Elle est répertoriée dans les cultures de moisissures (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Aureobasidium*) et de levures (*Saccharomyces*, *Rhodotorulla*).

La FFase présente deux types d'activité :

- une activité fructofuranosidase (FA) qui catalyse l'hydrolyse des β -D-fructofuranoses situés à l'extrémité non réductrice de β -D-fructofuranosides (le plus simple de ces substrats est le saccharose),
- une activité fructosyl-transférase (FTA), encore appelée transfructosylase.

1.1 - L'activité fructofuranosidase (FA) de la FFase (7 points)

1.1.1 - À quelle classe enzymatique appartient la FFase ?

1.1.2 - Écrire la réaction enzymatique catalysée par la FFase lorsque le substrat est du saccharose (formules exigées en représentation de Haworth).

1.1.3 - Pourquoi est-elle appelée également invertase ?

Données :

$$[\alpha_D]^{20^\circ} \text{ saccharose} = + 66,5^\circ \cdot \text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{dm}^{-1}.$$
$$[\alpha_D]^{20^\circ} \text{ glucose} = + 52,7^\circ \text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{dm}^{-1}.$$
$$[\alpha_D]^{20^\circ} \text{ fructose} = - 92,2^\circ \text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{dm}^{-1}.$$

1.2 - Dépistage de la FFase dans les cultures de moisissures (10,5 points)

Un test colorimétrique indirect a été développé (**document 1**) pour mettre en évidence la présence de FFase dans les cultures de différentes souches d'*Aspergillus* ou d'*Aureobasidium*. Il est basé sur la détection du fructose et du glucose.

1.2.1 - Compléter les réactions biochimiques mises en jeu lors de la détection du glucose, en précisant la nature des composés A, B et C.

- Réaction 1 : $\text{Glucose} + \text{O}_2 \xrightarrow{\text{GOD}} \text{composé A} + \text{H}_2\text{O}_2.$
- Réaction 2 : $2 \text{ composés B} + \text{phénol} + \text{amino-4-antipyrine} \xrightarrow{\text{POD}} \text{composé C} + 4 \text{H}_2\text{O}.$

1.2.2 - Préciser la réaction indicatrice et la réaction principale. Justifier la réponse.

1.2.3 - Quelles sont les conditions opératoires généralement respectées pour la détermination d'une activité enzymatique.

1.2.4 - Le **document 1** détaille le test de dépistage de la FFase dans les cultures de moisissures.

1.2.4.1 - Indiquer le(s) rôle(s) du contrôle négatif. Préciser le résultat attendu.

1.2.4.2 - Expliquer la présence d'un halo violet lors d'une réaction positive.

1.2.4.3 - Interpréter les résultats obtenus à partir des différentes souches de moisissures. Conclure.

BTS BIOANALYSES ET CONTRÔLES		Session 2012
Nom de l'épreuve : Biochimie et technologies d'analyse	Code : BAE3BT	Page : 2/10

1.3 - L'activité fructosyl-transférase (FTA) de la FFase : test enzymatique (10 points)

L'activité FTA est utilisée pour produire les FOS : elle catalyse le transfert d'un groupement fructosyl d'un donneur vers un accepteur.

Les FOS sont composés d'une unité de glucose reliée à :

- une unité de fructose (saccharose) ;
- deux unités de fructose (1-kestose, GF₂) ;
- trois unités de fructose (nystose, GF₃) ;
- quatre unités de fructose (fructofuranosyl-nystose, GF₄).

1.3.1 - Expliquer, en écrivant les réactions biochimiques, comment la FFase peut produire du 1-kestose en utilisant le saccharose comme seule source de substrat.

1.3.2 - Le test enzymatique mis au point, la détection des produits de la réaction ainsi qu'un exemple type de résultat sont décrits dans le **document 2**. Quelles injections préalables permettent d'interpréter les résultats du chromatogramme du document ?

1.3.3 - Quelle est la méthode de détection utilisée ? Pourquoi est-elle applicable aux produits et aux substrats étudiés lors de cette réaction ?

1.3.4 - Si l'on souhaitait optimiser le résultat présenté dans le **document 2**, quels paramètres pourrait-on faire varier ?

1.3.5 - Schématiser une « chaîne HPLC » et ses différents modules.

1.3.6 - Expliquer l'intérêt d'analyser ce test enzymatique en HPLC et non en chromatographie basse pression.

2 - Purification de la FFase (11,5 points)

Le préalable à la production industrielle de FOS est l'extraction, la purification et la caractérisation de la FFase.

880g d'*Aspergillus niger* ATCC 20611 sont congelés à -20°C et ramenés à température ambiante puis soniqués pendant 5 minutes dans un tampon pH 5,0 ; les opérations sont renouvelées 2 fois. Les produits de sonication sont centrifugés à 6000 g pendant 15 minutes (**document 3**, étape 1).

2.1 - Quel est l'intérêt de ces manipulations ?

Du sulfate d'ammonium est ajouté au surnageant jusqu'à 75 % de saturation. La solution obtenue est centrifugée (**document 3**, étape 2).

2.2 - Quelle propriété des protéines est mise en application à cette étape de la purification ?

Le surnageant est concentré et déposé sur une colonne DEAE-Sephadex® (**document 3**, étape 3). Les résultats sont présentés dans le **document 4**.

2.3 - Exposer le principe de la chromatographie d'échange d'ions au cours de la purification de la FFase. Expliquer le type d'éluion choisi et proposer une stratégie d'éluion alternative.

2.4 - Pourquoi doit-on tester l'activité enzymatique sur toutes les fractions obtenues ?

2.5 - Bilan de la purification de la FFase d'*A. niger* ATTCC 20611.

Le bilan est résumé dans le tableau suivant :

	C _{cat} (U/mL ⁻¹)	Volume (mL)	Masse protéines (mg)
Extrait brut	109	3400	6770
Surnageant	2050	80	198
Pool fraction FFase*	11588	8,0	47,7
Extrait purifié	4477	8,6	13,7

1U correspond à la quantité de FFase qui produit 1 µmol de 1-kestose par minute à partir d'une solution de saccharose à 60 %, à 55°C dans un tampon citrate pH 5,0.

2.5.1 - Calculer le rendement de purification et l'enrichissement. Conclure.

2.5.2 - Citer une méthode biochimique classique pouvant être mise en œuvre afin de déterminer la masse moléculaire de la FFase ainsi purifiée.

* pool des fractions présentant une activité FFase à l'issue de l'étape 3

BTS BIOANALYSES ET CONTRÔLES		Session 2012
Nom de l'épreuve : Biochimie et technologies d'analyse	Code : BAE3BT	Page : 3/10

3 - Applications en industrie alimentaire (21 points)

3.1 - Fabrication de sirops à teneur élevée en FOS (10 points)

La stabilité des FOS vis à vis de la température et du pH, ainsi que leur propriété gustative et d'amélioration du transit intestinal ont pour conséquence le lancement de la production de FOS à des fins commerciales.

3.1.1 - À partir des résultats présentés dans le tableau ci-dessous proposer le substrat le plus approprié pour lancer la production industrielle des FOS. Justifier la réponse.

substrat	produit	K_M (mol.L ⁻¹)	Vmax (μmol.L ⁻¹ .min ⁻¹)
Saccharose	GF2	0,07	508
GF2	GF3	0,15	499
GF3	GF4	0,55	265

3.1.2 - L'utilisation de méthodes chromatographiques permet de préparer :

- Le « Néosucre G » constitué de 55-60 % de FOS, 30 % de glucose et de 10-12 % de saccharose.
- Le « Néosucre P » constitué de 95 % de FOS.

Ces techniques étant toutefois coûteuses, une alternative à la préparation du Néosucre P serait la nanofiltration. Le dispositif de nanofiltration et les résultats obtenus sont présentés dans le **document 5**.

3.1.2.1 - Comment évolue un flux de perméation au cours d'une (nano)filtration ?
Quel est le principal inconvénient de cette technique ?

3.1.2.2 - Expliquer le terme pression transmembranaire.

3.1.2.3 - Analyser précisément les résultats consignés dans le tableau du **document 5**.
Conclure.

3.2 - Émergence d'effecteurs de la β-fructofuranosidase (11 points)

Les laboratoires de recherche en agro-alimentaire travaillent sur la synthèse de molécules reconnues et non hydrolysées par la FFase.

Un effecteur, le β-thio-fructofuranoside (le 2-hydroxyéthyl-S-β-fructofuranoside) noté « **Fru-S-ME** » a ainsi été produit par réaction du saccharose sur le β-mercaptoéthanol.

Une étude a été menée sur cet effecteur (**document 6**).

3.2.1 - Pourquoi peut-on stopper la réaction avec du NaOH ?

3.2.2 - Interpréter l'effet du Fru-S-ME sur la FFase. Justifier.

3.2.3 - Calculer le K_i de la FFase vis à vis du Fru-S-ME.

Donnée : K_M apparent = $K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$.

3.2.4 - Quelle application les industriels peuvent-ils mettre en œuvre avec ce β-thio-fructofuranoside dans le cadre de la purification de la FFase ? Citer son principal avantage.

DOCUMENT 1 :

TEST DE DÉPISTAGE DE LA FFase DANS LES CULTURES DE MOISSURES

1 - Principe

La détection du fructose est suivie grâce au test colorimétrique suivant :

D-Fructose + MTT + phénazine méthosulfate $\xrightarrow{\text{FDH}}$ 5-céto-D-Fructose + chromophore bleu.

MTT = bromure de méthylthiazolyldiphényl tétrazolium.

FDH = Fructose déshydrogénase.

La détection du glucose est basée sur le système GOD (glucose-oxydase)-POD (peroxydase).

2 - Mode opératoire

Différentes souches de moisissures sont mises en culture en boîte de Petri à 25°C pendant 5 à 7 jours. Un disque de 8 mm d'une colonie est prélevé et mis en culture sur une nouvelle boîte de Petri à 25°C pendant 72 h.

Après incubation, la colonie est recouverte avec de l'agar (0,7 % m/v) contenant les différents réactifs nécessaires au test enzymatique. Les résultats sont analysés après 10 minutes d'incubation.

On réalise un contrôle négatif sans moisissure.

3 - Résultats

La présence d'un halo violet autour de la colonie est considérée comme un résultat positif.

microorganisme	résultat
<i>Aspergillus niger</i> MUM 05.14	Halo en bordure de la colonie
<i>Aspergillus niger</i> MUM 05.15	Halo en bordure de la colonie
<i>Aspergillus niger</i> MUM 05.16	Halo en bordure de la colonie
<i>Aureobasidium pulullans</i> CCY 27-1-94	Halo de 3 cm de diamètre
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 20611	Halo recouvrant toute la boîte de Petri
<i>Aspergillus</i> MUM 03-50	Halo de 3 cm de diamètre
<i>Aspergillus</i> MUM 03-51	Halo de 3 cm de diamètre

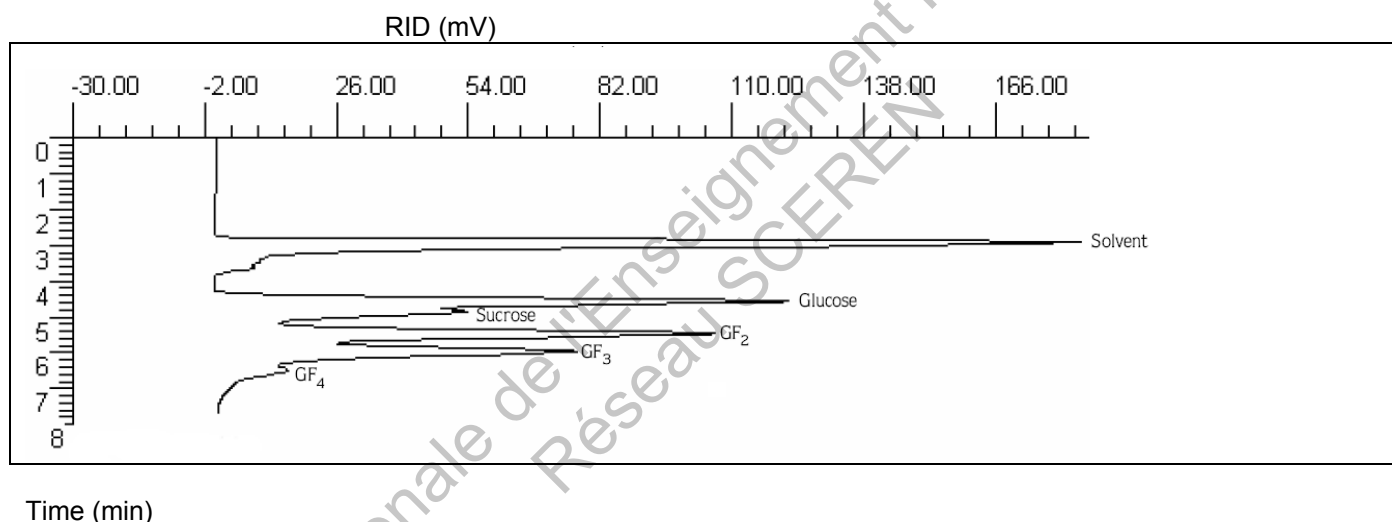
D'après : Dominguez, A. et al. (2006) *Rev. Iberoam. Micol.*, **23**, 189-191.

DOCUMENT 2 :

TEST ENZYMATIQUE ET DÉTECTION DES PRODUITS DE LA RÉACTION

Production of FOS was carried out using a reaction mixture, which consisted of 250 μL of enzyme and 750 μL of 60% (w/v) sucrose in citrate buffer (pH 5.0). Incubation took place at 55 °C for 3 H in a shaking water bath. At the end of incubation, the reaction was arrested, and the products in the reaction mixture were analyzed by an HPLC (Shimadzu, Japan) equipped with an RID Refractive Index Detector (Shimadzu, Japan), using an Aminopropyl column 250 \times 4.6 mm Excil amino 5 μm (SGE, Australia). We injected 10 μL of 20-fold dilution of the reaction mixture into the HPLC using an injector syringe (Hamilton, Nevada, USA). The analysis was carried out at room temperature using acetonitrile/water (65:35) as the mobile phase at a flow rate of 1.0 mL/min. The final yield of FOS was expressed as the percentage of conversion yield based on the initial concentration of sucrose.

Donnée : « sucrose » = saccharose.

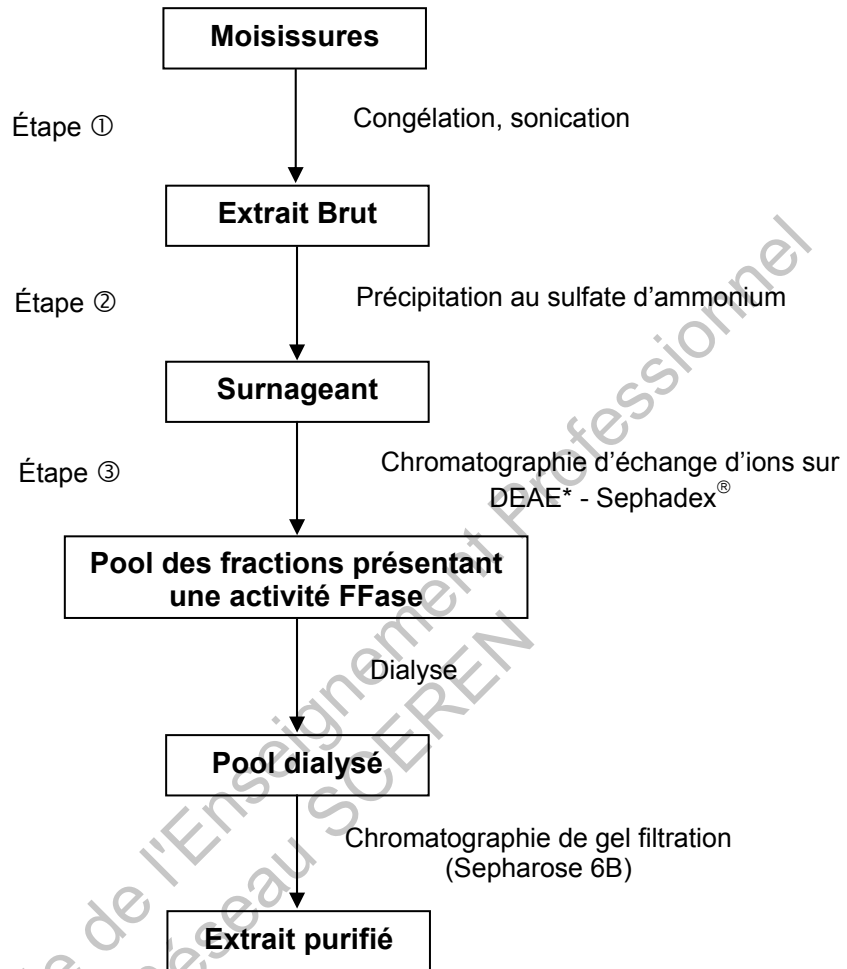


A typical HPLC chromatogram of the reaction mixture at the end of 3 H of incubation, indicating monosaccharide, disaccharide, and oligomers.

D'après : Lateef, A. *et al.* (2007) *Turk. J. Biol.*, **31**, 147-154.

DOCUMENT 3 :

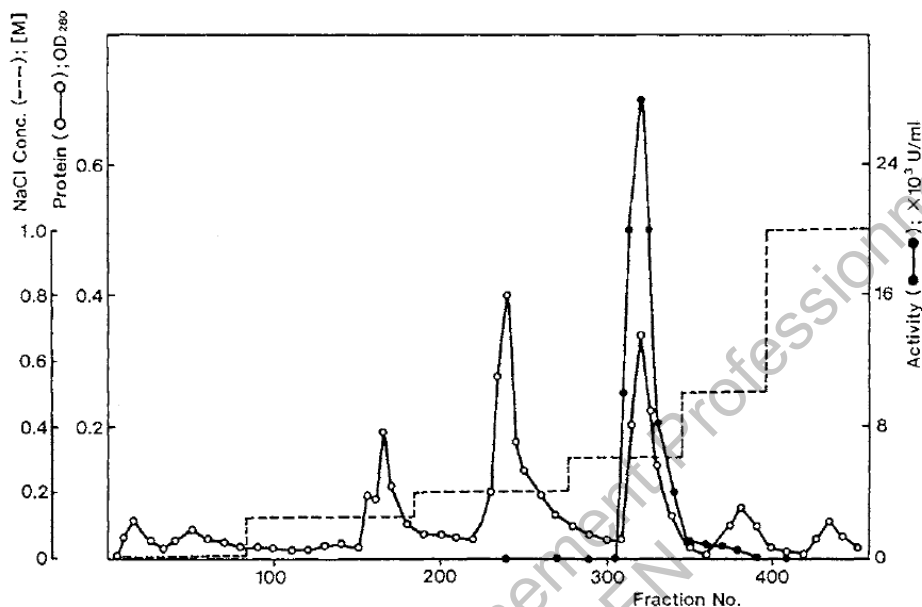
PLAN DE PURIFICATION DE LA FFase



DEAE* = Di Ethyl Amino Ethyl chargé positivement

DOCUMENT 4 :

CHROMATOGRAPHIE D'ÉCHANGE D'IONS SUR DEAE-SEPHADEX®

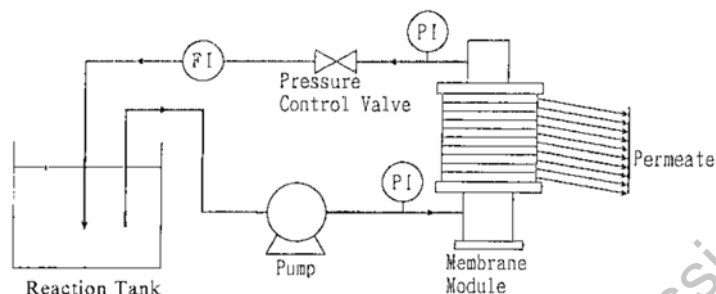


DEAE-Sephadex A-50 Column Chromatograph of the Crude Extract from *A. niger* ATCC 20611. The crude extract was put onto a DEAE-Sephadex A-50 column (5.0 × 35 cm) equilibrated with 20 mM phosphate buffer, pH 6.0. A step-wise elution was done with 0 M, 0.15 M, 0.2 M, 0.3 M, 0.5 M and 1.0 M NaCl in 20 mM phosphate buffer, as indicated by the dotted line. Ten-ml fractions of eluent were collected at a flow rate of 120 ml per hr. ●—●, transfructosylating activity; ○—○, absorbance at 280 nm; -----, NaCl concentration.

DOCUMENT 5 :

FOS PAR NANOFILTRATION

1 - Dispositif expérimental du pilote de nanofiltration (10 L)



2 - Mode opératoire

10 L d'une solution de saccharose à 30% dans un tampon pH 5,0 et la FFase (25 U par g de substrat) sont introduits dans le réservoir. La surface de la membrane est de $0,36 \text{ m}^2$. Le débit est de $5,0 \times 10^{-5} \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$. Le flux de perméation au début de la réaction est de $5,6 \times 10^{-6} \text{ m}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. La pression transmembranaire est de 4,0 MPa. La température est maintenue à 55°C. La nanofiltration est conduite pendant 12 H. Des prélèvements sont effectués aux temps 1 H, 3 H, 6 H et 12 H et sont analysés par HPLC.

3 - Résultats

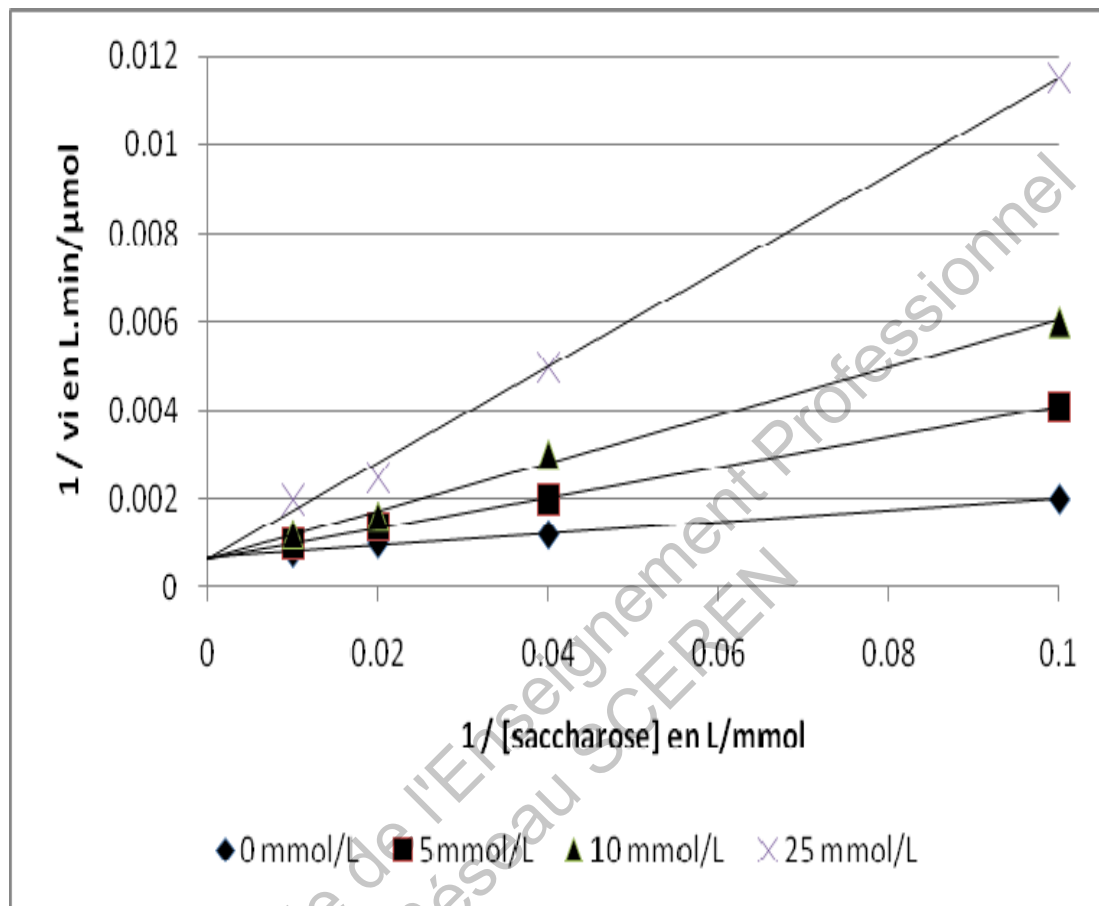
Composition en oses, en osides et en FOS du Néosucre G, du Néosucre P et des réténats

		% Glucose	% Saccharose	% GF ₂	% GF ₃	% GF ₄	% FOS
Néosucre G		30	10	27	27	6	60
Néosucre P		2	3	36	50	9	95
Réténat	0 h	--	100	--	--	--	--
Réténat	1 h	17	31	44	8	--	52
Réténat	3 h	19	16	46	18	1	65
Réténat	6 h	12	8	40	35	5	80
Réténat	12 h	2	5	36	48	9	93

D'après : Nishizawa, K. *et al.* (2001) *Food Sci. Technol. Res.*, **7** (1), 39-44.

DOCUMENT 6 :

GRAPHES DE LINEWEAVER-BURK Hydrolyse du saccharose par la FFase de *Saccharomyces cerevisiae* en présence de Fru-S-ME



Mode opératoire

50 μ L de saccharose sont mélangés avec 50 μ L de Fru-S-ME (les concentrations varient de 0 mmol/L, à 25 mmol/L). La réaction débute par addition de 100 μ L de FFase. Elle est arrêtée après une incubation à 40°C pendant 10 minutes par ajout de 150 μ L de solution de NaOH 0,2 mol/L.

Données :

Le point d'intersection sur l'axe des abscisses de la courbe obtenue avec 25 mmol/L de Fru-S-ME a pour coordonnées (-0,00647 ; 0).

Le point d'intersection sur l'axe des abscisses de la courbe obtenue avec 0 mmol/L de Fru-S-ME a pour coordonnées (-0,03333 ; 0).

D'après : Kiso, T. *et al.* (2003) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **67** (8), 1719-1724.

BTS BIOANALYSES ET CONTRÔLES		Session 2012
Nom de l'épreuve : Biochimie et technologies d'analyse	Code : BAE3BT	Page : 10/10