

BACCALAURÉAT TECHNOLOGIQUE

Série : Sciences et Technologies de Laboratoire

Spécialité : Biotechnologies

SESSION 2015

Sous-épreuve écrite de Biotechnologies

Coefficient de la sous-épreuve : 4

Ce sujet est prévu pour être traité en deux heures.

**Les sujets de CBSV et de biotechnologies seront traités
sur des copies séparées.**

L'usage de la calculatrice est autorisé.

Ce sujet comporte 8 pages.

OPTIMISATION D'UN PROCÉDÉ DE FABRICATION DE SUCRE INVERTI

L'industrie sucrière produit du sucre d'intérêt agro-alimentaire à partir de saccharose extrait de la betterave à sucre. La France est le premier producteur mondial de sucre de betterave.

La directive européenne 2001/11/CE désigne sous le terme de « sucres » les principaux glucides à saveur sucrée : glucose, fructose, saccharose, sirop de glucose, sucre inverti.

Le sucre inverti a un pouvoir sucrant plus grand que le saccharose, expliquant son utilisation en confiserie, boulangerie, pâtisserie, biscuiterie et chocolaterie. Il est obtenu par hydrolyse du saccharose en présence d'invertase. Cette enzyme peut être produite à l'échelle industrielle par des levures.

Un industriel cherche à optimiser son procédé de production de sucre inverti. Pour cela, il effectue :

- une vérification de la teneur en saccharose dans le jus sucré extrait de la betterave ;
- la sélection d'une souche de levure productrice d'invertase ;
- la détermination des conditions de culture optimales des levures ;
- le contrôle de la qualité de l'invertase extraite.

1. ÉTAPES DE PRODUCTION DU SUCRE INVERTI ET DÉTERMINATION DE LA TENEUR EN SACCHAROSE DU JUS SUCRÉ DE BETTERAVE PAR POLARIMÉTRIE

Q1. A partir du **document 1**, représenter sous forme d'un organigramme toutes les étapes de production du sucre de consommation et du sucre inverti.

Pour être exploitable, un jus sucré de betterave doit avoir une teneur en saccharose comprise entre 15 % et 20 %.

Q2. Déterminer, à l'aide du **document 2**, la teneur en saccharose du jus sucré de betterave.

Q3. Comparer la teneur en saccharose du jus sucré de betterave obtenue à celle attendue et conclure.

2. CHOIX D'UNE SOUCHE DE LEVURE ADAPTÉE À LA PRODUCTION D'INVERTASE

Pour choisir la souche de levure adaptée à la production d'invertase, l'industriel effectue un test d'assimilation des glucides. Le **document 3** présente le principe du test et les résultats obtenus.

Q4. Expliquer l'apparition d'un trouble dans certains tubes.

Q5. Expliquer le rôle des tubes témoins et interpréter les résultats obtenus pour ces tubes.

Q6. Analyser les résultats obtenus et proposer la ou les souche(s) de levure adaptée(s) aux besoins de l'industriel.

3. ETUDE DES CONDITIONS DE CULTURE DES SOUCHES DE LEVURES PRODUCTRICES D'INVERTASE

Les levures sélectionnées sont mises en culture en milieu Sabouraud additionné d'un antibiotique, le chloramphénicol.

Les levures sont des microorganismes dont la température optimale de croissance est en général située entre 25 °C et 30 °C. Ces deux températures d'incubation ont été testées, afin de déterminer la température permettant d'optimiser la croissance.

Q7. Argumenter l'addition de chloramphénicol dans le milieu de culture.

Q8. Proposer une méthode permettant de suivre la croissance de *Saccharomyces cerevisiae* au laboratoire et l'expliquer succinctement.

Q9. À l'aide du **document 4**, déterminer graphiquement les paramètres de croissance de *Saccharomyces cerevisiae* pour chaque température :

- la vitesse spécifique de croissance maximale μ_{expo} (encore notée $Q_{X\ expo}$) ;
- le temps de génération G.

Q10. Comparer les valeurs obtenues et proposer la température de culture des levures à utiliser par l'industriel afin d'optimiser la production d'invertase. Argumenter ce choix.

4. CONTRÔLE DE LA QUALITÉ DE L'INVERTASE EXTRAITE

Deux invertases sont extraites suivant un procédé standardisé à partir de *Cryptococcus laurentii* et à partir de *Saccharomyces cerevisiae*. Pour chaque invertase, l'industriel contrôle :

- l'efficacité de l'hydrolyse du saccharose par chromatographie ;
- la concentration d'activité catalytique de l'invertase.

4.1. Contrôle de l'efficacité de l'hydrolyse du saccharose

L'analyse de la composition en sucres invertis produits avec ces deux enzymes est réalisée par chromatographie d'adsorption sur couche mince (CCM) dont le résultat est présenté dans le **document 5**.

Elle permet d'identifier les glucides présents et de contrôler l'efficacité de l'hydrolyse du saccharose.

Q11. Analyser les résultats obtenus pour les deux essais.

Q12. Identifier les sucres constitutifs des sucres invertis obtenus en expliquant la démarche.

Q13. Déterminer la réaction d'hydrolyse du saccharose catalysée par l'invertase, à partir des résultats obtenus.

Q14. Conclure sur l'efficacité de l'hydrolyse du saccharose par l'invertase issue de chaque microorganisme.

4.2. Contrôle de l'efficacité de l'hydrolyse du saccharose

La concentration d'activité catalytique de l'invertase est déterminée par méthode cinétique. Pour cela, l'apparition du produit (sucre inverti) est mesurée au cours du temps par spectrophotométrie. Les conditions d'hydrolyse enzymatique du saccharose sont identiques dans les essais 1 et 2. Les valeurs mesurées sont présentées dans le **document 6**.

Q15. Vérifier la cohérence des valeurs de concentration d'activité catalytique mesurées avec les résultats obtenus par l'analyse qualitative de la chromatographie sur couche mince.

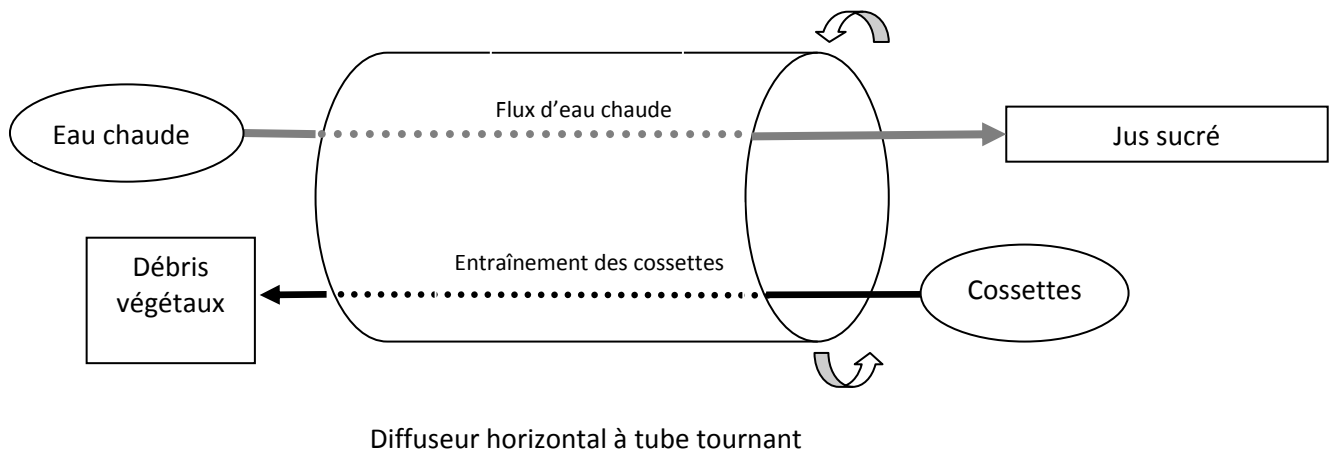
Q16. Conclure quant à la souche qui permettra de produire l'invertase la plus intéressante pour l'industriel.

SYNTHESE

Q17. Rédiger une synthèse de la démarche globale et des différents choix effectués par l'industriel dans le but d'optimiser son procédé de production de sucre inverti.

DOCUMENT 1 - Étapes de production du sucre de consommation et du sucre inverti

- 1) Élimination des impuretés extérieures de la betterave (terre, pierre, débris végétaux...) dans l'atelier de réception et de lavage.
- 2) Découpe des betteraves sous forme de cossettes (fines lanières rigides de betterave) dans l'atelier de découpe.
- 3) Extraction du sucre par diffusion : un diffuseur horizontal à tube tournant permet l'entraînement des cossettes dans un sens pendant qu'en sens inverse progresse un flux d'eau chaude. Après diffusion des molécules hydrosolubles contenues dans les betteraves, dont le sucre, un jus sucré est récupéré. À l'opposé, les débris végétaux sont éliminés.



- 4) Filtration du jus sucré.
- 5) Traitement d'une partie du filtrat par évaporation, cristallisation et séchage afin de produire du sucre de consommation.
- 6) Traitement de l'autre partie du filtrat par l'invertase afin de produire du sucre inverti qui sera employé en confiserie.

Source : www.labetterave.com

DOCUMENT 2 - Dosage polarimétrique du saccharose

- Principe d'un dosage polarimétrique

La lumière naturelle est une onde vibratoire multidirectionnelle. Lorsque la lumière traverse un polariseur, ses vibrations sont limitées à un seul plan : le **plan de polarisation**.

Les oses sont des substances optiquement actives : traversées par une lumière polarisée, elles sont capables de faire tourner le plan de polarisation d'un angle α .

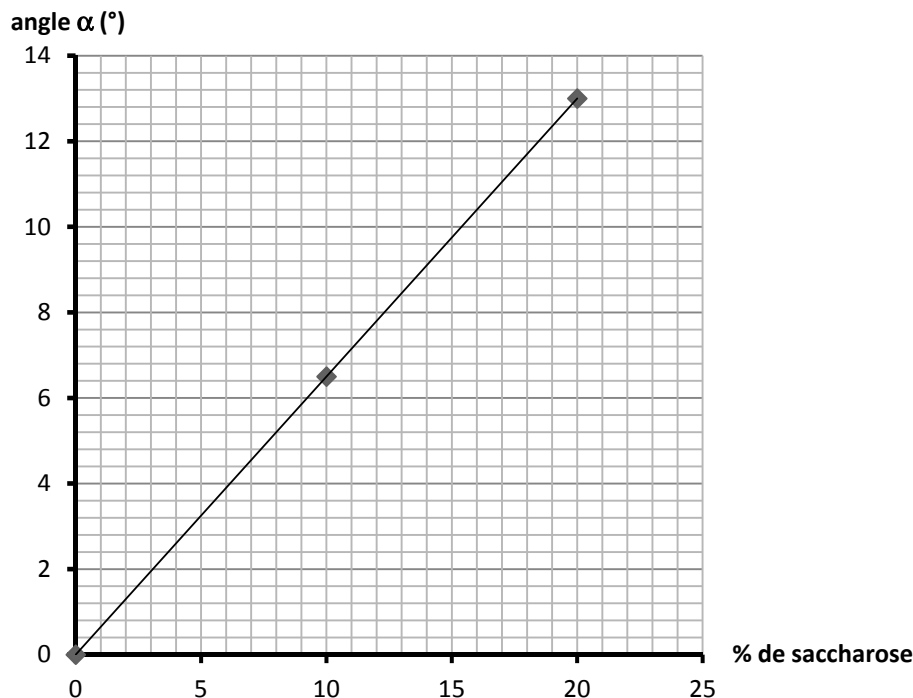
- Procédure opératoire du dosage polarimétrique du saccharose

1. Préparation des solutions étalon de saccharose à 10 % et à 20 %.
2. Ajustage du zéro.
3. Mesure du pouvoir rotatoire des solutions étalon.
4. Mesure du pouvoir rotatoire de la solution de saccharose à doser.

- Indications obtenues pour le dosage polarimétrique du saccharose

Solutions	Indications de mesure de l'angle α
Solution étalon de saccharose à 10 %	6,50°
Solution étalon de saccharose à 20 %	13,00°
Jus de betterave à doser	10,00°

- Droite d'étalonnage du polarimètre pour le dosage du saccharose : $\alpha = f(\% \text{ saccharose})$



DOCUMENT 3 - Test d'assimilation des glucides

Principe du test d'assimilation des glucides

Le test, effectué en tubes à hémolyse, consiste à ensemencer chacune des 4 souches de levure dans un milieu minimum additionné d'un glucide.

Les glucides testés sont présentés dans le tableau. En parallèle, un témoin sans glucide est réalisé pour chaque souche.

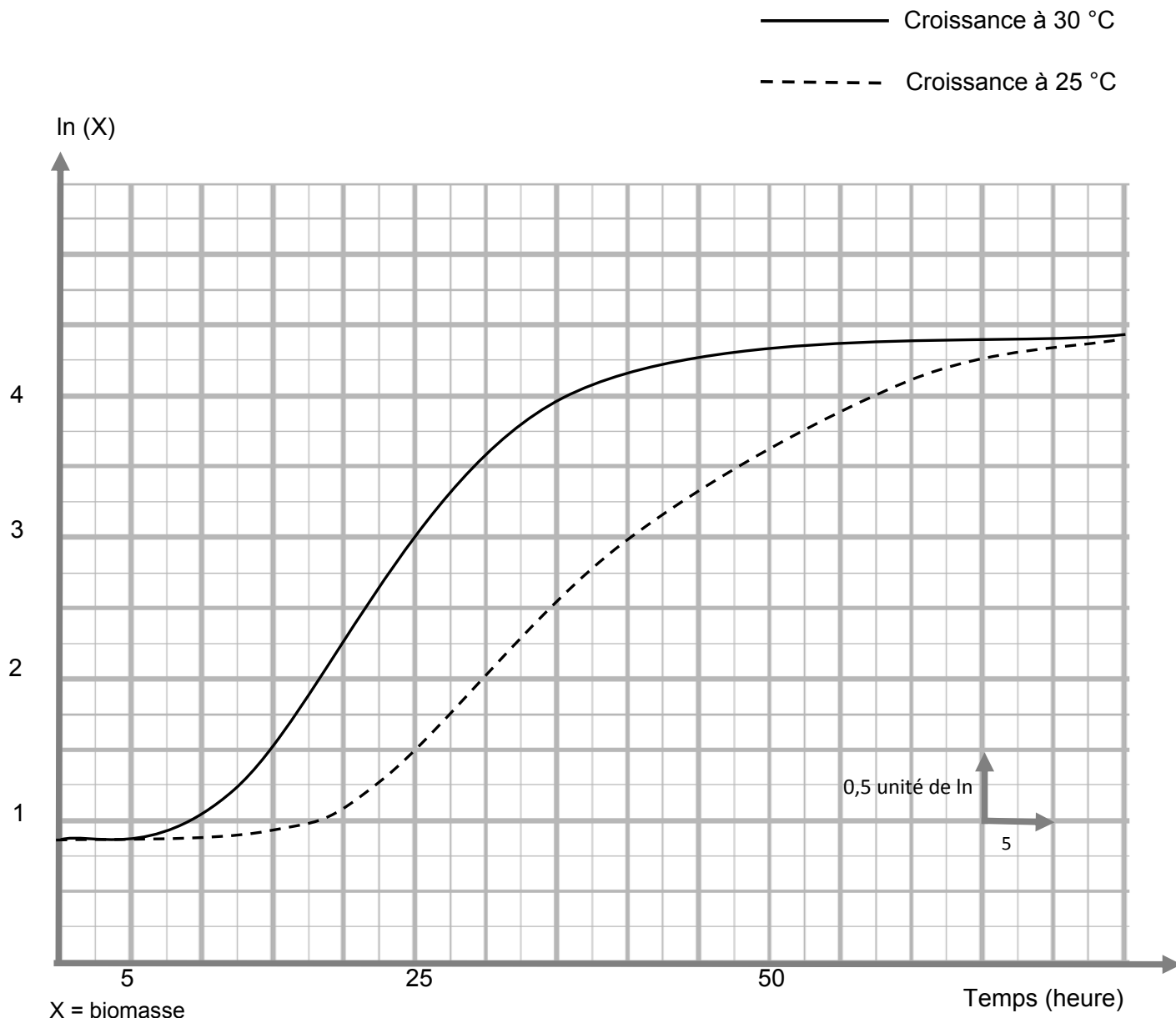
Résultats des tests d'assimilation effectués sur différentes souches de levures

Le tableau présente l'aspect des tubes après incubation.

Souches	Solutions étudiées			
	témoin	glucose	arabinose	saccharose
<i>Cryptococcus laurentii</i>	limpide	trouble	trouble	trouble
<i>Cryptococcus terreus</i>	limpide	trouble	trouble	limpide
<i>Kloeckera spp</i>	limpide	trouble	limpide	limpide
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	limpide	trouble	limpide	trouble

DOCUMENT 4 - Courbes de croissance de *Saccharomyces cerevisiae* à 25 °C et 30 °C en milieu Sabouraud additionné de chloramphénicol

Les mêmes résultats sont obtenus avec *Cryptococcus laurentii*.



Données :

Pendant la phase exponentielle de croissance, la vitesse spécifique de croissance maximale μ_{expo} est proportionnelle au nombre de générations par unité de temps. Le temps de génération G correspond au temps nécessaire au doublement d'une population microbienne pendant la phase exponentielle de croissance.

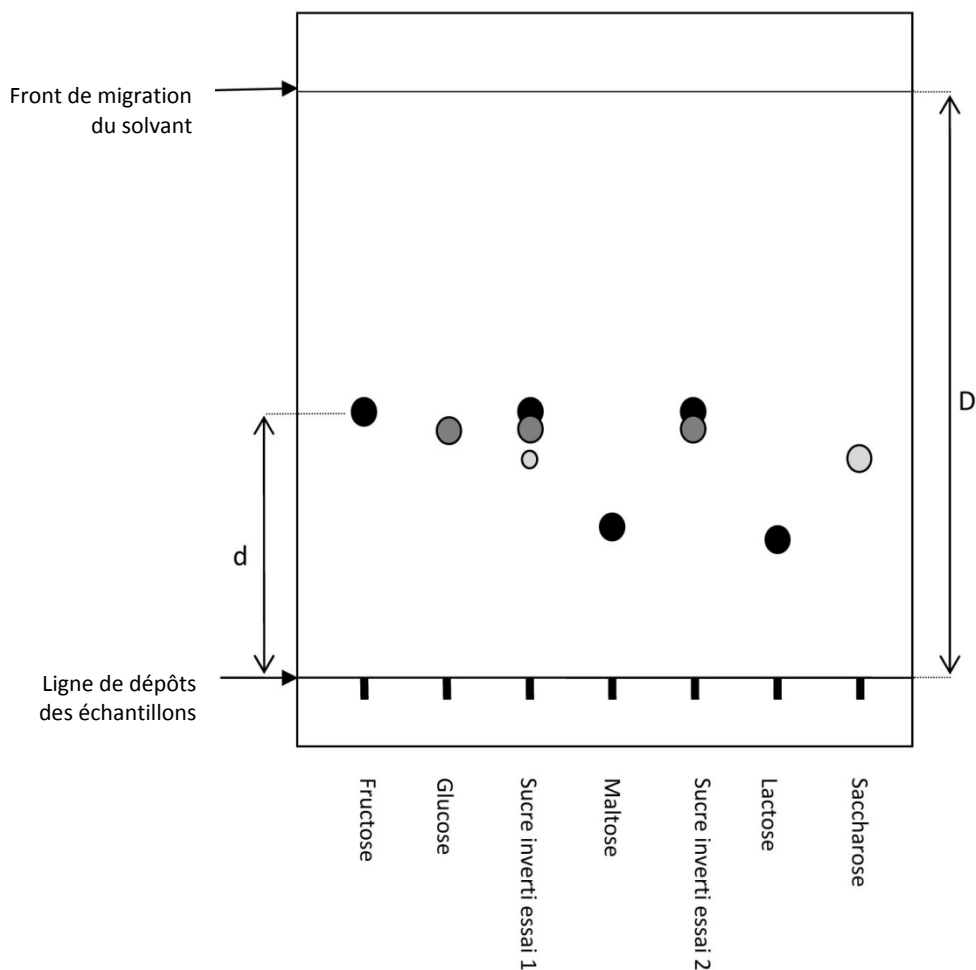
Equations aux grandeurs :

$$\mu_{expo} = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1}$$

$$G = \frac{\ln 2}{\mu_{expo}}$$

DOCUMENT 5 - Analyse qualitative du sucre inverti par chromatographie sur couche mince

5a - Schéma du chromatogramme obtenu



L'essai 1 est réalisé avec l'invertase extraite de *Cryptococcus laurentii*.
L'essai 2 est réalisé avec l'invertase extraite de *Saccharomyces cerevisiae*.

5b - Exploitation des résultats pour les solutions étalon de glucides

Dépôts	Étalon fructose	Étalon glucose	Étalon maltose	Étalon lactose	Étalon saccharose
<i>R_f</i>	0,45	0,42	0,26	0,23	0,38
Couleur	Noir	Gris foncé	Noir	Noir	Gris clair

DOCUMENT 6 - Concentration d'activité catalytique de l'invertase

Souche de levure	Concentration d'activité catalytique de l'invertase ($\mu\text{kat.L}^{-1}$)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	120
<i>Cryptococcus laurentii</i>	50

Rappel : L'unité microkatal (μkat) est la quantité d'enzyme qui catalyse l'apparition d'une micromole de produit par seconde dans des conditions opératoires précises.