

ÉPREUVE PROFESSIONNELLE DE SYNTHÈSE.
Première partie.: ÉTUDE D'OPÉRATIONS TECHNIQUES.
DURÉE: 4 HEURES COEFFICIENT : 4

L'usage d'un dictionnaire anglais français est autorisé

ÉTUDE DE QUELQUES ASPECTS DE LA FABRICATION DE LA BIÈRE

Les opérations essentielles à la fabrication de la bière sont le maltage, le brassage, la fermentation (utilisation de souches de levures sélectionnées ou levains), la garde et le conditionnement.

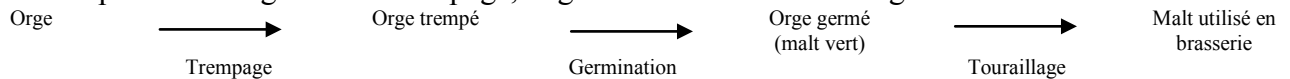
Deux aspects seront étudiés :

- la qualité du malt,
- le contrôle des levains.

1. Etude de quelques enzymes du malt (38 points)

Le malt est la matière première essentielle à la fabrication de la bière.

Les trois étapes du maltage sont le trempage, la germination et le touraillage.



L'objectif du maltage est la synthèse d'enzymes permettant la solubilisation des matières de réserve (amidon) et des parois cellulaires ainsi que la dégradation des protéines afin d'obtenir le profil azoté souhaité pour la fabrication et la qualité de la bière.

Ces enzymes sont de deux types

- les enzymes qui dégradent l'amidon, en particulier les α et β -amylases,
- les enzymes protéolytiques, en particulier les endoprotéases responsables des premières étapes de la dégradation de l'orge.

1.1. Etude de l'activité amylasique (20 points)

Les amylases sont des glucosylhydrolases ; elles dégradent l'amidon et d'autres substrats synthétiques.

Habituellement l'activité amylasique est déterminée sur le malt par le calcul du "pouvoir diastasique" exprimé en unités Windisch Kolbach (WK) : il s'agit de la mesure de l'hydrolyse d'une solution d'amidon par l'extrait enzymatique de malt avec détermination iodométrique des sucres réducteurs formés au cours de cette amylolyse.

Une autre méthode plus récente est basée sur la mesure de l'activité de la β -amylase totale dans l'orge.

La β -amylase hydrolyse les liaisons α 1 \rightarrow 4 des chaînes d'amidon à partir de leur extrémité non réductrice en libérant du maltose ; l'activité β -amylasique est inhibée par la présence d'ions Ca^{2+} .

Dans le grain d'orge une partie de la β -amylase est "insoluble" car liée aux granules d'amidon, l'autre partie est "libre" car localisée entre les granules d'amidon.

Les étapes de l'extraction de la β -amylase TOTALE et de la mesure de son activité sont reportées sur le **document 1**.

1.1.1. Etude de l'extraction (documents 1 et 21 (7 points)

1.1.1.1. Indiquer quel tampon A ou B sera choisi pour extraire la totalité de la β -amylase de la farine d'orge. Expliquer.

1.1.1.2. Justifier la présence dans le tampon d'extraction d'E.D.T.A., de sérumbumine bovine et d'azide de sodium.

1.1.1.3. La centrifugation doit être réalisée à 2000 g pendant 10 minutes.

A quelle vitesse, en tours par minute, faudra-t-il régler la centrifugeuse dont le rayon moyen de centrifugation est de 12,5 cm ?

Donnée: Nombre de $g = \frac{\omega^2 \cdot r}{g}$ avec $\omega = 2\pi \cdot N$

N en tours par seconde
r = rayon moyen en mètre
g = 9,81 m.s⁻²

1.1.2. Mesure de l'activité amylasique (document 1) (9 points)

1.1.2.1. Quel est le type de méthode utilisée ?

1.1.2.2. Indiquer la nature chimique du réactif d'arrêt de la réaction avant d'effectuer la mesure de l'absorbance.

1.1.2.3. Donner la composition du témoin réactif en précisant l'ordre dans lequel seront ajoutées les diverses solutions.

1.1.2.4. Détermination de l'activité amylasique par gramme de farine d'orge

$$\text{Activité par gramme en U/g} = (A_E - A_T) \cdot k$$

a) Calculer la valeur du coefficient k lorsque x = 1 mL.

b) On analyse une farine d'orge dont l'activité est de l'ordre de 1000 U/g. Déterminer la valeur du volume x (1 mL, 5 mL, 10 mL ou 20 mL) permettant une dilution convenable de la solution E₁. En déduire l'activité amylasique totale de cet échantillon d'orge en U/g, sachant que A_E - A_T = 0,432.

Données :

- ε_{PNP} dans la solution de lecture = 17,8 10³ L . mol⁻¹ . cm⁻¹
- 1 unité d'activité (U) correspond à la quantité d'enzyme qui fournit 1 micromole de 4-nitrophénol par minute, dans les conditions de la technique.

1.1.3. Comparaison avec la méthode de référence (4 points)

Des mesures ont été effectuées sur plusieurs échantillons d'orge, permettant de déterminer

- l'activité β-amylasique totale de l'orge exprimée en U/g,
- le "pouvoir diastasique des malts correspondants, après micromaltage, exprimé en unités Windisch Kolbach (WK) : méthode de référence.

Elles ont donné les résultats suivants :

Numéro échantillon	1	2	3	4	5	6
Activité β-amylasique en U/g : Act.	1225	600	392	473	923	1110
Pouvoir diastasique en WK : P	436	215	139	178	346	420

1.1.3.1. Donner l'équation de la droite de régression reliant ces deux méthodes Act = f(P).

1.1.3.2. Déterminer la valeur du coefficient de corrélation.

1.1.3.3. Est-il envisageable de remplacer la mesure du "pouvoir diastasique" du malt par celle de l'activité β-amylasique totale de l'orge correspondant ? Justifier.

1.2. Séparation des endoprotéases du malt vert (18 points)

Cette technique permet de contrôler la qualité du malt en vue de son utilisation en brasserie. Elle s'effectue par électrophorèse bidimensionnelle en gel de polyacrylamide.

Première dimension: isoélectrofocalisation (I.E.F.) en gel de polyacrylamide entre pH 2,5 et 7,0.

Deuxième dimension perpendiculaire à la précédente : électrophorèse en gel de polyacrylamide dans des conditions non dénaturantes (P.A.G.E.).

1.2.1. Première étape : isoélectrofocalisation (document 3) (7 points)

1.2.1.1. Sur quel critère s'effectue cette séparation ?

1.2.1.2. Indiquer le principe général de la méthode d'I.E.F. en précisant le rôle des ampholytes. Expliquer le rôle des autres produits utilisés dans la préparation du gel d'I.E.F.

1.2.2. Deuxième étape : électrophorèse P.A.G.E. (7 points)

Une des trois bandes du gel d'I.E.F. est placée au sommet d'un gel d'électrophorèse P.A.G.E. La migration s'effectue verticalement et perpendiculairement à la précédente, dans des conditions non dénaturantes (**document 4**).

1.2.2.1. Expliquer pourquoi le tampon et le gel d'électrophorèse ne contiennent ni sodium dodécylsulfate, ni β -mercaptoéthanol.

1.2.2.2. Les endoprotéases ayant des pHi acides, comment seront-elles chargées et vers quel pôle migreront-elles dans le gel ?

De quel autre caractère moléculaire dépendra aussi cette migration ?

1.2.2.3. Expliquer le principe de la révélation et indiquer l'aspect des gels obtenus après coloration : couleur du fond et des taches d'endoprotéases.

1.2.2.4. La migration a été réalisée à $+4^{\circ}\text{C}$; justifier ce choix.

1.2.3. Analyse des résultats (4 points)

Quatre groupes d'endoprotéases A, B, C et D ont été caractérisés (voir **document 4**). Indiquer les propriétés physico-chimiques différenciant chacun de ces groupes.

2. Contrôle des levains (42 points)

2.1. **Dénombrement des levures (22 points)**

Les souches de levure utilisées en fermentation appartiennent au genre *Saccharomyces*.

A partir de souches pures de levures conservées au laboratoire de microbiologie, plusieurs étapes sont nécessaires avant d'ensemencer les cuves de fermentation.

Différents volumes de milieux de culture sont utilisés successivement :

Souche pure (sur milieu de conservation) \rightarrow 10 mL \rightarrow 200 mL \rightarrow 15 L (ballon Carlsberg) \rightarrow 400 L \rightarrow 2000 L (Levurier) \Rightarrow Cuve de fermentation (500 hL à 5000 hL).

Chaque transfert est réalisé quand la suspension cellulaire atteint une population de $3,0 \cdot 10^7$ cellules/mL.

De nombreux dénombrements sont nécessaires pour vérifier l'état de la culture.

On se propose de comparer différentes méthodes selon le plan de travail schématisé cidessous.

Ballon Carlsberg (15L)



Prélèvement d'un échantillon S
= suspension de *Saccharomyces*
(maintenue dans la glace)

\rightarrow 30 numérations automatiques (sur compteur COULTER)
 \rightarrow 30 numérations sur cellule de Malassez
 \rightarrow 1 dénombrement sur milieu gélosé
 \rightarrow 1 test de viabilité (méthode de FUNK)

2.1.1. Numération automatique des levures (12 points)

Une fraction de l'échantillon S est diluée à l'aide d'un diluteur automatique : 40 μL sont complétés à 20 mL à l'aide d'une solution isotonique (Isoton).

La dilution ainsi préparée est placée dans une cuve à ultra-sons pour subir une sonication douce pendant 1 minute.

Elle est ensuite conservée dans la glace. Trente mesures sont effectuées à l'aide du compteur Coulter dont un schéma simplifié est présenté dans le **document n° 5**.

2.1.1.1. Indiquer l'intérêt de la sonication douce.

2.1.1.2. Indiquer **sur la copie** la signification des éléments repérés de 1 à 5 sur le schéma du compteur COULTER.

2.1.1.3. Expliquer le principe de la mesure.

2.1.1.4. Exploitation des résultats.

- Sachant que le volume aspiré par le compteur est de 0,5 mL, à quel volume de suspension **initiale** (échantillon S) correspond le nombre affiché sur le compteur ?
- La moyenne des résultats des 30 mesures est de : 21 030 et la somme des carrés des écarts entre les valeurs expérimentales x_i , et la moyenne \bar{x} est de : 1 793 493.
Calculer l'écart-type et le coefficient de variation correspondant à ces résultats.

$$\text{Données : variance } v = \frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1} \quad \text{écart-type : } \sigma = \sqrt{v}$$
$$\text{CV} = (\sigma/\text{moyenne}) \times 100 \quad \text{nombre d'échantillons} = n$$

- Quel contrôle réalise-t-on par ce type d'analyses en série ?
(l'ensemble des opérations a été effectué par un même technicien dans la journée).
- A partir de la moyenne précédente, calculer le nombre de cellules par mL de suspension S.
Peut-on réaliser le transfert des levures en cuves de 400 L ?

2.1.2. Numération en hématimètre (3 points)

0,1 mL d'échantillon S est ajouté à 0,9 mL d'eau physiologique stérile.

30 numérations en cellule de Malassez sont effectuées à partir de cette dilution.

Les paramètres statistiques correspondant aux résultats obtenus sont les suivants:

moyenne = 214 levures/10 rectangles

écart-type = 24

coefficient de variation = 11 %

Caractéristiques de la cellule de Malassez

Longueur du quadrillage : 2,5 mm Profondeur : 0,2 mm

Largeur du quadrillage : 2 mm Nombre de rectangles : 100

2.1.2.1. Calculer la densité de la population en nombre de cellules/mL de suspension S.

2.1.2.2. A l'aide de l'ensemble de ces résultats, comparer les deux méthodes de numération.

2.1.3. Test de viabilité (4 points)

0,5 mL d'échantillon S est dilué dans 0,5 mL de bleu de méthylène tamponné à pH 4 (bleu de Funk). Le mélange est monté en cellule de Malassez et 400 cellules sont comptées. 14 cellules apparaissent bleues et 386 sont non colorées.

2.1.3.1. Quelle est la signification de la différence de coloration observée ?

2.1.3.2. Donner le résultat du test de viabilité (en % de cellules viables).

2.1.3.3. Calculer le nombre de cellules viables par mL de suspension S dont on a réalisé les numérations précédemment.

2.1.4. Dénombrement sur milieu gélosé (3 points)

Des dilutions décimales de l'échantillon S sont réalisées en eau physiologique stérile. 0,1 mL des dilutions 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} sont étalés en double et en surface du milieu Sabouraud.

Le nombre de colonies comptées sur chacune des boîtes après 48 heures d'incubation à 30°C est reporté dans le tableau suivant

dilution 10^{-3}	dilution 10^{-4}	dilution 10^{-5}
incomptable	167	15
incomptable	172	18

2.1.4.1. Exprimer le résultat du dénombrement en U.F.C./mL de suspension S (U.F.C. = unités formant des colonies).

2.1.4.2. Comparer cette valeur

- à celle trouvée avec la cellule de Malassez (ou le compteur COULTER)
- au nombre de cellules viables par mL de suspension S.

Interpréter les différences obtenues.

2.2. Recherche de contaminants dans les levains de brasserie (20 points)

Deux types de contaminants peuvent être rencontrés

- des levures : **une autre levure de production** utilisée dans la brasserie pour obtenir une bière de qualité différente.
une levure sauvage, non utilisable en production.
- des bactéries.

2.2.1. Mise en évidence des levures par immunofluorescence (17 points)

Pour les productions faisant appel à *Saccharomyces cerevisiae* CBS 1171, le laboratoire de microbiologie a mis au point une technique d'immunofluorescence permettant de vérifier que cette souche n'est pas contaminée par une autre levure.

Le **document n° 6** présente les différentes étapes mises en oeuvre pour la réalisation de cette technique.

2.2.1.1. Schématiser les différentes étapes correspondant à la partie 3 du **document n°6** : préparation microscopique.

2.2.1.2. Préciser le nom de la technique d'immunofluorescence utilisée. Indiquer les intérêts de cette technique par rapport à d'autres techniques d'immunofluorescence.

2.2.1.3. La lecture des lames est réalisée grâce à un microscope à épifluorescence.

Comment apparaîtra :

- la levure de production (*S. cerevisiae* CBS 1171),
- une levure contaminante ?

2.2.1.4. La lecture des lames est réalisée grâce à un microscope à épifluorescence.

Quel est l'intérêt de procéder à un épuisement (partie 2 du **document n°6**) du sérum anti *Saccharomyces cerevisiae* CBS 1171.

2.2.1.5. Le **document n°7** montre les intensités de fluorescence obtenues pour différentes souches de levures de production et contaminantes.

- Dans le cadre de la recherche de contaminations par des levures sauvages peut-on affirmer que cette méthode est fiable à 100 % ? Justifier la réponse.
- La brasserie utilise couramment *S. cerevisiae* CBS 1171, *S. uvarum* CBS 395 et *S. cerevisiae* CBS 1395.

Ce **test** permet-il de s'assurer avec certitude que la souche de *Saccharomyces cerevisiae* CBS 1171 utilisée actuellement n'est pas contaminée par une autre souche de production ?

- Dans un avenir proche, la brasserie envisage d'utiliser *S. uvarum* CBS 382. La technique actuelle permettant de mettre en évidence *S. cerevisiae* CBS 1171 sera-t-elle remise en question ? Justifier la réponse.

En cas de réponse positive, proposer une modification du protocole (**document n°6**) visant à rendre le test opérationnel.

2.2.2. Recherche de contaminants bactériens (3 points)

En brasserie, les bactéries contaminantes les plus fréquemment rencontrées sont

- des bactéries aérobies (*Pseudomonas*, *Micrococcus*...),
- des bactéries lactiques (provenant le plus souvent du malt).

2.2.2.1. Quelle substance inhibant spécifiquement les levains est ajoutée dans les milieux de culture destinés à mettre en évidence les bactéries contaminantes ?

2.2.2.2. Citer un milieu permettant de rechercher les bactéries lactiques. Préciser les conditions d'incubation.

DOCUMENT 1 : TECHNIQUE D'EXTRACTION ET DE DOSAGE DES β -AMYLASES

EXTRACTION DE LA β -AMYLASE TOTALE OU LIBRE

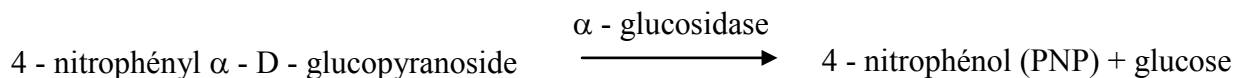
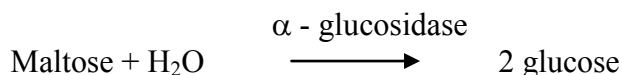
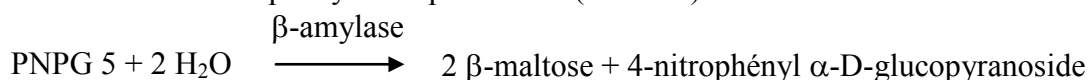
- Moudre l'orge en farine.
- Peser exactement $m = 0,500$ g de farine et ajouter 5 mL de tampon d'extraction A ou B (voir **document 2**).
- Extraire pendant 2 heures en agitant de temps en temps.
- Centrifuger à 2000 g pendant 10 minutes ; le surnageant (5 mL) constitue l'extrait brut.
- Effectuer 2 dilutions successives de l'extrait brut
 - 0,2 mL d'extrait brut complété à 10,0 mL avec le tampon A ; cette première dilution est appelée **solution E₁** ;
 - puis 0,1 mL de solution E₁, complété à **x** mL avec le tampon A de telle sorte que l'absorbance A_E n'excède pas 0,8 ; cette deuxième dilution est appelée **solution E₂**.

x peut être égal à 1 mL, 5 mL, 10 mL ou 20 mL.

DOSAGE DE LA β -AMYLASE

Equations des réactions intervenant dans le dosage.

Le substrat utilisé est le 4-nitrophénylmaltopentaoside (PNPG 5).



Mode opératoire.

- Prélever 0,2 mL de solution de "substrat" préincubée à 40°C pendant 2 minutes.
- Ajouter 0,2 mL de solution E₂. Agiter.
- Laisser incuber à 40°C pendant 10 minutes exactement.
- Ajouter 3 mL de réactif d'arrêt. Agiter.
- Lire rapidement, dans une cuve de trajet optique égal à 1 cm, à $\lambda = 410$ nm, l'absorbance de la solution jaune obtenue ; cette absorbance est appelée A_E.
- Effectuer un témoin réactif dans les mêmes conditions (A_T à $\lambda = 410$ nm).

DOCUMENT 2 : REACTIFS UTILISES POUR L'EXTRACTION ET DOSAGE DES β -AMYLASES

Substrate solution :

4-nitrophényl maltopentaoside (PNPG 5) 47,5 mg/vial

α -glucosidase 1000 U/vial

Dissolve the entire contents of one vial in 10,0 mL of distilled water.

At 4°C, the substrate is stable for at least seven days.

Extraction buffers :

Buffer A :	maleic acid	11,6 g/L
	di-sodium EDTA	0,37 g/L
	bovine serum albumin (BSA)	1,0 g/L
	sodium azide	0,2 g/L

Add the maleic acid and EDTA to 800 mL of distilled water and adjust to pH 6,2 with sodium hydroxyde (4 mol/ L).

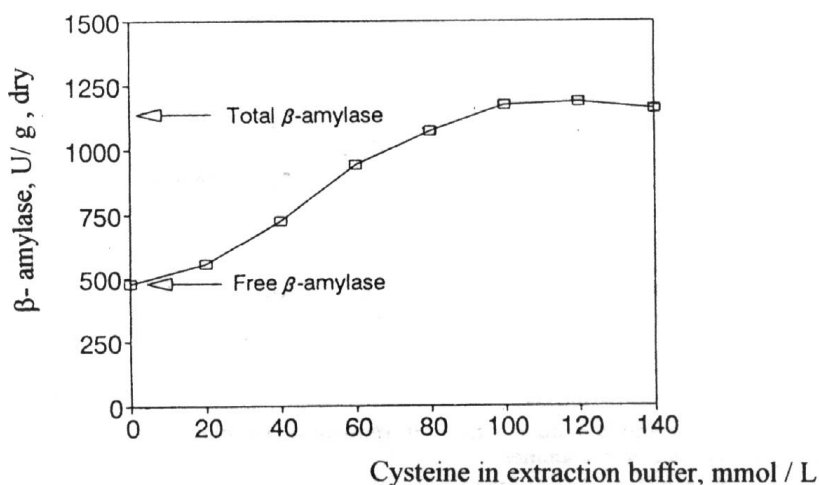
Add the sodium azide, dissolve and readjust the pH to 6,2 if necessary. Adjust the volume to one litre, then add BSA and dissolve. Store at 4°C.

Buffer B : buffer A plus cysteine 0,1 mol/L ;
adjust pH to 6,2.

Stopping reagent : stable at room température for twelve months.

Précautions :

- 1- β -amylase is extremely unstable when highly diluted in buffers not containing other proteins. It is thus essential that bovine serum albumin (BSA) is included in the buffer.
- 2 - If reaction values exceed 0,8 then the enzyme extract should be diluted in buffer A and reassayed.
- 3 - PNPG 5 is resistant to cleavage by cereal α -amylases.
- 4 - Effect of cysteine concentration on β -amylase activity in extracts of barley flour.



DOCUMENT 3 : ISOELECTROFOCALISATION (I.E.F.)

Produits utilisés pour la préparation du gel d'I.E.F.

- acrylamide.
- bisacrylamide,
- solutions d'ampholytes pH 2,5 - 7,0.
- persulfate d'ammonium,
- TEMED.

Composition du gel d'I.E.F.

- 9,7 mL d'eau distillée,
- 2,0 mL de solution d'acrylamide + bisacrylamide
- 300 μ L des solutions d'ampholytes.

ajouter juste avant le coulage des gels

- 50 μ L de persulfate d'ammonium à 1 %,
- 20 μ L de TEMED.

Préparation de l'échantillon

Extraction de la farine de malt vert avec un tampon pH = 5,0 :

- acétate de sodium 50 mmol/L,
- cystéine 2 mmol/L,
- EDTA 0,1 mmol/L.

après dialyse, on obtient l'extrait brut de malt utilisé pour l'électrophorèse.

Isoélectrofocalisation :

- Durée : 3 heures,
- puissance constante : 5 watts,
- température : + 4°C.

Après l'isoélectrofocalisation, le gel est découpé en 3 bandes identiques, utilisées pour effectuer 3 électrophorèses P.A.G.E. Seule la révélation sera menée dans des conditions différentes (voir **document 4**).

DOCUMENT 4 : ELECTROPHORESE P.A.G.E.

Composition du gel d'électrophorèse P.A.G.E.

- acrylamide + bisacrylamide,
- gélatine à 0,1 % (incorporation d'un substrat protéique immobilisé dans le gel),
- persulfate d'ammonium,
- TEMED.

Tampon d'électrophorèse à pH 6,8 : migration pendant 5 heures, à + 4°C ; 10 mA par gel.
3 électrophorèses identiques sont réalisées.

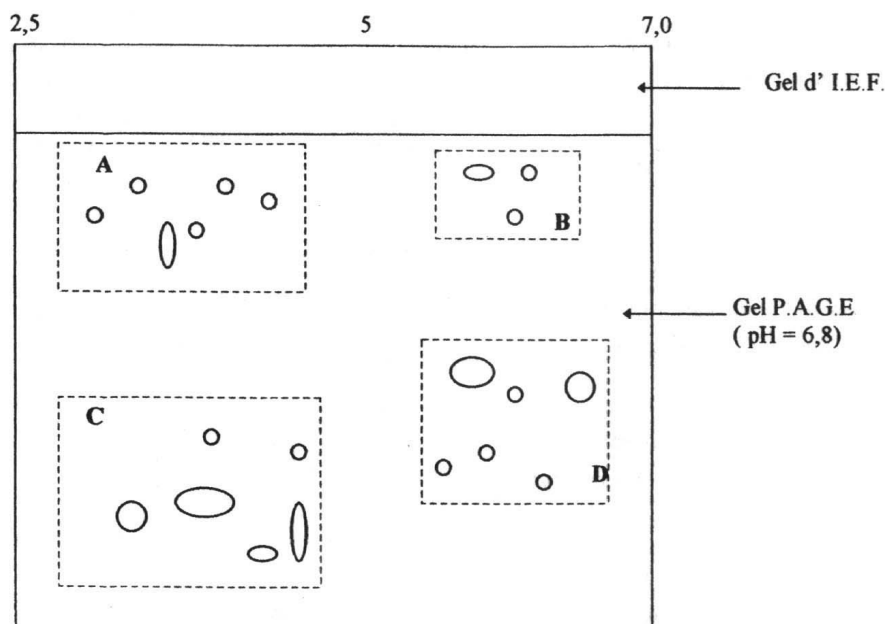
Révélation des endoprotéases :

- incubation. Chacune des électrophorèses est incubée 15 heures à 40°C dans les tampons respectifs suivants, contenant de la cystéine à 2 mol/L :
 - tampon à pH = 3,8 pour le premier gel,
 - tampon à pH = 5,5 pour le deuxième gel,
 - tampon à pH = 7,5 pour le troisième gel ;
- coloration des gels par le noir amido (amido-schwartz) révélateur en bleu des protéines et non des peptides et des acides aminés ;
- décoloration dans des bains de solutions d'acide éthanoïque et d'isopropanol.

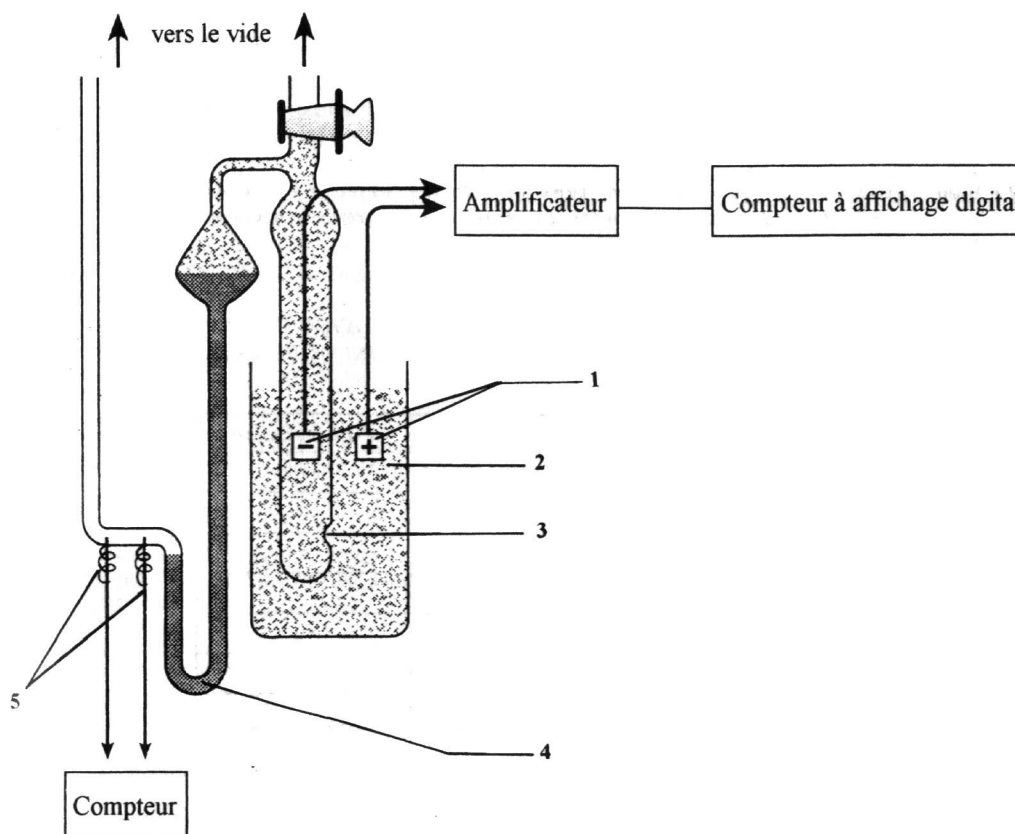
Résultats :

Les spots représentant les activités endoprotéasiques détectées sur les 3 gels, après incubation aux pH respectifs de 3,8, 5,5 et 7,5 en présence de gélatine comme substrat, sont regroupés et présentés sur ce schéma :

pH du gel d' I.E.F.



DOCUMENT 5 : SCHEMA SIMPLIFIE DU COMPTEUR COULTER



DOCUMENT 6 : ETAPES NECESSAIRES A LA MISE EN OEUVRE DE LA TECHNIQUE D'IMMUNOFLUORESCENCE

• Etape n°1 : Obtention du sérum anti *S. cerevisiae* CBS 1171

Celui-ci est obtenu par injection de cellules entières de cette souche de levure à un lapin. Le lapin reçoit chaque semaine environ 10^6 cellules en suspension dans 0,5 mL d'adjuvant de Freund, par injection intramusculaire.

• Etape n°2 : Epuisement du sérum

On épuise le sérum anti *S. cerevisiae* CBS 1171 par une autre souche de production : *S. uvarum* CBS 395. Le sérum est mis en contact avec une suspension de 10^{10} cellules pendant quelques heures à 37°C, puis une nuit à 4°C.

Les cellules sont alors séparées du sérum. L'opération est répétée 3 fois.

• Etape n°3 : Préparation microscopique

- Etalement du levain à examiner sur une lame de microscope, séchage du frottis et fixation à l'alcool.
- Addition du sérum anti *S. cerevisiae* CBS 1171 dilué au 1/10 pendant 30 minutes en atmosphère humide.
- Rinçage au P.B.S. (phosphate buffer saline).
- Addition du sérum anti-immunoglobulines de lapin marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine, dilué au 1/100, pendant 30 minutes.
- Rinçage au P.B.S.
- Action d'une solution de Bleu d'Evans diluée au 1/1000 pendant 30 minutes.
- Rinçage rapide au P.B.S. puis séchage et montage de la préparation à l'aide de glycérine tamponnée pH 7,2.

Le Bleu d'Evans, colorant qui pénètre dans les cellules, émet une fluorescence rouge. L'isothiocyanate de fluorescéine émet une fluorescence verte.

DOCUMENT 7

FLUORESCENCE DE DIVERSES SOUCHES DE LEVURES AVEC LE SERUM ANTI S. CEREVISIAE CBS 1171 EPUISE PAR S. UVARUM CBS 395.

Levures de production	Fluorescence
S. cerevisiae CBS 1171	+++
S. cerevisiae CBS 1395	-
S. cerevisiae M 265	-
S. uvarum CBS 395	-
S. uvarum CBS 382	++
S. uvarum CBS 1513	-

Levures sauvages	Fluorescence
S. diastaticus CBS 1782	-
S. bayanus CBS 1538	-
S. delbruckii CBS 1146	-
Kluyveromyces lactis CBS 683	-
Saccharomycopsis lipolytica CBS 6317	++
Hansenula anomala M 520	-
Schizosaccharomyces octosporus CBS 371	-
Candida guilliermondii CBS 6316	-
Candida tropicalis CBS 94	-
Pichia ohmeri CBS 1950	-

Intensité de fluorescence	
+++	Fluorescence verte fortement positive
++	Fluorescence verte positive
+	Fluorescence verte faible
-	Absence de fluorescence verte