

BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR BIOANALYSES ET CONTRÔLES

Epreuve E3 - Unité U31

Biochimie et technologies d'analyse

Biochimie et technologies d'analyse

BIOANALYSES EN PANIFICATION

Le pain représente une part importante de l'apport glucidique dans la plupart des pays européens. La composition de la farine et la panification font l'objet d'analyses et de contrôles de façon à obtenir un pain de qualité. La panification correspond à l'ensemble des processus mécaniques (pétrissage), thermiques (cuisson et refroidissement), biochimiques et microbiologiques (notamment hydrolyse de l'amidon, fermentations) mis en jeu.

D'autre part, l'urgence des problèmes sanitaires liés à l'alimentation conduit l'industrie pharmaceutique à mettre au point des médicaments visant à réguler l'absorption des glucides, en particulier pour les diabétiques.

1 - Analyse de la farine. (26 points)

L'élaboration des farines occupe aujourd'hui une place importante dans l'industrie céréalière. Le choix d'une farine repose sur des analyses quantitatives et qualitatives de sa composition.

1.1- Détermination du taux de cendres. (3 points)

La classification des farines repose sur leur taux de cendres (document 1a). Le protocole de détermination de ce taux est présenté dans le document 1b.

1.1.1- A quoi correspondent les cendres ?

1.1.2- Sachant que $m_0 = 3,150$ g et $m_1 = 0,014$ g, déterminer le taux de cendre de la farine analysée.

Cette farine est-elle utilisable pour la fabrication de pains ordinaires ?

Donnée : Humidité de la farine $H = 15,5$ % (m/m).

1.2- Détermination de la teneur en protéines. (5,5 points)

La teneur en protéines des farines est évaluée par dosage de l'azote total par la méthode de Kjeldahl. Le protocole est résumé dans le document 2.

1.2.1- Calculer la masse approximative de farine à peser.

Effectuer le calcul en fixant une masse d'azote présente dans la prise d'essai répondant aux exigences du protocole.

1.2.2- Écrire les équations des réactions mises en jeu.

Établir la formule littérale donnant la masse m_N d'azote en grammes contenu dans m grammes de farine en fonction de V_D et V_i .

1.2.4- En déduire la formule littérale donnant la teneur en protéines de la farine analysée en g pour 100 g de matière sèche en fonction de $m(g)$, V_0 (mL), V_1 (mL) et H (humidité, % m/m).

Données : $M_N = 14$ g.mol⁻¹

Le taux de protéines de la farine analysée est d'environ 10 % (en masse de l'extrait sec). Humidité de la farine $H = 15,5$ % (m/m). La teneur en azote des protéines de la farine est de 17,5 % (m/m).

1.3 - Analyse des protéines de la farine. (17,5 points)

La méthode de référence permettant de séparer les protéines de la farine après extraction est l'électrophorèse bidimensionnelle en gel polyacrylamide. Elle combine une isoélectrofocalisation et une électrophorèse en présence de sodium dodécyl sulfate, SDS (document 3).

Un électrophorégramme est présenté dans le document 4.

1.3.1- Isoélectrofocalisation (IEF).

1.3.1.1- Indiquer la propriété physico-chimique des ampholites ainsi que leur rôle.

1.3.1.2- Quel est le critère de séparation des protéines par cette méthode ? Expliquer brièvement le principe.

Coefficient : 3

1.3.2- Électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS PAGE).

La composition du tampon d'équilibration préparant le gel d'IEF à la séparation en SDS PAGE est décrite dans le **document 3**. Le dithiothréitol peut être remplacé par le β mercaptoéthanol.

1.3.2.1- Indiquer le rôle de l'urée et du dithiothréitol en précisant leur mode d'action respectif.

1.3.2.2- Quels sont les rôles du SDS dans cette étape de l'expérience ? Justifier en indiquant ses propriétés physico-chimiques de la molécule et son mode d'action.

Préciser le critère de séparation des protéines lors de cette seconde migration.

1.3.2.3 - Identifier tes électrodes 1 et 2 (**document 4**). Justifier.

1.3.2.4- La composition de plusieurs gels de polyacrylamide (1 à 4) est décrite dans le **document 3**. Préciser les rôles respectifs de l'acrylamide et du bis-acrylamide.

1.3.2.5- Un premier essai avec le gel 3 indique une migration verticale insuffisante des protéines. Quel(s) autre(s) gel(s) doit-on tester pour améliorer la séparation ? Justifier.

1.3.3- Analyse des résultats.

Trois groupes de protéines A, B, C, ont été identifiés comme correspondant à des sous-unités de la gluténine (**document 4**).

Une gluténine fonctionnelle est constituée d'un assemblage de sous-unités de haut poids moléculaire (HMW glutenins subunits ou HMW-GS) et de sous-unités de faible poids moléculaire (LMW glutenins subunits ou LMW-GS).

1.3.3.1- Identifier le groupe des HMW-GS. Justifier.

1.3.3.2- Caractériser les deux autres groupes à partir de leur situation sur l'électrophorégramme.

1.3.4- Structure d'une LMW-GS.

Le **document 5** représente une partie d'une « LMW glutenin subunit ».

1.3.4.1- Quel motif structural secondaire paraît sur cette molécule ? Indiquer les liaisons qui le stabilisent et les groupements impliqués.

Avec les gliadines, les gluténines forment dans la pâte à pain un **réseau visco-élastique** appelé gluten.

Lors du pétrissage de la farine, on ajoute parfois des agents réducteurs afin de diminuer l'élasticité de la pâte.

1.3.4.2- Interpréter cette démarche en indiquant la cible de ces agents réducteurs.

2 - Dégradation de l'amidon et fermentation panaire. (34 points)

2.1- Structure de l'amidon et de ses produits d'hydrolyse. (4,5 points)

L'amidon est formé de 2 constituants : l'amylose (5 à 30 %) et l'amylopectine (70 à 95 %). L'amylose est un polymère non ramifié de résidus de D-glucose unis par des liaisons α (1 \rightarrow 4). L'amylopectine correspond à de l'amylose ramifiée. Les ramifications correspondent à des résidus d'isomaltose : α -D glucopyranosyl (1 \rightarrow 6) D-glucopyranose.

2.1.1- Écrire la structure développée de l'amylopectine en représentant un branchement.

Lors de la panification l'amidon est dégradé en présence d'amylases ou diastases : α -amylases et β -amylases.

Les α -amylases catalysent l'hydrolyse au hasard des liaisons α (1 \rightarrow 4).

Les β -amylases catalysent l'hydrolyse des chaînes d'amidon à partir de leur extrémité non réductrice et libèrent du β -maltose : α -D-glucopyranosyl (1 \rightarrow 4) β -D-glucopyranose.

- 2.1.2- Écrire la réaction catalysée par les (3-amyloses (formules chimiques exigées).
2.1.3- L'hydrolyse de l'amidon peut être quantifiée par mesure du pouvoir réducteur. Interpréter cette observation.

2.2- Dosage de l' α -amylase d'une farine. (6 points)

2.2.1- Analyse du protocole (document 6).

- 2.2.1.1- Quel est le principe de la méthode de dosage proposée ?
2.2.1.2- Quel est le rôle du Trizma® Base ?
2.2.1.3- Indiquer avec précision la préparation du « blanc α -amylase ».

2.2.2- Résultats.

- 2.2.2.1- Sachant que l'absorbance mesurée à 410 nm est de 0,748, calculer la concentration d'activité catalytique. du surnageant (U.mL⁻¹).
2.2.2.2- Sachant que le volume de surnageant obtenu après extraction est de 4,9 mL, calculer l'activité α -amylasique de la farine analysée en U.g⁻¹ de farine.

Données : Une unité d' α -amylase (U) provoque la libération d'une micromole de nitro-4-phénol par minute dans les conditions de l'expérience.

Absorbance linéique molaire du 4-nitrophénol dans les conditions de lecture
 $\epsilon = 17,8 \cdot 10^3 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$.

2.3- Caractérisation d'un inhibiteur des α -amylases. (7,5 points)

L'acarbose est un inhibiteur de l' α -amylase conçu en vue d'une régulation de l'absorption intestinale du glucose.

Afin de préciser l'influence de l'acarbose sur l' α -amylase, une série d'études cinétiques a été réalisée. Pour faciliter les mesures, on a utilisé le substrat synthétique rDP18 (document 7).

2.3.1 - Détermination du type d'inhibition (document 7a).

- 2.3.1.1- Comment évoluent les paramètres cinétiques K_M et V_{\max} de l'enzyme en présence d'inhibiteur ? A quel type d'inhibition assiste-t-on ?
2.3.1.2- Sur quelle(s) forme(s) de l'enzyme l'inhibiteur se fixe-t-il ? Proposer un schéma montrant ce type d'inhibition.

2.3.2 - Détermination de la constante d'inhibition K_i (document 7b).

La représentation secondaire des ordonnées à l'origine ($1 / V_{\max}$ apparents ou $1 / V_{\max}$ app.) en fonction des concentrations en inhibiteur est une droite,

- 2.3.2.1- Établir la relation entre $1 / V_{\max}$ app et $[I]$.

Donnée : On appelle F_i le facteur d'inhibition. C'est le facteur par lequel $1 / V_{\max}$ est multiplié pour obtenir $1 / V_{\max}$ app.

$$F_i = 1 + \frac{[I]}{K_i}$$

- 2.3.2.2- Déterminer graphiquement la valeur approximative de la constante d'inhibition K_i de l' α -amylase par l'acarbose. Justifier.

2.4 - La fermentation panaire. (16 points)

La levure *Saccharomyces cerevisiae* fermente d'abord les glucides libres de la farine (glucose et saccharose) pendant que la β -amylase libère notamment du maltose, lui-même substrat pour la fermentation alcoolique.

2.4.1 - La fermentation alcoolique.

- 2.4.1.1- Compléter le document 8.

- 2.4.1.2-** Donner le nom et la formule semi-développée des composés A, B et C.
Identifier les composés D, E et F.
Quel est le composé produit lors de la fermentation alcoolique à l'origine de la levée de la pâte à pain ?
- 2.4.1.3-** Écrire la réaction bilan du catabolisme du glucose par fermentation alcoolique.

La variation d'enthalpie libre standard ($\Delta G_0'$) de la réaction de fermentation alcoolique à partir du glucose est de - 166 kJ.mol⁻¹.

- 2.4.1.4-** Calculer le rendement énergétique de la fermentation du glucose en éthanol.

Donnée : Variation d'enthalpie libre standard d'hydrolyse de l'ATP $\Delta G_0' = - 30,2$ kJ.mol⁻¹.

2.4.2- Oxydation aérobie du glucose.

La production industrielle de *Saccharomyces cerevisise* se fait en atmosphère aérobie.

- 2.4.2.1-** A l'aide du document 9, établir le bilan moléculaire de l'oxydation aérobie du glucose.
- 2.4.2.2-** Faire le bilan énergétique de l'oxydation aérobie du glucose.
- 2.4.2.3-** Comparer le bilan avec celui de la fermentation alcoolique.
Conclure sur l'intérêt de produire *Sacc/raromyces cerevisiae* en conditions aérobies.

DOCUMENT 1 :

DOCUMENT 1a : CLASSIFICATION DES FARINES PAR TYPES

Les grands types de farine sont définis en fonction du taux de cendres contenu dans 100 g de matière sèche. Le taux d'extraction mesure la quantité de farine obtenue à partir du blé (kg de farine pour 100 kg de blé).

Types	Taux de cendres {% massique)*	Taux moyen d'extraction	Utilisation
45	Moins de 0,50	67	Pâtisserie
55	de 0,50 à 0,60 ~	75	Pain ordinaire
65	de 0,62 à 0,75	78	Pains spéciaux
80	de 0,75 à 0,90	80-85	Pains spéciaux
110	de 1,00 à 1,20	85-90	Pain bis
150	plus de 1 ,40	90-98	Pain complet

par rapport à la matière sèche.

DOCUMENT 1b : PROTOCOLE DE DÉTERMINATION DU TAUX DE CENDRES

(d'après la norme AFNOR v03-720)

Définition du taux de cendres : Résidu obtenu après incinération à 900°C dans les conditions ci-dessous et exprimé en % en masse par rapport à la matière sèche.

Protocole :

- 1) Dans une nacelle à incinération préalablement chauffée à 900°C, refroidie en dessiccateur et tarée, peser à 10 mg près une masse m_0 de 2 à 6 g de l'échantillon selon le taux de cendres présumé.
- 2) Effectuer l'incinération dans le four à 900°C \pm 25°C.
- 3) Quand l'incinération est terminée, retirer la nacelle du four. Après refroidissement au dessiccateur, peser le résidu d'incinération. Soit m_1 la masse pesée.

DOCUMENT 2:

DOSAGE DE L'AZOTE TOTAL DE LA FARINE PAR LA MÉTHODE DE KJELDAHL (d'après la norme AFNOR V03-750)

Protocole :

Prise d'essai

Peser à 0,001 g près une masse m (g) de farine choisie en fonction de la teneur présumé en azote, de façon que la prise d'essai contienne entre 0,005 et 0,02 g d'azote.

Minéralisation

Dans le matras de Kjeldahl contenant la prise d'essai, introduire :

> 10 mL d'acide sulfurique concentré ;

> une pointe de spatule de catalyseur ;

Chauffer jusqu'à décoloration puis transvaser quantitativement le contenu du matras dans un ballon à distiller.

Distillation et dosage

En présence de phénolphtaléine, ajouter de la lessive de soude jusqu'au virage de l'indicateur.

Distiller et recueillir le distillât dans 20 mL d'acide borique contenant un indicateur de fin de réaction.

Doser par une solution d'acide sulfurique titrée à $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$. Soit V , le volume (mL) d'acide sulfurique versé.

Essai à blanc

Effectuer un essai à blanc dans les mêmes conditions, Soit V_0 le volume (mL) d'acide sulfurique versé.

DOCUMENT 3 : EXTRACTION ET SÉPARATION DES PROTÉINES DE LA FARINE PAR ELECTROPHORÈSE EN 2 DIMENSIONS

Étape 1 : Extraction des protéines de la farine

- 1) Peser 50 mg de farine dans un tube à centrifuger de 1,5 ml.
- 2) Ajouter 1 ml de tampon d'extraction au borate de sodium.
- 3) Incuber à 37°C sous agitation pendant au moins 2 heures.
- 4) Centrifuger à température ambiante pendant 15 minutes.
- 5) Transférer le surnageant dans un nouveau tube. Cette solution peut être utilisée directement pour une analyse des protéines totales de la farine.

Étape 2 : Isoélectrofocaiisation (IEF. première dimension)

Composition du gel d'IEF

- > 9,7 mL d'eau distillée ;
- > 2,0 mL de solution acylamide/bisacrylamide ;
- > 300 (il de solution d'ampholytes pH 3,5 - 9 ;
- > 50 µL de persulfate d'ammonium (APS) à 1 % ;
- > 20 µL de TEMED.

Migration

- > Durée : 3 heures
- > Puissance constante : 5 watts
- > Température ambiante

Une bande du gel est découpée pour effectuer l'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS.

Étape 3 : Electrophorèse (PAGE) en présence de SDS (seconde dimension)

1) Équilibration du gel d'IEF pour l'électrophorèse en présence de SDS

La bande du gel d'IEF est placée dans le tampon d'équilibration sous agitation lente pendant 10 minutes.

Composition du tampon d'équilibration :

- > Urée à 6 mol.L⁻¹ ;
- > Tris pH 8,8 à 0,375 mol.L⁻¹ ;
- > SDS à 2 % ;
- > Glycérol à 20 % ;
- > Dithiothréitol (DTT) à 2 % .

2) Préparation du gel de polyacrylamide

Tampon de migration (utilisé pour la préparation des gels et pour la migration)

- > 18,17 g Tris-base;
- > 2 mL SDS 20 % ;
- > Ajuster le pH à 8,8 avec du MC112 mol.L⁻¹
- > Compléter le volume à 100mL

DOCUMENT 3 (SUITE):

Composition du gel de polyacrylamide

Les gels sont préparés à partir d'une solution mère d'acrylamide 30% / bis-acrylamide 0,8% afin de limiter les manipulations de ces produits neurotoxiques.

	Gel 1	Gel 2	Gel 3	Gel 4
H2O	8,5 mL	7,3 mL	6,2 mL	5 mL
Acrylamide 30% / Bis-Acrylamide 0,8%	2,5 mL	3,7 mL	4,8 mL	6 mL
Tampon de migration	3,8 mL	3,8 mL	3,8 mL	3,8 mL
Persulfate d'ammonium 10%	224 µL	224 µL	224 µL	224 µL
TEMED	10 µl	10 µL	10 µL	10 µL

3) Migration

Tampon de migration : voir 2) : préparation du gel

Durée : 1h

Puissance : 50 Watts

Etape 4 : Révélation

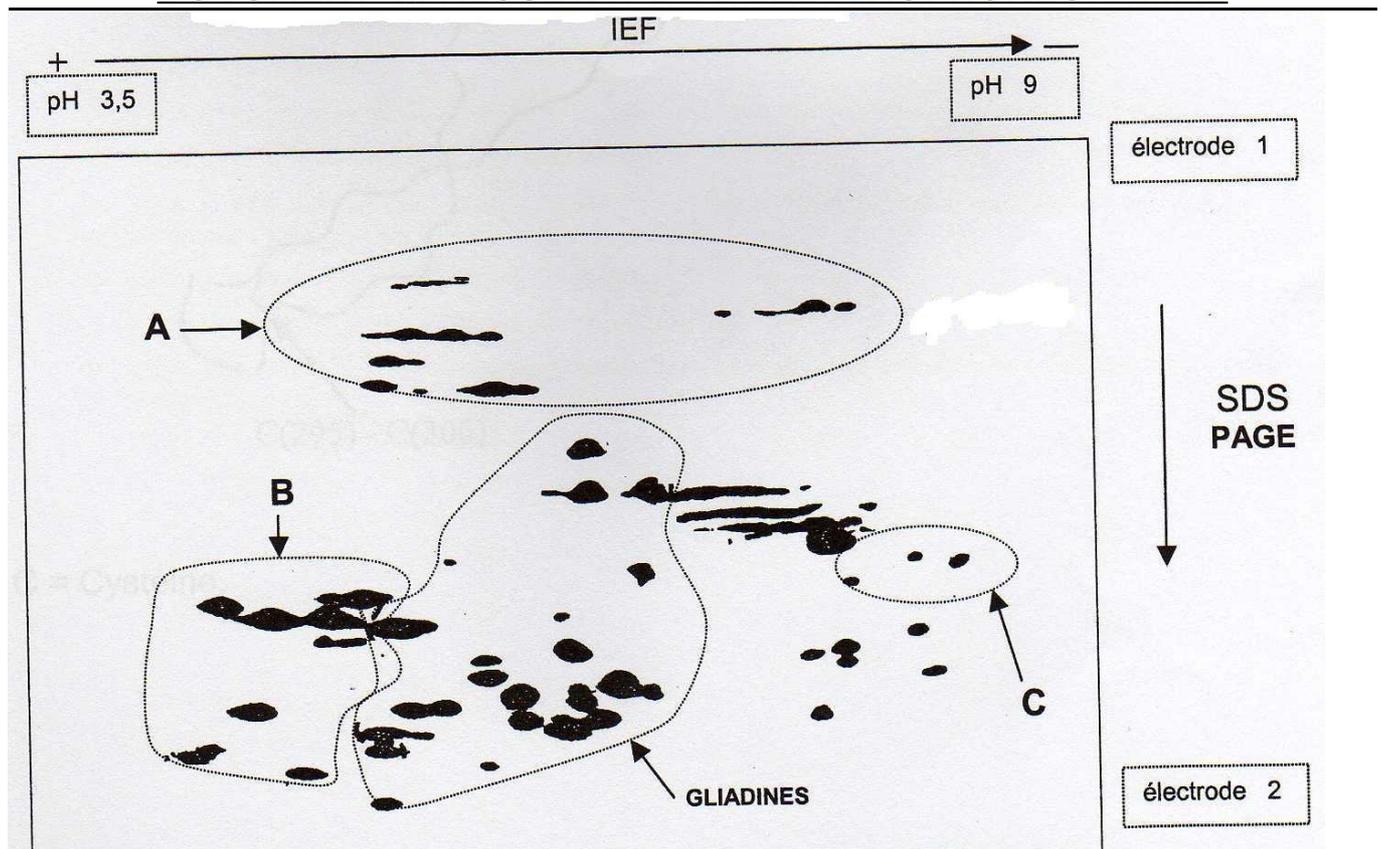
Coloration

Le gel est coloré dans un mélange méthanol/acide acétique/eau (40 :10 :50) à 0,1 % de bleu de Coomassie Brillant R-250.

Décoloration

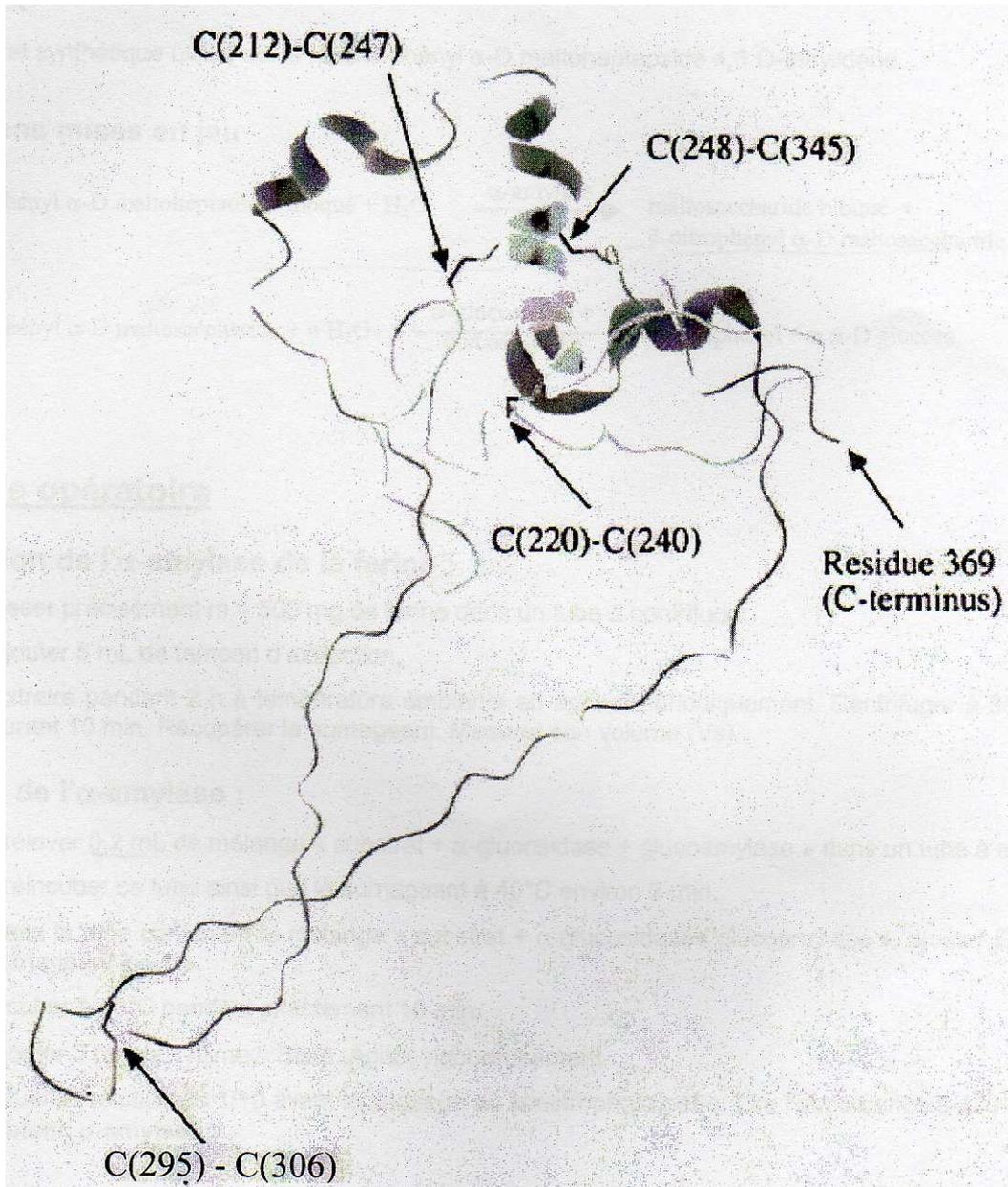
Le gel est lavé à l'acide acétique à 15 % pour éliminer le colorant non lié.

DOCUMENT 4 : RÉSULTAT DE L'ELECTROPHORÉGRAMME



DOCUMENT 5 :
STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE D'UNE SOUS-UNITÉ LÉGÈRE
D'UNE GLUTENINE (LMW-GS)

(d'après S. Masci et coll., Plant Physiol., 1981; 118 (4), 1147-1158.)



C = Cystéine

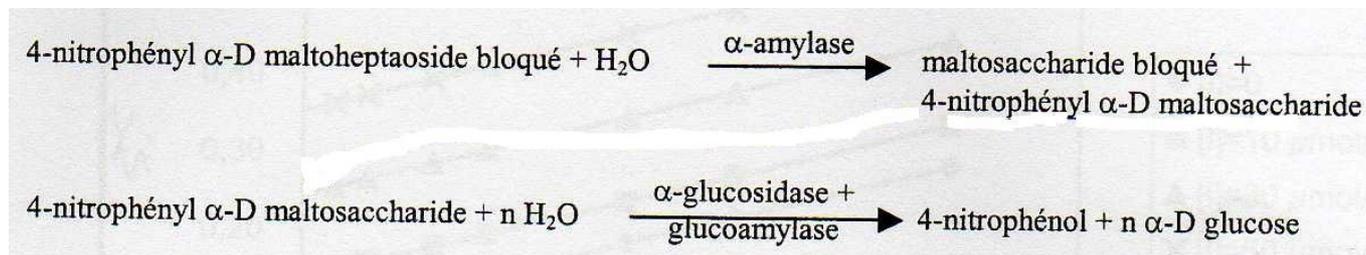
DOCUMENT 6 : DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ α -AMYLASIQUE D'UNE FARINE

Principe

Substrat

Le substrat synthétique utilisé est le nitro-4-phényl α -D maltoheptaoside 4,6 O-éthylidène.

Réactions mises en jeu



Protocole opératoire

Extraction de l' α -amylase de la farine :

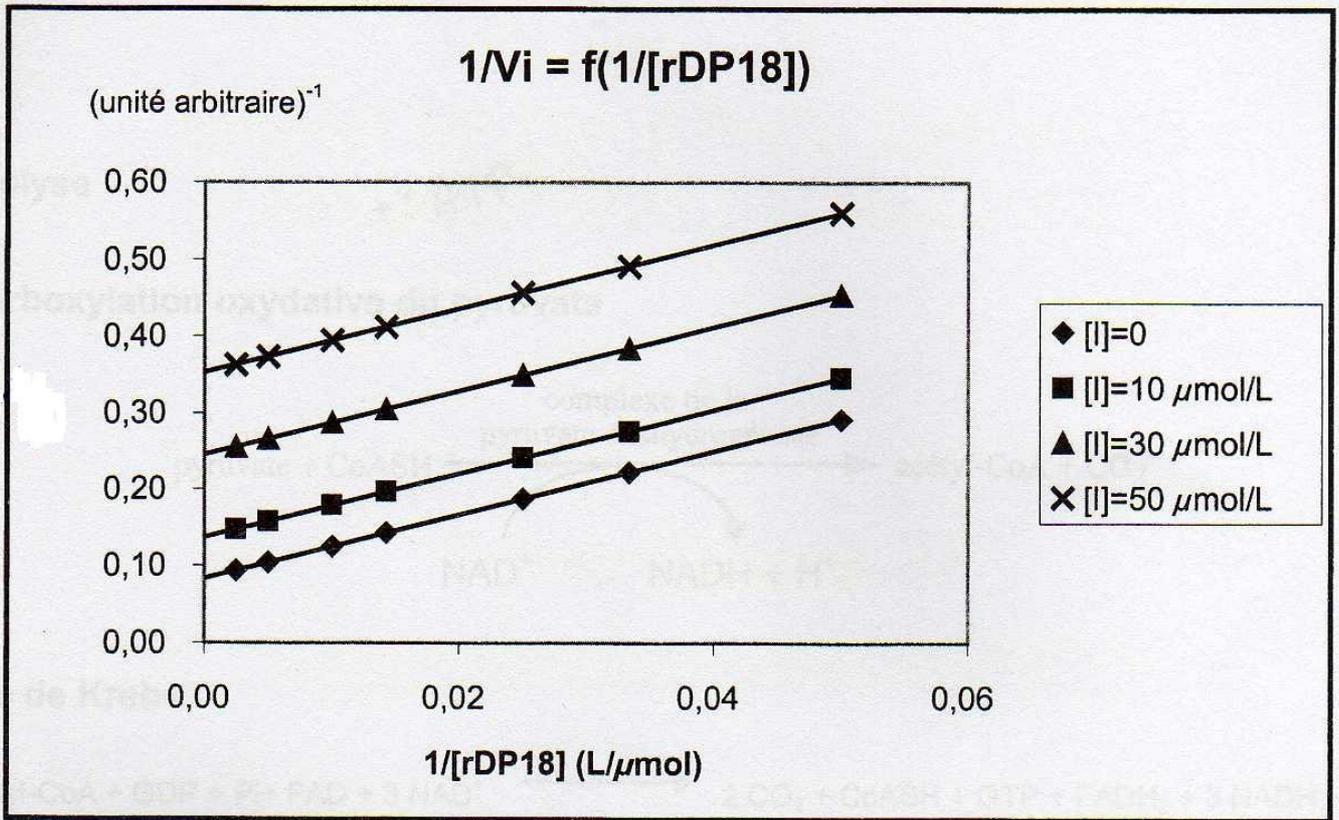
- > Peser précisément m = 500 mg de farine dans un tube à centrifuger.
- > Ajouter 5 mL de tampon d'extraction.
- > Extraire pendant 2 h à température ambiante en agitant périodiquement. Centrifuger à 3000 tours/min durant 10 min. Récupérer le surnageant. Mesurer son volume (Vs).

Dosage de l' α -amylase :

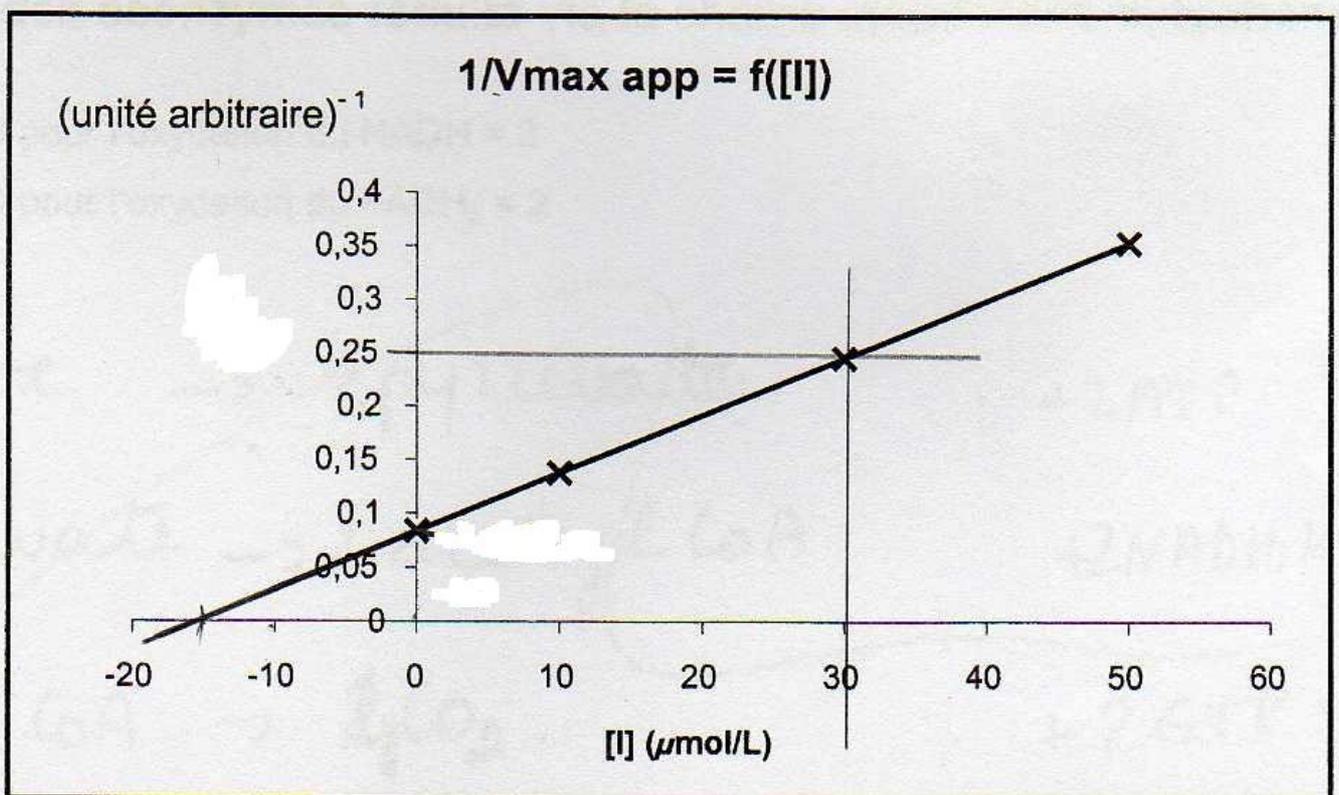
- > Prélever Q,2 ml de mélange « substrat + α -glucosidase + glucoamylase » dans un tube à essai.
- > Préincuber ce tube ainsi que le surnageant à 40°C environ 2 min.
- > Dans le tube contenant le mélange « substrat + α -glucosidase + glucoamylase », ajouter E = 0,2 mL du surnageant incubé.
- > Incuber à 40°C pendant exactement 10 min.
- > Ajouter 3 mL de Trizma® Base. Agiter vigoureusement.
- > Diluer la solution au 1/10 avant le passage au spectrophotomètre. Lire l'absorbance à 410 nm contre un « blanc α -amylase ».

DOCUMENT 7:

DOCUMENT 7a : INHIBITION DE L'ACTIVITÉ AMYLASIQUE PAR L'ACARBOSE



DOCUMENT 7b:

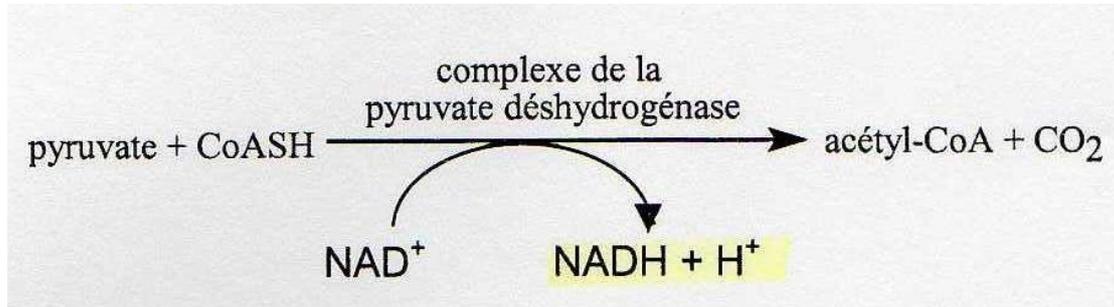


DOCUMENT 9 :

ÉTAPES DE L'OXYDATION AÉROBIE DU GLUCOSE PAR SACCHAROMYCES CEREVISIAE

1) Glycolyse

2) Décarboxylation oxydative du pyruvate



3) Cycle de Krebs



4) Réoxydation des coenzymes réduits via la chaîne respiratoire mitochondriale

- Rapport P/O pour l'oxydation du NADH = 3
- Rapport P/O pour l'oxydation du FADH₂ = 2