

BACCALAURÉAT TECHNOLOGIQUE

Série : Sciences et Technologies de Laboratoire

Spécialité : Biotechnologies

SESSION 2013

Sous-épreuve écrite de Biotechnologies

Coefficient de la sous-épreuve : 4

Ce sujet est prévu pour être traité en deux heures.

Ce sujet sera traité par les candidats
**ayant présenté les épreuves terminales du baccalauréat
lors d'une session précédente (programme limitatif).**

**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.

PRODUCTION ET CONTRÔLE DE LA QUALITÉ D'UN PROBIOTIQUE

Les probiotiques sont des micro-organismes vivants ajoutés comme compléments dans certains produits alimentaires. Leur production à grande échelle nécessite une vérification préalable des caractères des souches utilisées, un contrôle de la bonne conduite de la fabrication ainsi qu'une vérification des propriétés du produit fini.

« AZINC Probiotiques[®] » est un produit commercialisé contenant divers probiotiques (*Lactobacillus* et *Bifidobacterium*). Les *Lactobacillus* sont utilisés comme probiotiques car ils excrètent des enzymes, notamment la β -galactosidase ou lactase. Cette enzyme catalyse l'hydrolyse du lactose en D-galactose et D-glucose, facilitant ainsi l'absorption intestinale des produits laitiers.

Les bactéries contenues dans le probiotique sont produites industriellement en bioréacteur avant d'être intégrées au produit fini.

Dans le cadre de la production de son probiotique AZINC, l'industriel réalise plusieurs contrôles de routine, en particulier sur l'espèce *Lactobacillus acidophilus* produit en bioréacteur.

- Avant production de biomasse, l'industriel s'assure que les caractères de la souche à inoculer sont conformes.
- Pendant la production de biomasse, l'industriel contrôle la qualité de la croissance.
- Avant la phase de commercialisation du produit, l'industriel contrôle la quantité de *Lactobacillus acidophilus* présente dans son probiotique à travers la détermination de l'activité de la β -galactosidase.

1. CONTROLE DES CARACTERES DE LA SOUCHE INDUSTRIELLE

Lactobacillus acidophilus est un long bacille (2 à 4 μm), à bouts carrés, groupé par paire ou isolé, Gram positif et catalase négative.

Pour vérifier les caractères de la souche utilisée, une coloration de Gram et un test enzymatique d'orientation sont effectués. L'ensemble des résultats est consigné dans les **documents 1a** et **1b**.

Q1. Vérifier les caractères morphologiques de la souche d'intérêt (groupement, forme, taille, Gram), à l'aide du **document 1a**.

Q2. Vérifier le caractère biochimique de la souche d'intérêt (test enzymatique d'orientation), à l'aide des **documents 1b** et **1c**.

Q3. A l'aide du **document 1d** et grâce à une démarche dichotomique d'identification argumentée, confirmer que le genre bactérien de la souche d'intérêt est *Lactobacillus*.

Après vérification du genre, l'industriel poursuit sa démarche d'identification et ensemence une galerie API 50CH pour vérifier l'espèce. Une partie des résultats obtenus pour la souche testée est fournie dans le **document 1e**.

Q4. Vérifier l'espèce de la souche testée par une démarche d'identification argumentée, à l'aide du **document 1e**. Conclure.

2. MAITRISE DE LA PRODUCTION DE BIOMASSE

Après vérification des caractères de la souche, la phase de multiplication en bioréacteur « Br » peut commencer. Certains paramètres physico-chimiques et bactériologiques sont contrôlés tout au long du processus.

Q5. Dédire du document 2 les paramètres physico-chimiques contrôlables pour optimiser la croissance de la souche au démarrage du bioréacteur.

La courbe de croissance de *Lactobacillus acidophilus* en bioréacteur « Br », dans des conditions physico-chimiques données, est présentée dans le document 3.

Q6. Comparer les deux courbes du document 3 et préciser si la production de biomasse dans le bioréacteur « Br » est satisfaisante.

Q7. Proposer une hypothèse permettant d'expliquer l'évolution de la biomasse de *Lactobacillus acidophilus* dans le bioréacteur « Br ».

Les phages de bactéries lactiques sont redoutés dans l'industrie des probiotiques car ils peuvent anéantir la souche sélectionnée et faire perdre une fabrication. L'industriel doit s'assurer de leur absence totale.

Le dénombrement des bactériophages est réalisé à partir d'un échantillon prélevé dans le bioréacteur « Br », selon le protocole présenté dans le document 4.

Q8. Schématiser les étapes du protocole figurant dans le document 4a.

Q9. Déterminer le nombre d'unités formant plaque par mL d'échantillon ($CN_{(UFP; \text{échantillon})}$) à l'aide du document 4b. Donner une explication quant à l'allure de la courbe de croissance de *Lactobacillus acidophilus* dans le bioréacteur « Br » (document 3).

3. CONTRÔLES AVANT COMMERCIALISATION DU PRODUIT « AZINC PROBIOTIQUES® »

Avant commercialisation, la concentration en *Lactobacillus* dans « AZINC Probiotiques® » doit être vérifiée afin de respecter le critère figurant sur l'étiquetage. Deux méthodes peuvent être utilisées :

- dénombrement dans la masse,
- détermination d'activité enzymatique.

Un extrait de la notice du complément alimentaire « AZINC Probiotiques® » est présenté dans le document 5.

3.1 Contrôle quantitatif bactérien

La conformité du produit fini est évaluée par un dénombrement des bactéries du genre *Lactobacillus* dans la masse ($V_{\text{inoculum}} = 1 \text{ mL}$).

Cette méthode nécessite au préalable la réalisation de dilutions en série. En effet, les boîtes retenues pour le dénombrement doivent contenir au maximum 300 colonies.

Q10. En tenant compte du document 5, déterminer la concentration totale en *Lactobacillus* du complément alimentaire.

A l'aide des informations ci-dessus en déduire les dilutions à retenir pour obtenir un nombre de colonies par boîte exploitable.

3.2 Contrôle de l'activité de la β -galactosidase

Le dosage de l'activité de la β -galactosidase permet de contrôler indirectement la concentration de *Lactobacillus* dans le complément alimentaire.

La suspension de probiotiques initialement trouble est centrifugée. Le dosage est réalisé sur 1 mL de surnageant selon la fiche technique présentée dans le **document 6a**.

Q11. Expliquer la nécessité d'effectuer une centrifugation avant le dosage spectrophotométrique.

Q12. Le **document 6a** précise que le temps d'incubation doit être de « quatre minutes exactement ».

Expliquer en quoi cette précision est nécessaire pour effectuer correctement ce dosage.

Q13. À partir du tableau du **document 6a**, expliquer l'ordre d'introduction des différentes solutions dans le tube T_0 minute par comparaison au tube T_4 minutes.

Q14. Calculer le volume du milieu réactionnel (V_{MR}) et le volume du milieu de lecture (V_{ML}), à l'aide du **document 6a**.

Calculer la variation de concentration molaire en oNP dans le milieu réactionnel en quatre minutes (exprimée en mmol.L^{-1}) en utilisant les indications du tableau du **document 6b** et des données des **documents 6c et 6d**.

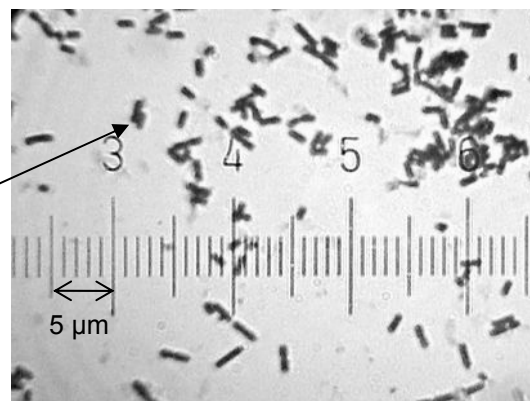
Conclure quant à la conformité du probiotique.

Q15. Rédiger une synthèse rappelant les conditions nécessaires à l'obtention d'un probiotique de qualité satisfaisante.

Document 1 : Contrôle des caractères de la souche industrielle

Document 1a : Observation au microscope optique à l'objectif 100, après coloration de Gram de la souche industrielle à inoculer dans le bioréacteur

Couleur violette



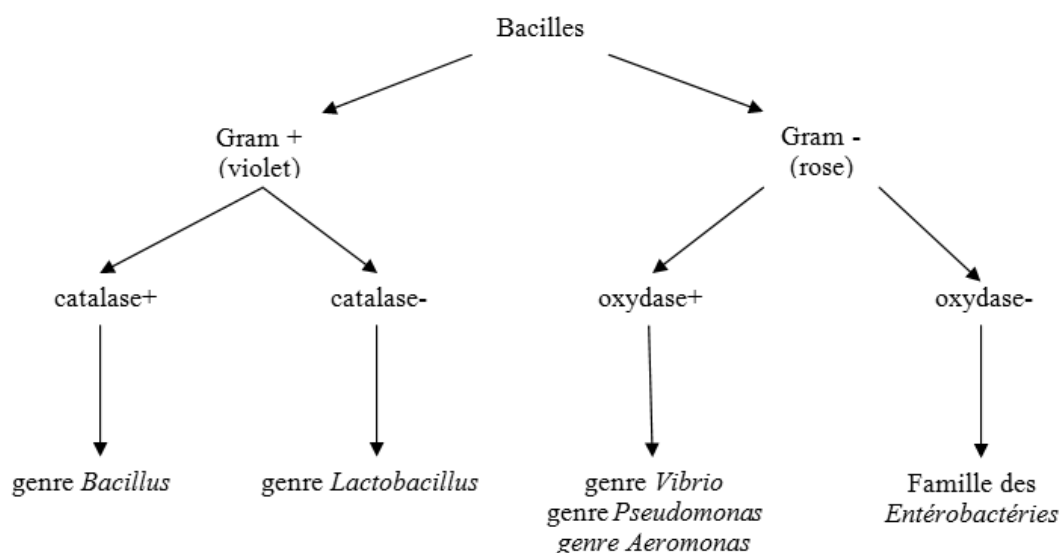
Document 1b : Résultat du test enzymatique d'orientation

Le test de la catalase réalisé sur la souche observée montre une absence de dégagement gazeux.

Document 1c : Test enzymatique réalisé au laboratoire de contrôle : recherche de la catalase

Nom du test enzymatique	Catalase
Substrat	H ₂ O ₂
Produit(s) obtenu(s) si l'enzyme est présente	O ₂ + H ₂ O
Aspect d'un résultat positif	Dégagement gazeux
Aspect d'un résultat négatif	Absence de dégagement gazeux

Document 1d : Propriétés tinctoriales et enzymatiques des principales bactéries aérobies

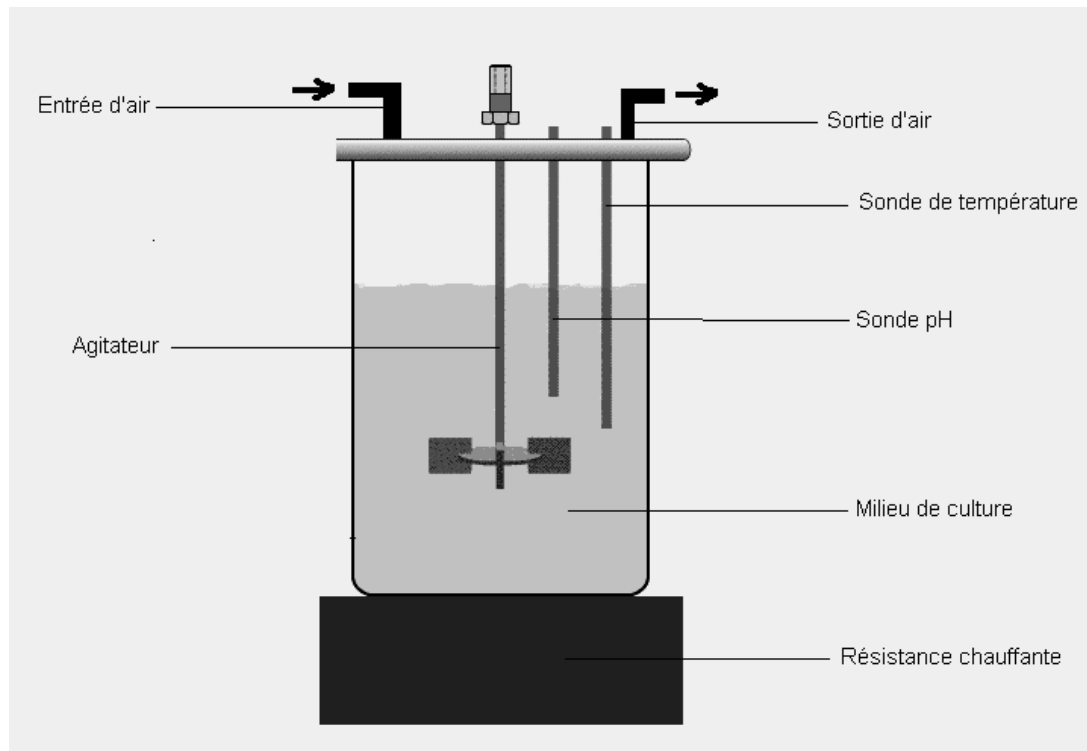


Document 1e : Extrait des résultats d'une galerie API 50CH® ensemencée avec 7 souches différentes

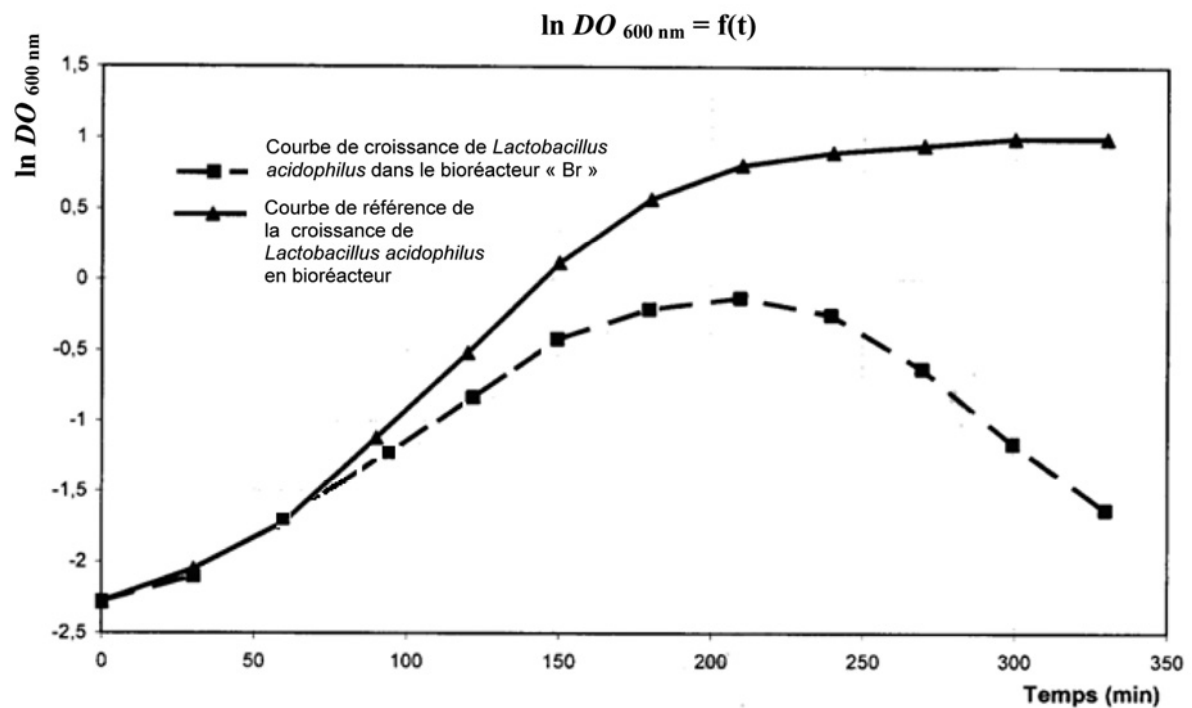
	Glycérol	L-Arabinose	Ribose	Xylose	Galactose	Glucose	Rhamnose	Cellbiose	Gentiobiose
<i>Lactobacillus brevis</i>	-	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	-	-	-	-	+	+	-	+	+
<i>Lactobacillus fermentum</i>	-	+	+	-	+	+	-	-	-
<i>Lactobacillus fructivorans</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Lactobacillus paracasei</i>	-	-	+	-	+	+	-	+	+

Bactérie testée par l'industriel	-	-	-	-	+	+	-	+	+
----------------------------------	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Document 2 : Schéma d'un bioréacteur



Document 3 : Courbes de croissance de *Lactobacillus acidophilus*



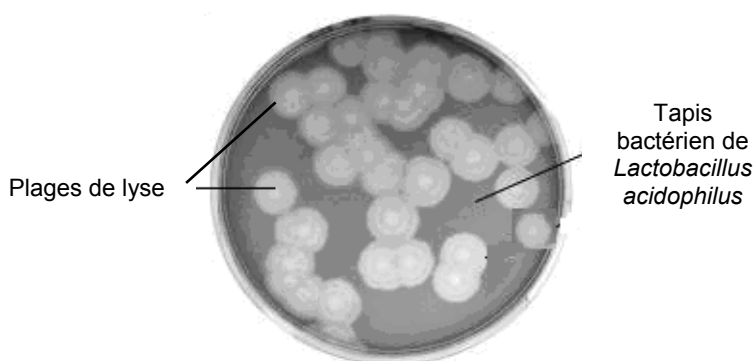
Rappel : Dans le cas présent, la biomasse est la masse de bactéries par litre de culture.

Document 4 : Dénombrement des bactériophages

4a - Protocole :

- Prélever 100 µL d'échantillon dans le bioréacteur « Br »
- Ajouter au prélèvement 100 µL de culture de *Lactobacillus acidophilus*.
- Homogénéiser.
- Laisser 15 minutes à température ambiante.
- Introduire le mélange « échantillon – *Lactobacillus* » dans 15 mL de milieu de culture en surfusion
- Homogénéiser.
- Couler en boîte de Pétri.
- Ajouter une surcouche fine de milieu de culture (5 mL) après prise en masse.
- Incuber les boîtes 24 h à 37°C.

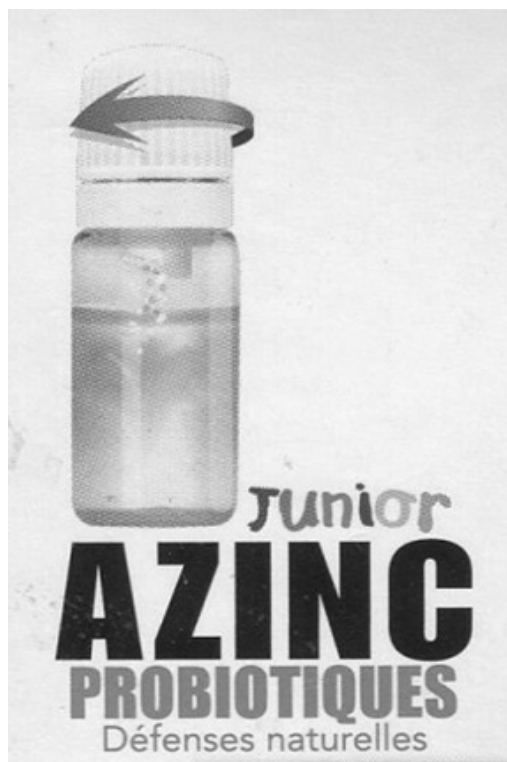
4b - Résultats :



Résultat pour le bioréacteur « Br »

Echantillon	« Br »
Nombre de plages de lyse (UFP)	36

Document 5 : Complément alimentaire : Extrait de notice « AZINC Probiotiques® »



ANALYSE NUTRITIONNELLE MOYENNE

Pour	1 dose = 6 mL
Valeur énergétique	20 kcal
Protéines	Traces
Glucides réducteurs	6 g
Lipides	Traces
Vitamine A	500 µg
Vitamine D3	3,5 µg
Vitamine E	1,8 mg
Vitamine B1	2,5 mg
Vitamine B2	2,9 mg
Vitamine PP	15 mg
Vitamine B5	2,8 mg
Vitamine B6	1 mg
Vitamine B12	2 µg
Vitamine H	32 µg
Vitamine C	47 mg
Probiotiques :	
<i>Bifidobacterium lactis</i>	2.10 ⁹ UFC
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	2.10 ⁹ UFC
<i>Lactobacillus plantarum</i>	2.10 ⁹ UFC
<i>Lactobacillus paracasei</i>	2.10 ⁹ UFC

Document 6 : Dosage de l'activité de la β galactosidase (ou lactase)

6a - Fiche technique :

La détermination de l'activité de la lactase est effectuée en utilisant la réaction d'hydrolyse de l'orthonitrophényl- β -D-galactoside (oNPG) qui conduit à la libération d'orthonitrophénol (oNP) et de D-galactose :



- L'oNP, de couleur jaune, est dosé par spectrophotométrie à 420 nm.
- La solution de Na_2CO_3 permet d'arrêter la réaction enzymatique.

	T_0 minute	T_4 minutes
Solution d'oNPG (mL)	2,0	2,0
Pré-incuber 10 minutes à 30 °C		
Solution de Na_2CO_3 (mL)	1,0	/
Surnageant de probiotique (mL)	1,0	1,0
Homogénéiser et incubé à 30 °C pendant 4 minutes exactement		
Solution de Na_2CO_3 (mL)	/	1,0
Homogénéiser et mesurer les absorbances à 420 nm		

L'absorbance des tubes est lue contre de l'eau distillée.

6b – Indications des absorbances lues sur le spectrophotomètre dans le milieu de lecture :

	Eau distillée	T_0 minute	T_4 minutes
$A_{420\text{nm}}$	0,000	0,055	0,675

6c - Données :

Variation de concentration d'oNP dans le milieu réactionnel en 4 minutes :

$$\Delta C_{4 \text{ min}} (\text{oNP; milieu réactionnel}) = \frac{\Delta A_{4 \text{ min}}}{l \times \epsilon_{\text{oNP}}} \times 10^3 \times \frac{V_{\text{ML}}}{V_{\text{MR}}}$$

Avec $\Delta C_{4 \text{ min}} (\text{oNP, milieu réactionnel})$ en mmol.L^{-1}
 $l = 1 \text{ cm}$ dans les conditions expérimentales
 $\epsilon_{\text{oNP à } 420 \text{ nm}} = 2100 \text{ mol}^{-1}.\text{L.cm}^{-1}$
 V_{ML} = volume du milieu de lecture (mL)
 V_{MR} = volume du milieu réactionnel (mL)

6d - Contrôle de conformité :

Dans les conditions expérimentales utilisées, une activité de β -galactosidase dans le probiotique est jugée conforme si **la variation de concentration mesurée en 4 minutes dans le milieu réactionnel est supérieure à 0,2 mmol.L⁻¹ d'oNP.**