

SESSION 2012

**CAPET
CONCOURS EXTERNE
ET CAFEP**

**Section : BIOTECHNOLOGIES
Option : BIOCHIMIE – GÉNIE BIOLOGIQUE**

**ÉTUDE D'UN SYSTÈME, D'UN PROCÉDÉ
OU D'UNE ORGANISATION**

Durée : 5 heures

L'usage de tout ouvrage de référence, de tout dictionnaire et de tout matériel électronique (y compris la calculatrice) est rigoureusement interdit.

Dans le cas où un(e) candidat(e) repère ce qui lui semble être une erreur d'énoncé, il (elle) le signale très lisiblement sur sa copie, propose la correction et poursuit l'épreuve en conséquence.

De même, si cela vous conduit à formuler une ou plusieurs hypothèses, il vous est demandé de la (ou les) mentionner explicitement.

NB : Hormis l'en-tête détachable, la copie que vous rendrez ne devra, conformément au principe d'anonymat, comporter aucun signe distinctif, tel que nom, signature, origine, etc. Si le travail qui vous est demandé comporte notamment la rédaction d'un projet ou d'une note, vous devrez impérativement vous abstenir de signer ou de l'identifier.

Tournez la page S.V.P.

A

Etude de la fabrication d'un yaourt brassé contenant des fruits

Les yaourts sont des laits fermentés traditionnellement fabriqués dans différents pays du Proche et Moyen Orient et notamment en Turquie, puis introduits en Europe à l'époque de François Premier.

La France produit en 2010 plus de 1,4 millions de tonnes de yaourts et autres laits fermentés, ce qui correspond à 5% de sa production laitière et 55 % des produits dits «ultra-frais». La fabrication industrielle du yaourt a pour objectif principal de permettre la formation d'un gel lactique stable et reproductible.

L'introduction de fruits dans les préparations rend souvent nécessaire l'emploi d'agent texturant pour stabiliser le produit. Ce sont essentiellement des polymères glucidiques principalement d'origine végétale mais des molécules bactériennes telles que le xanthane peuvent également être utilisées.

Le xanthane est un additif utilisé dans les industries agro-alimentaire, pharmaceutique, cosmétique ainsi que dans l'industrie chimique. Il a reçu l'habilitation GRAS (Generally regarded as safe) aux Etats-Unis et est conforme au Règlement européen du 16/12/08.

En utilisant les documents fournis :

- développer les différents aspects biochimiques et microbiologiques aboutissant à la formation du gel lactique ;
- dégager l'intérêt des principales étapes de la fabrication industrielle d'un yaourt brassé sur fruits ;
- expliciter l'opération unitaire de pasteurisation ;
- justifier l'utilisation de la gomme xanthane et expliquer un des modes de production et de purification de cette molécule présentés dans l'article de recherche ;
- préciser vers quelle solution technologique on peut s'orienter pour améliorer ce procédé ;
- indiquer les contrôles microbiologiques et physico-chimiques pertinents à mettre en œuvre sur les matières premières, en cours de fabrication, et sur le produit fini, pour chacun d'eux, donner le principe de la méthode.

Document 1**Extraits du décret n°88-1203 du 30 décembre 1988 relatif aux laits fermentés et au yaourt ou yoghourt****NOR : ECOC8800150D Version consolidée au 03 avril 1997**

(…)

Article 1

La dénomination "lait fermenté" est réservée au produit laitier préparé avec des laits écrémés ou non ou des laits concentrés ou en poudre écrémés ou non, enrichis ou non de constituants du lait, ayant subi un traitement thermique au moins équivalent à la pasteurisation,ensemencés avec des microorganismes appartenant à l'espèce ou aux espèces caractéristiques de chaque produit.

La coagulation des laits fermentés ne doit pas être obtenue par d'autres moyens que ceux qui résultent de l'activité des microorganismes utilisés.

La quantité d'acide lactique libre qu'ils contiennent ne doit pas être inférieure à 0,6 gramme pour 100 grammes lors de la vente au consommateur et la teneur en matière protéique rapportée à la partie lactée ne doit pas être inférieure à celle d'un lait normal.

Les laits fermentés doivent être maintenus jusqu'à la vente au consommateur à une température susceptible d'éviter leur altération et qui sera fixée par arrêté conjoint des ministres chargés de l'agriculture, de la santé et de la consommation.

Article 2

La dénomination "yaourt" ou "yoghourt" est réservée au lait fermenté obtenu, selon les usages loyaux et constants, par le développement des seules bactéries lactiques thermophiles spécifiques dites *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*, qui doivent être ensemencées simultanément et se trouver vivantes dans le produit fini, à raison d'au moins 10 millions de bactéries par gramme rapportées à la partie lactée.

La quantité d'acide lactique libre contenue dans le yaourt ou yoghourt ne doit pas être inférieure à 0,7 gramme pour 100 grammes lors de la vente au consommateur.

Article 3

Les laits fermentés peuvent être additionnés des produits suivants : extraits d'arômes, arômes naturels ainsi que, dans la limite de 30 p. 100 en poids du produit fini, sucres et autres denrées alimentaires conférant une saveur spécifique.

L'incorporation en tant que produits de substitution de matières grasses et protéiques d'origine non laitière est interdite.

Ils ne doivent subir aucun traitement permettant de soustraire un élément constitutif du lait mis en oeuvre, notamment l'égouttage du coagulum.

(…)

Document 2

Extrait de la norme AFNOR NF V 04-600 (2001)

Selon la norme AFNOR NF V 04-600 (2001), pour des laits fermentés dits « probiotiques », c'est-à-dire contenant des bactéries d'origine intestinale comme *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Bifidobacterium bifidum* et *Lactobacillus casei*, que la teneur en cette flore spécifique doit être supérieure ou égale à 1 million de bactéries vivantes par gramme de produit.

Document 3

Composition du lait de vache entier

(« Biochimie alimentaire » Alais-Linden-Miclo. Editions Dunod)

	Composition (g/L)	Etat physique des composants
Eau	905	Eau libre (solvant) plus eau liée (3,7%)
Glucides (lactose)	49	Solution
Lipides	35	Emulsion de globules gras (3 à 5 µm)
Matière grasse proprement dite	34	
Lécithine (phospholipides)	0,5	
Insaponifiables (stérols, carotènes, tocophérols)	0,5	
Protides	34	Suspension micellaire phosphocaséinate de calcium (0,08 à 0,12 µm) Solution colloïdale Solution vraie
Caséine	27	
Protéines « solubles » (globulines, albumines)	2,5	
Substances azotées non protéiques	1,5	
Sels	9	Solution ou état colloïdal
De l'acide citrique	2	
De l'acide phosphorique	2,6	
De l'acide chlorhydrique	1,7	
Constituants divers (vitamines, enzymes, gaz dissous)	Traces	
Acide lactique	1,6	
Extrait sec total	127	
Extrait sec non gras	92	

Document 4

Compositions de différents types de yaourts

Composition globale de 100 g de yaourt nature

	Valeur énergétique		Matière sèche g	Protéines (N x 6,38) g	Lipides g	Glucides exprimés en monosacch. g	Acide lactique g
	kJ	kcal					
Yaourt nature au lait entier	297	71	14,3 (23) 12,1-17,1	4,2 (5) 3,8-4,5	3,5 (23) 2,6-4,1	5 3,6-5,6	1 0,8-1,0
Fiches techniques des fabricants	268-293	64-70		3,8-4,5	3,2-3,8	4,3-5,6	
Tables et publications . . .	251-314	60-75	12,1-18,9	3,3-5,0	3,1-4,1	4,5-4,9	0,7-1,0
Yaourt nature (au lait partiellement écrémé)	213	50	12,3 (31) 10,5-12,9	4,3 (5) 4,1-4,5	1,2 (31) 0,8-1,4	5 4-6,3	1 0,8-1,1
Fiches techniques des fabricants	185-218	44-52		4,1-4,5	0,9-1,2	4,3-6,1	0,8-1
Tables et publications . . .	188-265	45-63	10-14,9	3,4-5,25	1,0-1,6	4,5-7,0	0,6-1,1
Yaourt nature maigre	186	44	11,7 9,5-12,5	4,5 4,1-4,7	0,3 tr.-0,6	5,2 4,1-6,3	1 0,8-1,1
Fiches techniques des fabricants	146-197	35-47		3,9-4,7	tr.-0,3	4,7-6,3	1
Littérature	151-233	36-56	9,5-14,8	3,5-5,7	tr.-0,5	4,8-7,7	1

Composition glucidique de 100 g de yaourt nature au cours de la fabrication et du stockage

	Glucose g	Galactose g	Lactose hydraté g	Sucres totaux g
Lait + ferments	0,03	0,1	5,92	6,05
Incubation 30 mn	0,25	0,55	4,93	5,73
Incubation 1 h 30	0,15	0,68	4,33	5,16
Incubation 2 h 30	0,07	0,82	4,05	4,94
Yaourt refroidi	0,01	1,03	3,88	5,01
Yaourt stocké 7 jours	non décelable	1,16	3,65	4,81
Yaourt stocké 14 jours	non décelable	1,13	3,55	4,63
Yaourt stocké 21 jours	0,08	1,01	3,34	4,43

Document 5

Extrait de la fiche technique d'un yaourt brassé sur fruits

Liste Ingrédients

Variétés: fraise x2, mûre, cerise, pêche, abricot

Yaourt - Fruits : Abricot ou Cerise ou Fraise ou Mûre ou Pêche : 13% - Sucre : 11,8% - Sirop de glucose-fructose : 1,6% - Amidon transformé - Epaisissants : Pectine, Gomme xanthane, Carraghénanes - Arômes - Jus concentré de sureau (variété fraise) – Conservateur du fruit : E202 - Correcteur d'acidité : E330, E331, E332, E333 - Sel - Colorants : Anthocyanes, Extrait de paprika, Lutéine, Curcumine.

Ne contient pas d'OGM (Organisme Génétiquement Modifié) produit non-ionisé.

Ingrédients conventionnels.

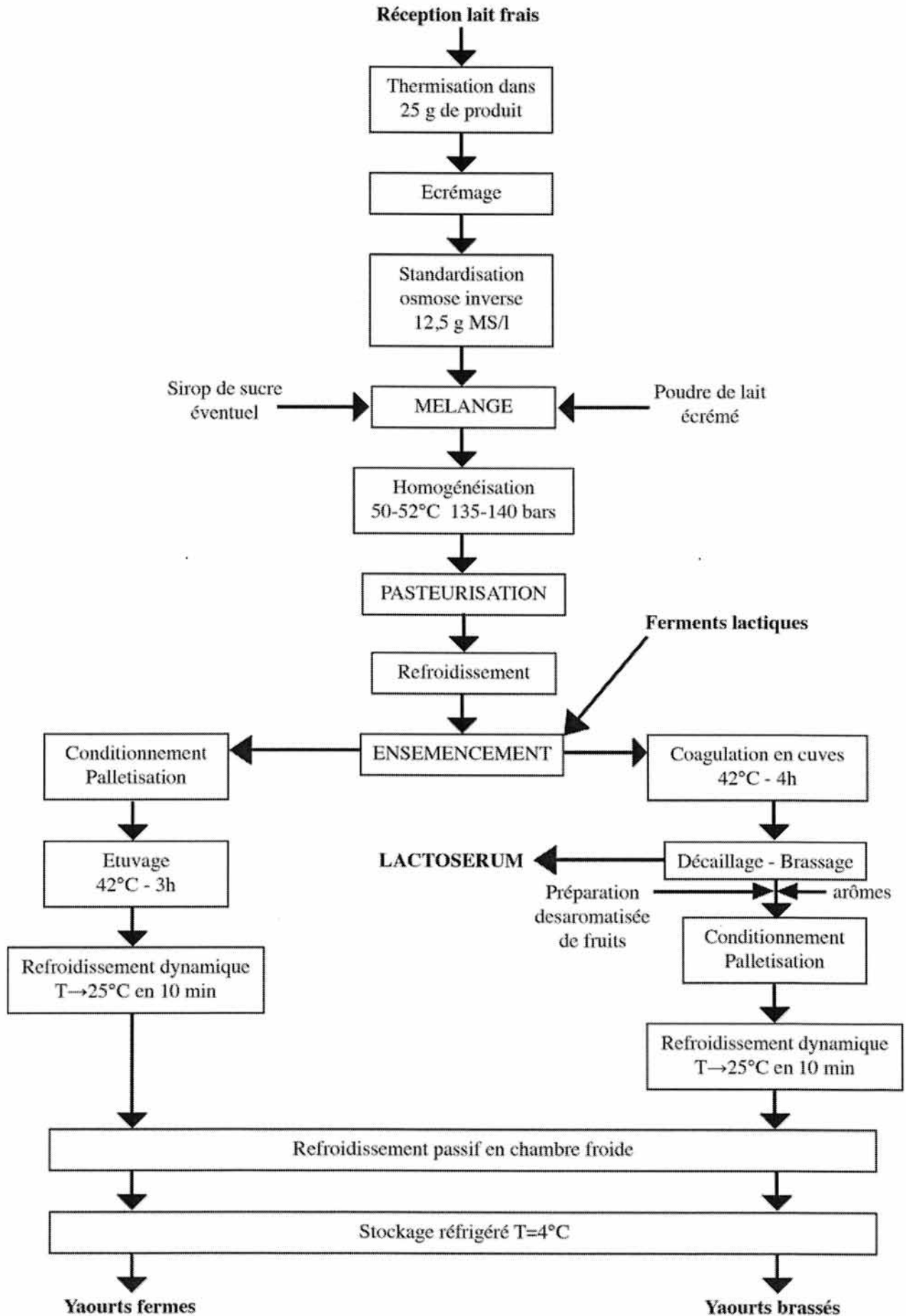
Valeurs nutritionnelles et énergétiques moyennes pour 100g

	kJ	kcal	Protéines	Glucides	Dont sucres	Lipides	Dt acides gras sat.	Fibres	Sodium	Calcium
Panaché	446	106	2.8 g	18 g	17.7 g	2.5 g	1.7 g	0.2 g	0.05 g	99 mg

Document 6

Lignes de fabrication des yaourts fermes et brassés aux fruits

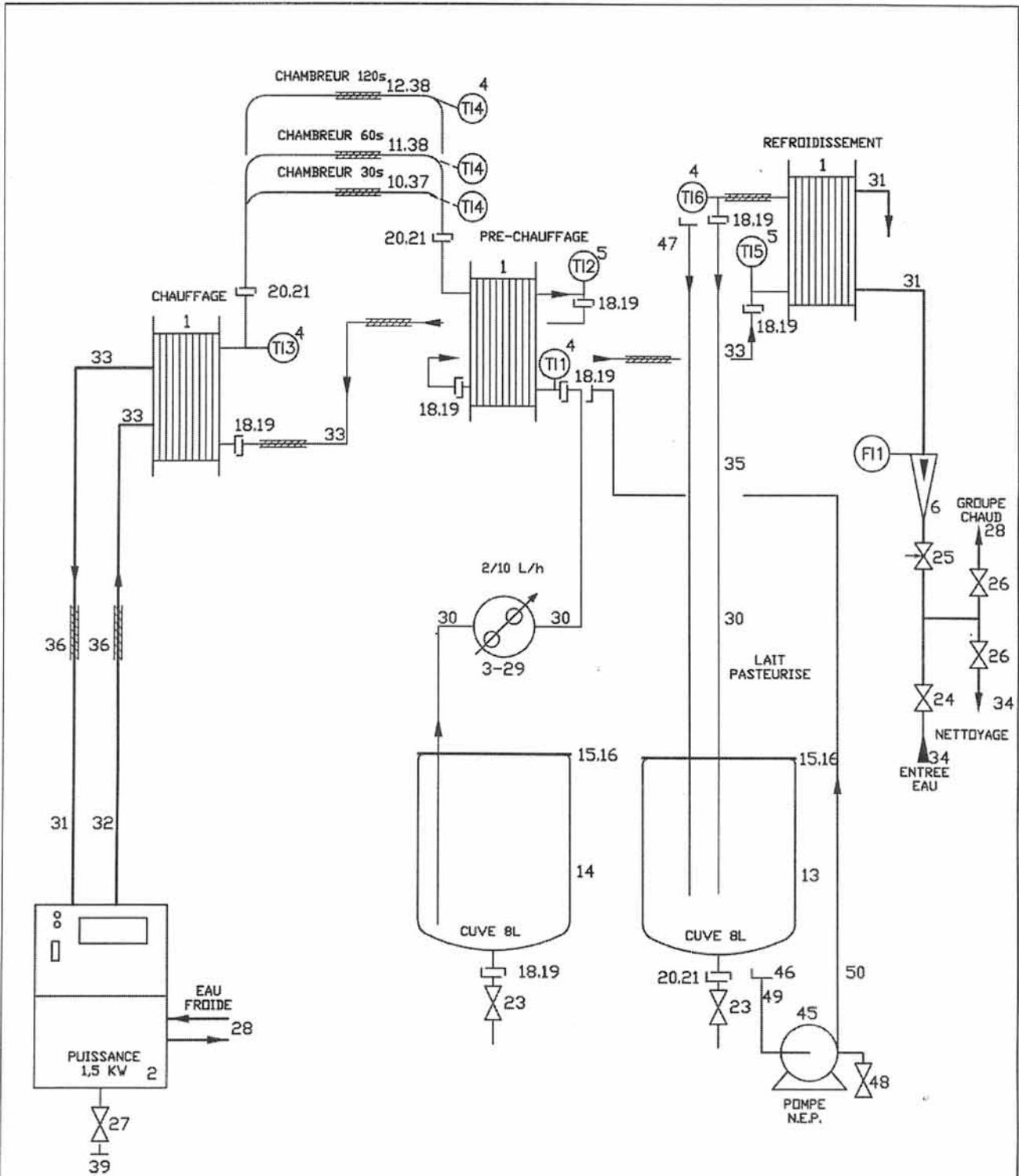
(source : Commission Internationale des Industries Agricoles)



Document 7

Extraits de la documentation technique d'un pasteurisateur à plaques

- Schéma de principe du pilote PIGNAT UPA/4000/S :



C						C
B	21-06-06	Modification sortie NEP	DF	DF		B
A	06.01.06	EDITION ORIGINALE	DF	DF		A
IND.	DATE	DESIGNATION	ETABLI	VERIF.	VAL.	A. Q.IND.

Ce plan est la propriété exclusive de la Société PIGNAT.

Il ne peut être ni reproduit ni communiqué à des tiers sans notre autorisation écrite.

Z.I. DE REVOISSON. B.P.11
69740 GENAS-FRANCE

Tél. 04.78.90.50.03
Fax 04.78.90.63.88

PASTEURISATION 10L/h
Réf. UPA/4000/S
Schéma de principe

ECH / FAMILLE P 5168/000

- Caractéristiques du pilote PIGNAT UPA/4000/S

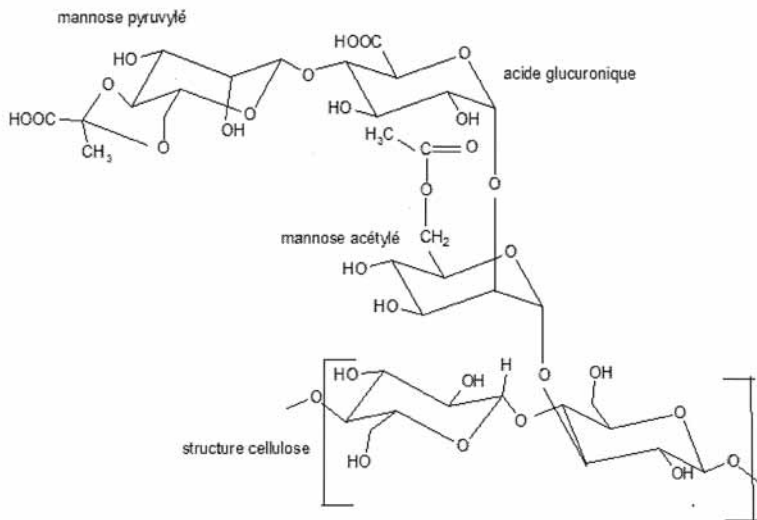
Points de fonctionnement	
Procédé	Continu
Débit d'alimentation	10 L/h
Température pasteurisation	70 à 75°C
Température eau chaude	75 à 98°C
Débit eau chaude	Réglage programme 4 de la pompe
Débit eau froide	150 L/h
Température eau froide mini	15°C
Température eau froide maxi	30°C
Description de l'unité	
Circuit circulation produit	<ul style="list-style-type: none"> • Cuve 8 L inox stockage du produit, couvercle inox amovible, vanne de vidange en fond de cuve • Pompe péristaltique pour alimentation du produit, débit de 2 à 20 L/h • Echangeurs à plaques pour zone de préchauffage et de pré-refroidissement • Echangeur à plaques pour zone de chauffage • Chambreur avec trois temps de chambrage : 30 s, 1 min et 2 min, définis pour un débit nominal de 10L/h • Echangeur à plaques pour zone de refroidissement • Cuve 8 L inox stockage du produit pasteurisé, couvercle inox amovible, vanne de vidange en fond de cuve
Circuit eau de refroidissement	<ul style="list-style-type: none"> • Deux vannes d'isolement pour alimentation de l'échangeur de refroidissement et du système de refroidissement interne du groupe thermorégulateur • Débit-mètre 25-250 L/h avec vanne de réglage
Circuit eau surchauffée	Groupe thermorégulateur, puissance 2kWatt Alimentation en eau par le circuit eau de ville, vanne d'isolement Température maximale : 95°C
Circuit nettoyage en place (NEP)	<ul style="list-style-type: none"> • Pompe centrifuge inox débit 1000 L/h • Connexion sur la cuve inox de stockage de produit par raccords rapides • Connexion sortie échangeur de refroidissement par raccords rapides
Description des repères	
Description des vannes	V1 : vanne de vidange de la cuve d'alimentation V2 : vanne de vidange de la cuve de réception produit pasteurisé V3 : vanne de nettoyage V4 : vanne d'isolement en eau froide V5 : vanne de réglage du débit d'eau froide V6 : vanne d'isolement en eau froide du groupe thermorégulateur V7 : vanne de vidange du groupe thermorégulateur V8 : vanne de vidange de la pompe centrifuge NEP
Description des repères des températures	TI1 : température entrée produit TI2 : température produit sortie préchauffage TI3 : température produit entrée chambrage TI4 : température produit sortie chambrage TI5 : température produit pré-refroidi TI6 : température produit refroidi
Description des repères des débits	F11 : débit-mètre à flotteur eau froide, 25-250 L/h

Document 8

Caractéristiques de la gomme xanthane

Le xanthane est un polysaccharide microbien commercialisé depuis 1964 et dont la production est connue depuis 1958. Ce polysaccharide a été autorisé comme additif alimentaire en 1969 au USA, en 1971 au Canada et en 1974 dans l'Union Européenne pour ses propriétés émulsifiantes et stabilisantes.

La chaîne principale de ce polysaccharide est constituée par un enchaînement de glucopyranoses reliés entre eux par des liaisons β 1,4 glucosidiques (cellulose) sur lesquels viennent se greffer tous les 2 résidus de glucose une chaîne latérale constituée par 2 résidus de mannopyranoses encadrant 1 résidu d'acide glucuronique.



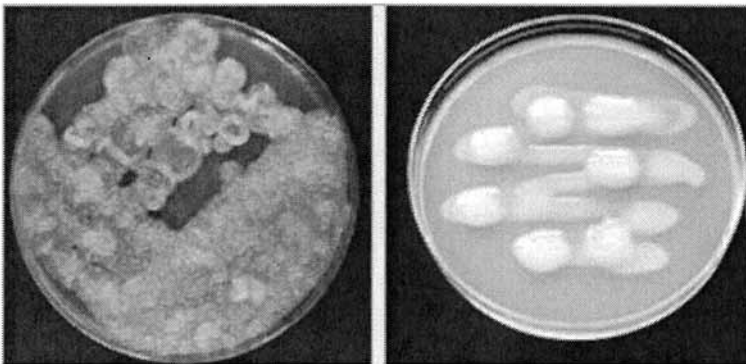
Les chaînes de xanthane s'associent en simple ou double hélice sans qu'il y ait aucune tendance à s'associer les unes aux autres bien que les charges engendrées par l'acétate ou le pyruvate soient neutralisées.

Le xanthane est très utilisé dans les IAA car il est soluble aussi bien à froid qu'à chaud dans l'eau. Il donne des solutions visqueuses à faible concentration, cette viscosité est indépendante de la température (excellente stabilité thermique, température de transition gel-sol peut être supérieure à 100°C), elle dépend cependant de l'agitation du milieu (viscosité élevée à faible agitation et inversement). Le xanthane est stable en milieu acide (un avantage sur l'amidon et ses dérivés), il supporte les cycles de congélation-décongélation sans synérèse importante et il possède en outre une excellente compatibilité avec de nombreux composés et les sels. Le xanthane possède enfin de bonnes propriétés émulsifiantes (une vinaigrette à 60% d'huile est stabilisée pendant plus d'un an par l'adjonction de 0,3% de xanthane).

Document 9

**Paramètres de la fermentation conduisant à la production
de xanthane par *Xanthomonas campestris***

Procédé	Fed batch Facteur limitant : source d'azote, taux de dilution : 0,025 – 0,05 h ⁻¹
Ensemencement	<i>Xanthomonas campestris</i> (Bacille Gram – aérobic strict) Inoculum à 5% (v/v)
Aération	1vvm d'air
Sources possibles de carbone	Amidon, dextrines, sirop de maïs, mélasse, glucose et saccharose, lactosérum, hydrolysats de céréales, amidon de maïs 30 à 40 g/L
Sources possibles d'azote	Caséine, farine de soja, sels d'ammonium, peptone, corn steep, hydrolysats de levures, urée Rapport C/N : 10/1
Sources diverses	MgCl ₂ , KH ₂ PO ₄
Température	28 à 30°C
pH	7
Durée de fermentation	3 jours
Purification	Ajout de solvants (isopropanol, éthanol) Séchage sur filtre rotatif



Métabolite partiellement associé. Le taux de production est au minimum de 25 g/L mais en général atteint et peut dépasser 50 g/L.

La pasteurisation et le séchage en fin de procédé permettent de développer les propriétés du xanthane.

Enhanced xanthan production process in shake flasks and pilot scale bioreactors using industrial semi-defined medium

(extrait de African Journal of Biotechnology, vol10(6), p1029-1038, 7 feb 2011)

MATERIALS AND METHODS

Cell propagation

For the first cell propagation, 1 cryogenic vial from stock culture (containing 1 mL) was taken and used to inoculate 250 mL Erlenmeyer flask containing 50 mL modified YM broth (glucose, 10 gL⁻¹; K₂HPO₄, 4 gL⁻¹; yeast extract, 4.0 gL⁻¹; MgSO₄·7H₂O, 0.5 g L⁻¹ and malt extract, 5.0 gL⁻¹). The inoculated flasks were incubated on rotary shaker (Innova 4080, New Brunswick Scientific Co., NJ, USA) at 150 rpm and 30°C for 24 h. Cells were used thereafter to inoculate either 250 mL Erlenmeyer flasks of 50 mL working volume or stirred tank bioreactor with inoculum concentration of 5% (v v⁻¹).

Xanthan production medium and cultivation conditions

Five different types of broth medium were used in this study for primary evaluation for medium optimization process. All these media were reported before for their high support for xanthan production. The compositions of these media in (gL⁻¹) were as follows: Medium 1: Glucose, 55.0; defatted soybean flour, 4.6; KH₂PO₄, 2.0; MgSO₄·7H₂O, 0.5; FeCl₃·6H₂O, 0.00333; MnSO₄·H₂O, 0.00022; ZnSO₄·7H₂O, 0.00117; CuSO₄·5H₂O, 0.00062 and H₃BO₃, 0.000067 (Honma et al., 1996). Medium 2: Sucrose, 42.0; NH₄NO₃, 1.125; (NH₄)₂HPO₄, 0.217; MgSO₄·7H₂O, 0.25 and defatted soy-bean meal, 15.0 (Letisse et al., 2001). Medium 3: Glucose, 27.5; yeast extract, 3.0; KH₂PO₄, 2.0 and MgSO₄·7H₂O, 0.1 (Shu and Yang, 1990). Medium 4: Sugar cane molasses, 175.0; yeast extract, 5.0; peptone, 10.0; NaCl, 10.0 and K₂HPO₄, 4.0 (Kalogiannis et al., 2003). Medium 5: Glucose, 33.0; citric acid, 2.0; yeast extract, 0.75; peptone, 0.34; MgSO₄·7H₂O, 0.49; NH₄SO₄, 3.33; H₃BO₃, 0.0072; FeCl₃·6H₂O; 0.0042; KH₂PO₄, 0.0042; CaCO₃, 0.029, and ZnO, 0.006 (Esgalhado et al., 1995).

For all media used, the pH was adjusted to 7.0 before sterilization. The carbon source was autoclaved separately and added to the fermentation medium before inoculation. In case of shake flasks, the inoculated flasks were incubated on rotary shaker at 200 rpm and 30°C. The bioreactor used in this study was carried out using 16-L pilot scale stirred tank bioreactor (BioEngineering, Wald, Switzerland) with working volume of 8 L. The stirrer was equipped with two 6-bladed rushton turbine impellers (di (impeller diameter) = 85 mm; dt (tank diameter) = 214 mm). The agitation speed was 200 rpm throughout the cultivation. Aeration was performed using filtered sterile air and supplied continuously to the bioreactor with rate of 1 v min⁻¹. Foam was suppressed by the addition of silicon antifoam grade A (Sigma-Aldrich Inc., USA). During the cultivation process, pH value and dissolved oxygen concentration were determined using pH and DO polarographic electrodes, respectively (Ingold, Mettler-Toledo, Switzerland). In case of pH controlled culture, the medium pH was adjusted to 5.5 by cascading the pH controller with acid/base feeding peristaltic pumps connected with 2.5 M HCl and NH₄OH, respectively.

Analysis

Samples in form of 3 flasks of 50 mL broth for each (in case of shake flask experiments) or 30 mL (in case of bioreactor cultivations) were taken at different time intervals during cultivations. Samples were chilled on ice and centrifuged immediately (33,000 g for 30 min at 4°C) to separate cells from the broth. In samples of high xanthan concentration, samples were diluted in KCl (1% w/v) to decrease sample viscosity and thereby improve cell separation from broth. The supernatant was removed and stored at -20°C for further analysis. Cell biomass was washed in KCl solution 1%, centrifuged at 9,000 g for 10 min at 4°C in pre-weighed falcon tubes, the cells were washed two times with distilled water and the tubes were dried to constant weight at 60°C in vacuum oven. The difference in tube weight was used to calculate the cell dry weight concentration by relating this value to the initial sample volume. Determination of xanthan concentration in the supernatant broth was carried out by polysaccharide precipitation with three volumes of 95% ethanol according to the method of Cadmus and Knutson (1983). The precipitate was dissolved in 1% KCl solution, reprecipitated again using ethanol and dried to constant weight at 60°C in vacuum oven.

RESULTS AND DISCUSSION

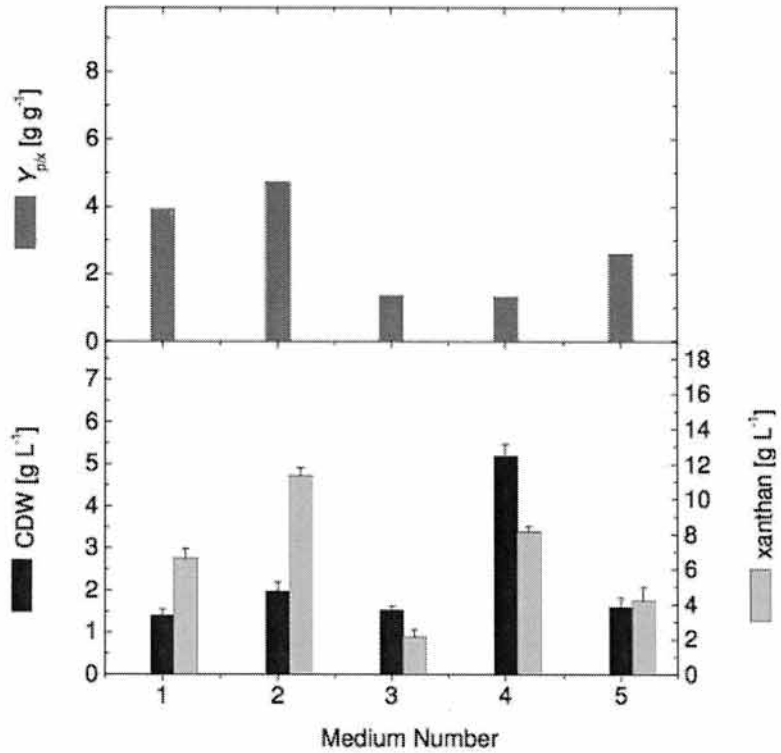


Figure 1. Cell growth and xanthan production in different types of media.

CDW : cell dry weight

Y_{PIX} : Yield coefficient, which represents the gram of polysaccharide produced by gram cell biomass

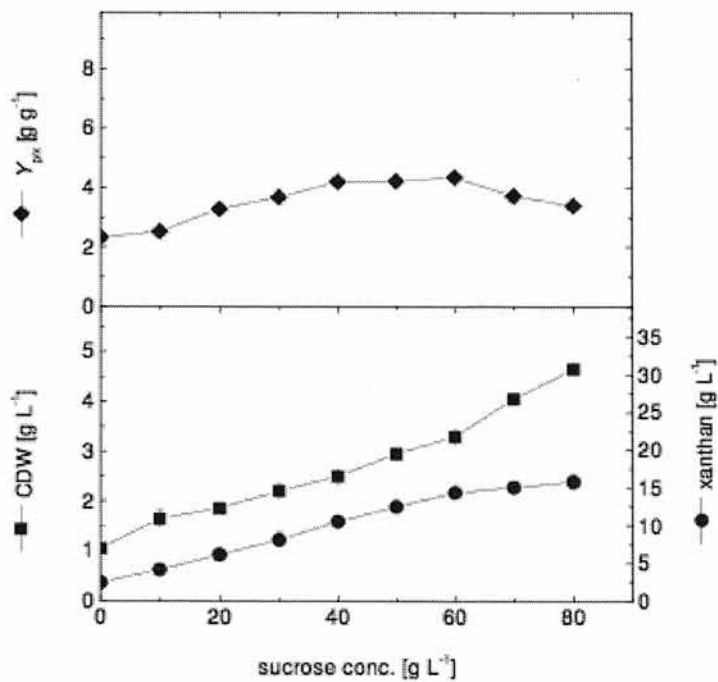


Figure 2. Effect of different sucrose concentrations on the cell growth and xanthan production by *X. campestris* in semi-defined medium.

En analysant les différents constituants des milieux, un milieu optimal a été défini pour la poursuite des études en bioréacteur.

Table 1. Kinetics of cell growth and xanthan production in different media, production scales and conditions.

Parameters	Shake flask		Bioreactor	
	Non-optimized medium	Optimized medium	pH uncontrolled	pH controlled
Growth parameters				
X_{max} [g L ⁻¹]	2.40	3.36	4.45	2.77
dx/dt [g L ⁻¹ h ⁻¹]	0.029	0.045	0.067	0.044
μ [h ⁻¹]	0.028	0.028	0.030	0.033
Production parameters				
P_{max} [g L ⁻¹]	11.7	19.9	28.45	27.85
Q_P [g L ⁻¹ h ⁻¹]	0.14	0.24	0.44	0.49
Y_{PX} [g g ⁻¹]	4.9	6.38	6.79	11.06

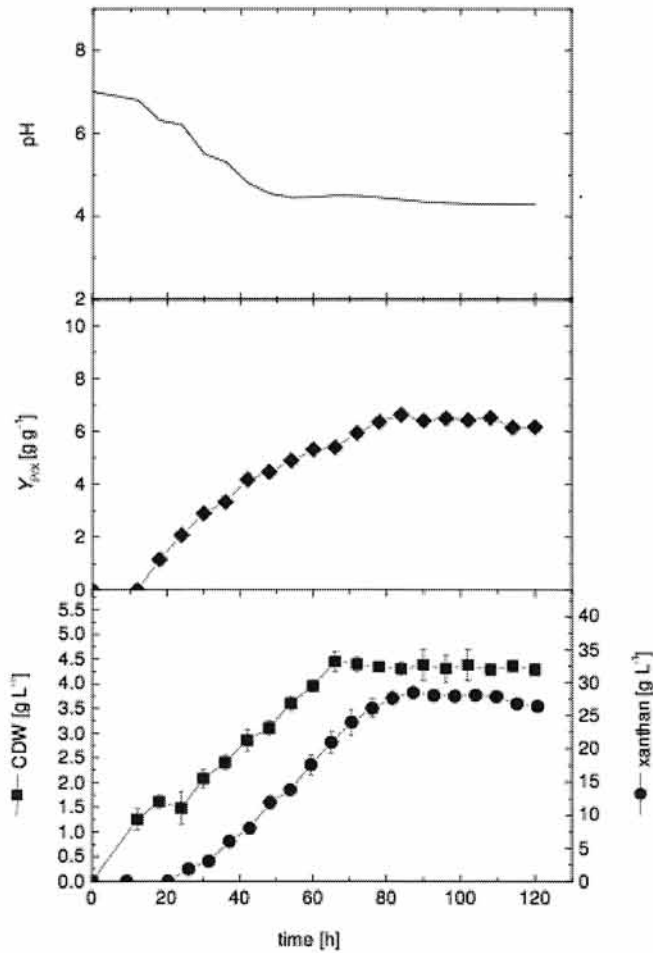


Figure 6. Kinetics of cell growth and xanthan production using optimized semi-defined medium in 16-L bioreactor under uncontrolled pH condition.

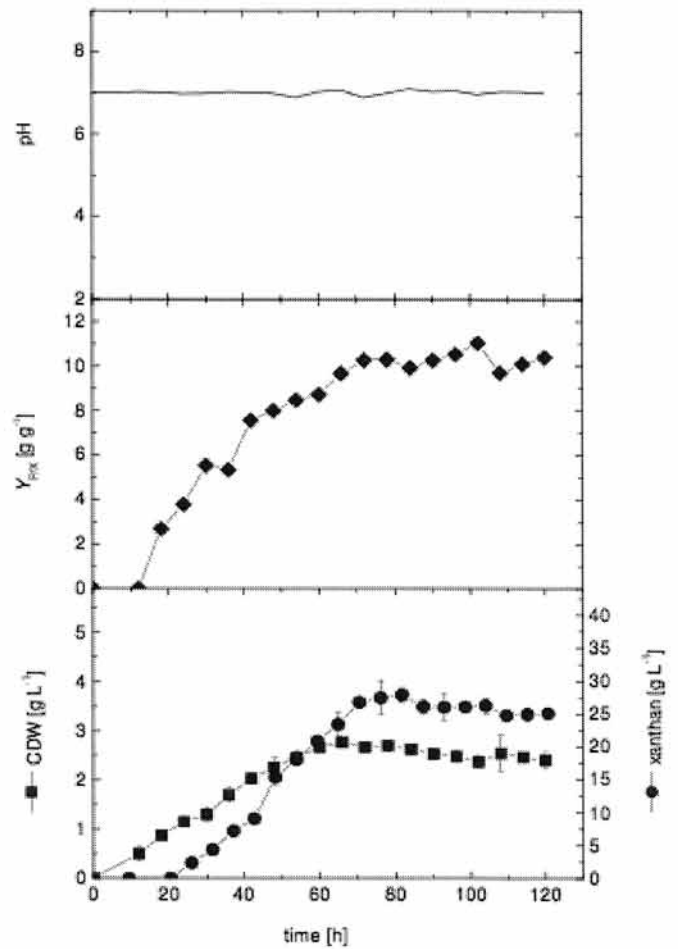


Figure 7. Kinetics of cell growth and xanthan production in optimized semi-defined medium in 16-L bioreactor under controlled pH condition.