

SESSION 2014

**CAPET
CONCOURS EXTERNE
ET CAFEP**

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

SECONDE ÉPREUVE

Durée : 5 heures

Le dictionnaire anglais-français est autorisé.

L'usage de tout ouvrage de référence, de tout autre 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 : 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.

Utilisation des biotechnologies en panification

Les biotechnologies ont fait évoluer les pratiques des artisans ou des industries produisant du pain.

Réaliser une analyse structurée et critique des stratégies de sélection, d'amélioration, de production et de conservation de ferments panaires en exploitant les documents proposés et en explicitant les techniques mises en œuvre.

A partir des documents du dossier technique, proposer un document de synthèse d'une page illustrant la diversité des apports biotechnologiques contribuant à l'amélioration du processus de panification. Le candidat veillera à justifier ses choix, en précisant le type de classe, la stratégie pédagogique d'utilisation de ce document afin dégager les concepts fondamentaux.

Le document s'adresse à des élèves de Lycée, cycle terminal ou section de technicien supérieur.

Liste des documents fournis

Document 1 *Aspects réglementaires*

Document 2 *Les étapes de la fabrication du pain*

Document 3 *Les stratégies d'amélioration des levures*

Document 4 *Caractérisation des bactéries lactiques du levain*

Document 5 *Optimisation de la fermentation par le choix des cultures « starters » du levain*

Document 5-A Etude de la croissance cellulaire et mesure de pH

Document 5-B Dosages des produits de fermentation

Document 5-C Dosage des composés aromatiques volatils par chromatographie en phase gazeuse

Document 6 *Caractérisation de souches de levures « rapides »*

Document 7 *Sélection de souches de levures pour la réfrigération de la pâte*

Document 7-A Obtention de mutants Csf

Document 7-B Caractérisation des mutants Csf

Document 8 *Fabrication et conservation de levains prêt à l'emploi*

Document 8-A Brevet EP 0765122 B1 (1994)

Document 8-B Brevet EP 0953288 B1 (1998)

Document 9 *Les enzymes, auxiliaires technologiques autorisés en panification*

Document 1 Aspects réglementaires

Extrait du décret n°93-1074 du 13 septembre 1993 pris pour l'application de la loi du 1er août 1905 en ce qui concerne certaines catégories de pains

Article 1

Peuvent seuls être mis en vente ou vendus sous la dénomination de : "pain maison" ou sous une dénomination équivalente les pains entièrement pétris, façonnés et cuits sur leur lieu de vente au consommateur final. Toutefois, cette dénomination peut également être utilisée lorsque le pain est vendu au consommateur final, de façon itinérante, par le professionnel qui a assuré sur le même lieu les opérations de pétrissage, de façonnage et de cuisson.

Article 2

Peuvent seuls être mis en vente ou vendus sous la dénomination de : "pain de tradition française", "pain traditionnel français", "pain traditionnel de France" ou sous une dénomination combinant ces termes les pains, quelle que soit leur forme, n'ayant subi aucun traitement de surgélation au cours de leur élaboration, ne contenant aucun additif et résultant de la cuisson d'une pâte qui présente les caractéristiques suivantes :

- 1° Être composée exclusivement d'un mélange de farines panifiables de blé, d'eau potable et de sel de cuisine ;
- 2° Être fermentée à l'aide de levure de panification (*Saccharomyces cerevisiae*) et de levain, au sens de l'article 4 du présent décret, ou de l'un seulement de ces agents de fermentation alcoolique panaire ;
- 3° Éventuellement, contenir, par rapport au poids total de farine mise en œuvre, une proportion maximale de :
 - a) 2 p. 100 de farine de fèves ;
 - b) 0,5 p. 100 de farine de soja ;
 - c) 0,3 p. 100 de farine de malt de blé.

Article 3 (Modifié par le décret n°97-917 du 1 octobre 1997 - article 1)

Peuvent seuls être mis en vente ou vendus sous une dénomination comportant la mention complémentaire "au levain" les pains définis aux articles 1er et 2 et présentant un potentiel hydrogène (pH) maximal de 4,3 et une teneur en acide acétique endogène de la mie d'au moins 900 parties par million.

Article 4

Le levain est une pâte composée de farine de blé et de seigle, ou de l'un seulement de ces deux ingrédients, d'eau potable, éventuellement additionnée de sel, et soumise à une fermentation naturelle acidifiante, dont la fonction est d'assurer la levée de la pâte.

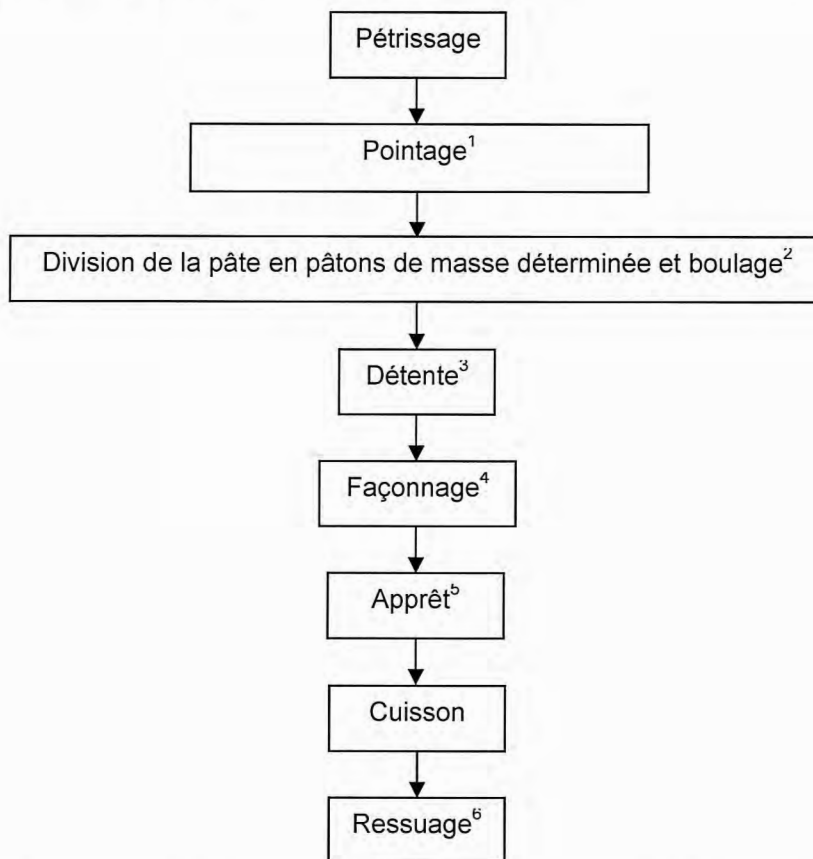
Le levain renferme une micro-flore acidifiante constituée essentiellement de bactéries lactiques et de levures. Toutefois, l'addition de levure de panification (*Saccharomyces cerevisiae*) est admise dans la pâte destinée à la dernière phase du pétrissage, à la dose maximale de 0,2 p. 100 par rapport au poids de farine mise en œuvre à ce stade.

Le levain peut faire l'objet d'une déshydratation sous réserve que le levain déshydraté contienne une flore vivante de bactéries de l'ordre d'un milliard de bactéries alimentaires et d'un à dix millions de levures par gramme. Après réhydratation, et, éventuellement, addition de levure de panification (*Saccharomyces cerevisiae*) dans les conditions prévues à l'alinéa précédent, il doit être capable d'assurer une levée correcte du pâton.

Le levain peut faire l'objet d'un ensemencement de micro-organismes autorisés par arrêté du ministre de l'agriculture et du ministre chargé de la consommation, pris après avis de la commission de technologie alimentaire créée par le décret n° 89-530 du 28 juillet 1989 portant création de la commission de technologie alimentaire.

Document 2 Les étapes de la fabrication du pain

D'après Aliments et boissons, Filières et produits, Elisabeth Vierling, CRDP Aquitaine et d'après Produits et procédés de panification, Techniques de l'ingénieur, Frédéric Landgraf



¹ Le pointage correspond à la première période de fermentation qui concerne la pâte en masse. Le premier rôle du pointage est de donner de la force à la pâte. Cette prise de force correspond à une modification du gluten. Qui devient plus tenace, plus élastique, et moins extensible. Le tissu glutineux formé peut retenir le CO₂. Le deuxième rôle du pointage est de favoriser le développement des arômes du pain.

² Le boulage correspond à la mise en forme des pâtons en petites boules de pâtes.

³ Les pâtons sont mis au repos pendant cette phase.

⁴ Cette étape permet de donner sa forme définitive au pâton.

⁵ Dernière étape de fermentation. Elle correspond à la poussée gazeuse et donne le volume au pain.

⁶ Refroidissement du pain.

Document 3 Les stratégies d'amélioration des levures

D'après Gélinas P., *Recent Pat Food Nutr Agric.* 2009 Jun;1(2):104-32.

La première génération de brevets sur des souches de levure revendiquait une meilleure croissance cellulaire en fermenteur, une production de gaz accrue ou une meilleure survie de la levure à la déshydratation pour la préparation de levure « instantanée ». Dans les années 1980 à 1995 principalement, des souches développées pour des applications spécifiques ont suscité un intérêt croissant, par exemple, des souches pour des pâtes plus ou moins sucrées, réfrigérées ou congelées. A la même époque, des souches de levure génétiquement modifiées ont été développées mais n'ont pas trouvé par la suite d'application dans l'industrie panariaire. Depuis les années 2000, les souches de levure de boulangerie brevetées mettent en avant leur production aromatique, leur activité anti-moisissure ou leurs qualités nutritionnelles afin de mieux répondre aux attentes de l'industrie.

Document 4 Caractérisation des bactéries lactiques du levain

D'après M. Ferchichi, R. Valcheva, H. Prévost, B. Onno, X. Dousset, *Food Microbiology*, 2007, 678-686

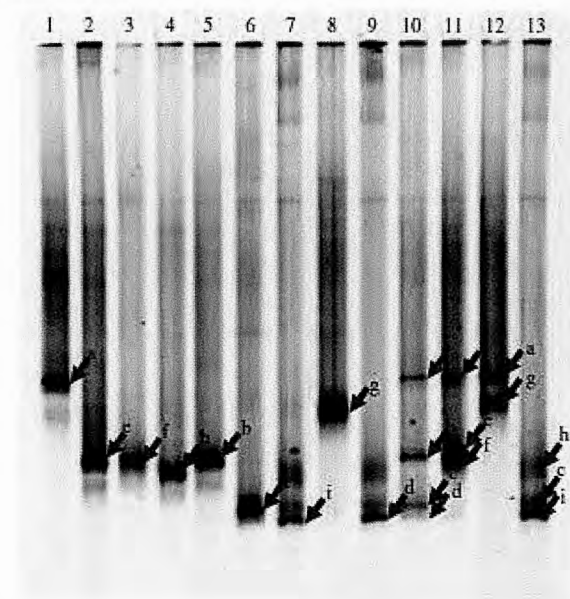
Protocole

- extraction et purification d'ADN bactérien à partir de différents échantillons de levain ou de souches de référence,
- amplification par PCR de la région V6-V8 de l'ADNr 16S,
- analyse par TTGE (temporal temperature gradient gel electrophoresis) des produits de PCR

Souches de référence et leurs caractéristiques

Souche	Position de la région V6-V8 dans l'ADNr 16S	Prédiction du Tm (°C)
<i>Lactobacillus frumenti</i> DSM 13145	993-1427	59,4
<i>Lactobacillus hammesii</i> DSM 16381	974-1408	56,9
<i>Lactobacillus nantensis</i> DSM 16982	986-1420	61,6
<i>Lactobacillus panis</i> DSM 6035	959-1393	60,5
<i>Lactobacillus paralimentarius</i> DSM 13238	985-1419	63,0
<i>Lactobacillus pontis</i> DSM 8475	995-1429	59,6
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> ATCC 43322	996-1429	61,0
<i>Lactobacillus spicheri</i> CIP 5753	965-1399	59,3
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp <i>mesenteroides</i> DSM 20240	977-1411	60,0

Résultats



- Ligne 1, *Lactobacillus sanfranciscensis* ATCC 43332 (a)
Ligne 2, *Lactobacillus spicheri* CIP5763 (e)
Ligne 3, *Lactobacillus pontis* DSM8475 (f)
Ligne 4, *Lactobacillus frumenti* DSM 13145 (h)
Ligne 5, *Lactobacillus nantensis* DSM 16982 (b)
Ligne 6, *Lactobacillus hammesii* DSM 16381 (c)
Ligne 7, *Lactobacillus paralimentarius* DSM 13238 (i)
Ligne 8, *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* DSM 20240 (g)
Ligne 9, *Lactobacillus panis* DSM 8475 (d)
Ligne 10, Levain GO (a,b,c,d)
Ligne 11, Levain BF (a,e,f)
Ligne 12, Levain VB (a,g)
Ligne 13, Levain RF (h,c,i)

Document 5 Optimisation de la fermentation par le choix des cultures « starters » du levain

D'après B. Meignen, et al., Food Microbiology, Volume 18, Issue 3, June 2001, 239–245

Les « starters » ont été utilisés :

- seuls (single process) : 2 levains inoculés avec *L. brevis* ou *S. cerevisiae* et fermentés séparément pendant 20 h à 30°C puis mélangés,
- mélangés (mixed process) : 1 levain inoculé avec *L. brevis* et *S. cerevisiae* et fermenté pendant 20 h à 30°C,

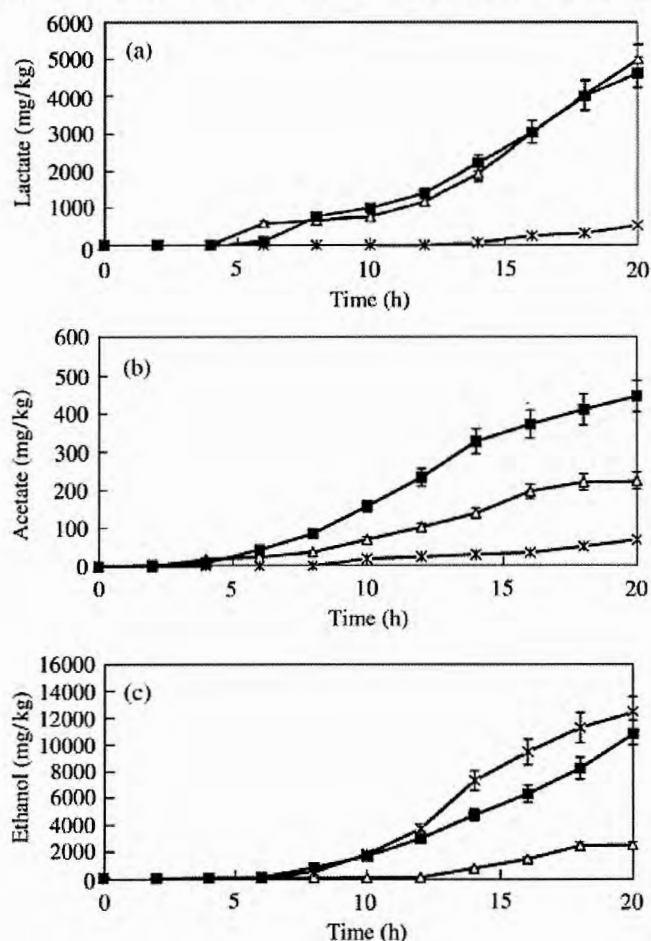
Ces levains ont ensuite été utilisés en panification.

Document 5-A Etude de la croissance cellulaire et mesure de pH

Parameter	<i>Lactobacillus brevis</i>		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
	single	mixed	single	mixed
Cell number at T ₀ (CFUx10 ⁶ /g dough)	10	10	1	1
Cell number at T ₂₀ (CFUx10 ⁶ /g dough)	920	930	30	5
Growth rate (h ⁻¹)	0.52	0.51	0.47	0.32
pH	3.8	3.7	5.2	3.7

Document 5-B Dosages des produits de fermentation

L'analyse des produits de fermentation a été réalisée en HPLC à 65°C avec une phase mobile constituée de H₂SO₄ à 0,002 mol.L⁻¹ avec un débit de 0,5 mL.min⁻¹ et une colonne Acidex H⁺. Une détection en UV à 210 nm et par réfractométrie a été réalisée.



Effets du starter : *Lactobacillus brevis* (Δ), *Saccharomyces cerevisiae* (x) et starters mélangés (mixed ■) et du temps sur (a) la production de lactate, (b) d'acétate et (c) d'éthanol dans la pâte après fermentation pendant 20h à 30°C..

Document 5-C Dosage des composés aromatiques volatils par chromatographie en phase gazeuse

Aroma compounds (% area of internal standard) in sourdough (*levain*) and bread according to fermentation conditions.

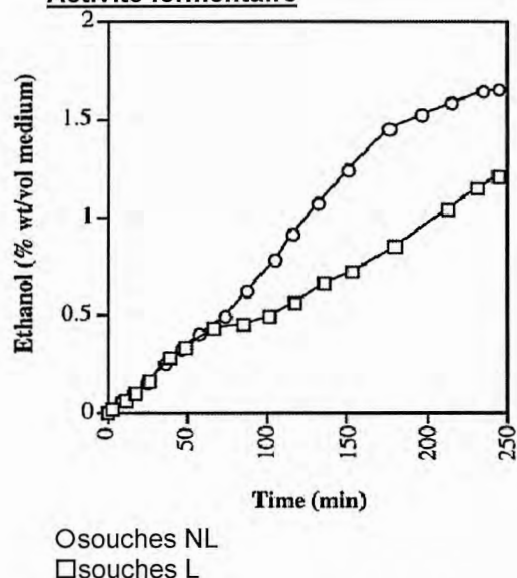
Compound	Single	Mixed
3-methyl 1-butanal	127	55
3-methyl 1-butanol	225	395
2-methyl 1-butanol	108	101
Ethyl lactate	44	168
2-phenyl ethyl alcohol	167	513

Document 6 Caractérisation de souches de levures « rapides »

D'après Higgins VJ et al., *Appl Environ Microbiol.* 1999 Feb;65(2):680-5.

Au cours de la fermentation panairaire certaines souches de levures dites "retard" montrent une baisse indésirable de leur activité fermentaire au cours de la 2^{ème} heure de levée de la pâte, alors que d'autres souches dites "rapides" maintiennent une activité élevée. Les souches « retard » peuvent avoir d'autres phénotypes souhaitables en panification. Afin d'employer les souches « rapides » pour l'amélioration génétique des souches de boulangerie une caractérisation biochimique de ce phénotype est nécessaire.

Activité fermentaire



Des levures ont été inoculées dans une pâte. Des prélèvements ont été réalisés, les échantillons ont été centrifugés. L'éthanol a été dosé dans les surnageants par chromatographie en phase gazeuse.

Activités enzymatiques

Souche	Activité maltase ⁽¹⁾	Activité maltose perméase ⁽²⁾
NL67	360	1,700
NL25	210	1,500
NL89	270	2,000
L38	28	12
L83	29	12
L05	23	11

(1) Nanomole de paranitrophénol produit par minute et par mg de protéine

(2) Picomole de maltose [¹⁴C] assimilé par minute et par milligramme de levure (poids sec)

Document 7 Sélection de souches de levures pour la réfrigération de la pâte

Document 7-A Obtention de mutants Csf

D'après Kyogoku Y et Ouchi K., Appl Environ Microbiol. 1995 Feb;61(2):639-42.

UV irradiation

Cells of strain KY5649 were grown in YPD medium for 12 h at 30°C, harvested from the culture, and washed with a 0.067 M KH₂PO₄ solution. The cells were suspended in the same solution at a density of 10⁷ cells per ml and irradiated with UV light. Conditions for the UV irradiation were adjusted so that the survival rate would be 1 to 30%.

Cell culture

The mutagenized cells were inoculated into 5 ml of YPD and cultivated for 12 h at 30°C. After being washed, the cells were transferred to 1 ml of an amino acid and ammonium free medium and incubated for 12 h at 30°C so that they would enter the G1 stage. These cells were inoculated into 0.9 ml of YPD containing 10 mM antimycin A, an inhibitor of respiratory energy metabolism, and cultivated for 36 h at 10°C.

Selection

Nystatin (antifungal product) was added at 10 mg/ml to this culture, the mixture was incubated for a further 2 h at 10°C, and the cells were collected, washed, and plated on YP5D agar. Survival rates after the nystatin treatment ranged from 0.01 to 0.05%.

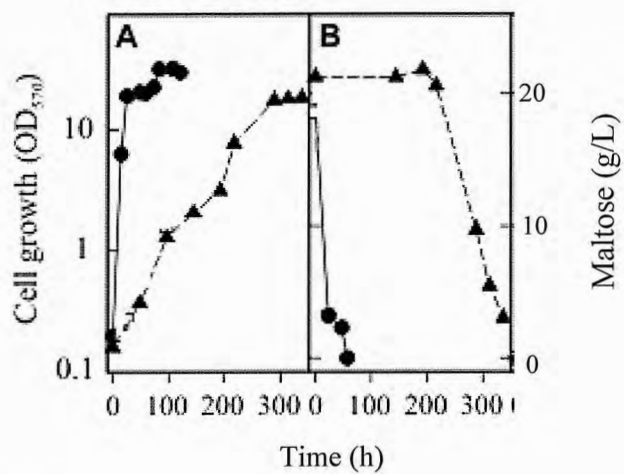
Control of the mutant cells phenotype

Some fractions of colonies grown on the YP5D plate at 30°C were isolated with toothpicks and dotted onto YPG plates. After 24 h of cultivation at 30°C, these colonies were overlaid with a soft dye agar (0.02% bromocresol purple, 10% sucrose, 0.5% yeast extract, 1% polypeptone, 1% agarose). After 6 to 12 h, colonies of the wild-type strain turned yellow even at 5°C, but those of the Csf mutants remained dark purple, although they turned yellow within 2 h when transferred to room temperature.

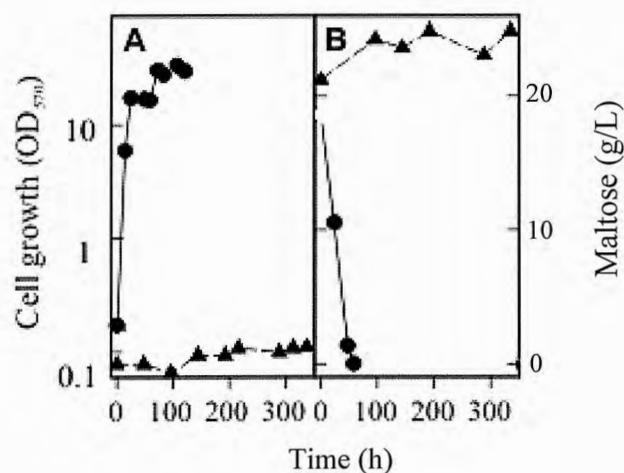
Document 7-B Caractérisation des mutants Csf

D'après Hollatz C. et Stambuk B.U., *Brazilian Journal of Microbiology*, (2003) 34 (suppl. 1) :99-101

- Souche sauvage



- Souche Csf



La croissance cellulaire (A) et la consommation du maltose (B) ont été analysées au cours d'une incubation à 10°C (▲) ou à 30°C (●) chez une souche sauvage (en haut) ou mutante Csf (en bas).

Document 8 Fabrication et conservation de levains prêt à l'emploi

Document 8-A Brevet EP 0765122 B1 (1994)

(...) procédé de fabrication d'un levain de panification déshydraté (...), caractérisé en ce qu'on déshydrate le levain humide à température inférieure à 40°C en deux étapes successives, d'abord à une vitesse de déshydratation quelconque, tant que l'activité de l'eau a_w est supérieure ou égale à 0,990 et ensuite, dès que l'activité de l'eau a_w tombe à une valeur inférieure à 0,990 on déshydrate le levain avec un gradient de potentiel hydrique plus faible (...) jusqu'à ce que l'activité de l'eau a_w tombe à une valeur sensiblement égale à 0,15.

Gradient de potentiel hydrique (Mpa/s)					
	Choc	0,2570 (11min)	0,1178 (24 min)	0,0565 (50 min)	0,0209 (135 min)
% de viabilité	43%	73%	86%	88%	83%
	40%	78%	87%	90%	85%
	40%	78%	91%	93%	88%

Document 8-B Brevet EP 0953288 B1 (1998)

Levain panaire prêt à l'emploi (...) ensemencé par au moins une préparation de bactéries lactiques hétérofermentaires ainsi qu'éventuellement par au moins une préparation de bactéries lactiques homofermentaires et, de préférence également, par au moins une préparation de levure, (...) caractérisé par le fait (...) :

- que son pH est (...) compris entre 4,1 et 4,3,
- (...) la quantité de sucres fermentescibles dosables dans le levain en conservation restant inférieure à 1 pour 1000 en poids, et
- qu'il permet, après ladite conservation, la fermentation d'une pâte boulangère selon un schéma direct d'obtention de pain au levain.

	T	T + 4 semaines à 4°C	T + 6 semaines à 4°C	T + 9 semaines à 4°C
<i>Lactobacillus</i>	6.10^9 UFC/g	5.10^9 UFC/g	3.10^9 UFC/g	2.10^9 UFC/g
Levure	1.10^7 UFC/g	1.10^7 UFC/g	9.10^6 UFC/g	8.10^6 UFC/g
Acide lactique	17 g/kg	18 g/kg	18 g/kg	20 g/kg
Acide acétique	8 g/kg	8,3 g/kg	8,5 g/kg	8,5 g/kg
pH	4,2	4,2	4,15	4,1

Document 9 Les enzymes, auxiliaires technologiques autorisés en panification

Adapté d'après J Potus et al, « Industries des céréales », n°96, janv-fév-mars 1996 et l'arrêté du 19 octobre 2006 relatif à l'emploi d'auxiliaires technologiques dans la fabrication de certaines denrées alimentaires

Enzymes		Rôles technologiques	Rôles organoleptiques
Enzymes dégradant l'amidon	Alpha amylase bactérienne (thermostable)	Susceptible de ralentir le rassissement	
	Alpha amylase fongique Amyloglucosidase (ou glucoamylase) 4- α -D glucane maltotétraohydrolase (ou G4-amylase) Exo-alpha-amylase maltogène Dextranase, Pullulanase	Favorise le dégagement gazeux au cours de la fermentation	Formation de composés volatils issus des fermentations secondaires et de la réaction de Maillard ou de caramélisation Coloration de la croûte
Cellulases et hémicellulases	Cellulases (endoglucanase, cellobiohydrolase et exoglucanase) Hémicellulase Pentosanase, xylanase, arabinofuranosidase	Augmentation de la capacité d'absorption d'eau Diminution de la ténacité de la pâte.	Coloration de la croûte
Glucose oxydase Hexose oxydase		Renforce le réseau protéique, augmentant ainsi la rétention gazeuse et la tolérance de la pâte	
Lipase Phospholipase A2		Amélioration des qualités rhéologiques de la pâte (tolérance, souplesse) Effet antirassissement	Formation de composés volatils issus de l'oxydation des acides gras non estérifiés
Protéase		Diminution de la viscosité et de l'élasticité de la pâte. Accélère l'adsorption d'eau	Formation de composés volatils issus du catabolisme protéique et de la réaction de Maillard Coloration de la croûte