

**BACCALAUREAT SCIENCES ET TECHNIQUES DE
LABORATOIRE
OPTION BIOTECHNOLOGIES**

**ÉPREUVE ECRITE:
BIOTECHNOLOGIES**

Sujet 0

**DURÉE DE L'ÉPREUVE : 2 h...
COEFFICIENT : 4**

Matériel autorisé

- Calculatrice fournie par le centre

Ce sujet comporte 9 pages numérotées de 1/9 à 9/9.

Les vins « botrytisés »

Les vins à sucres résiduels font aujourd'hui la notoriété de grandes régions françaises. Les vendanges tardives d'Alsace, les moelleux de Loire ou les liquoreux du Sud-Ouest, représentent très bien le mariage de la viticulture et de la vinification. L'élaboration de ces vins nécessite la présence d'une pourriture, dite noble, sur la peau du raisin.

La pourriture noble est un champignon, *Botrytis cinerea*, qui se développe sur les baies de raisin dans certaines conditions d'humidité et d'ensoleillement, permettant la production de vins liquoreux. La botrytisation, qui a lieu courant octobre-novembre, permet la concentration des sucres dans les grains de raisin.

1. Les conditions optimales de culture de *Botrytis cinerea*.

L'influence de divers effecteurs sur le cycle de développement de *Botrytis cinerea* en milieu synthétique est illustrée dans le **document 2**. Les expériences ont été réalisées avec la souche de *B.cinerea* C.77.4 isolée du vignoble de Bordeaux. Le champignon est cultivé sur un milieu minéral dont la composition est décrite dans le **document 1**. L'incubation est réalisée avec des phases alternées (12h) de lumière et d'obscurité.

Q1. A l'aide des résultats de ces expériences, indiquer les conditions optimales de développement du champignon.

Q2. Expliquer si ces conditions optimales de développement de *Botrytis cinerea* sont adéquates par rapport aux données suivantes :

- * Le vignoble de Bordeaux est soumis aux conditions climatologiques décrites dans le **document 3**.
- * Le pH des cellules de la pulpe de raisin est de 3,5 et celui de la pellicule de raisin mûr est de 4,3.

2. Utilisation de *Saccharomyces cerevisiae* lors de la fermentation alcoolique :

Dans le cadre de l'élaboration de vins demi-secs à liquoreux, une levure, *Saccharomyces cerevisiae*, est de plus en plus utilisée afin d'obtenir l'équilibre sucres/alcool désiré. Pour que la fermentation alcoolique se déroule correctement, le taux de croissance népérien (Q_{exp}) doit être de $0,09 \text{ h}^{-1}$

La croissance des levures est étudiée dans des conditions proches de celles de la vinification à 18°C , par mesure de l'absorbance du milieu à différents temps.

Q3. Calculer la vitesse de croissance spécifique, appelée aussi taux de croissance népérien (Q_{exp}) de la levure en utilisant les résultats d'absorbance obtenus en phase exponentielle de croissance :

- à 10 heures de culture : $A_{650 \text{ nm}} = 0,11$
- à 25 heures de culture : $A_{650 \text{ nm}} = 0,45$

Q4. Vérifier que les conditions de croissance sont favorables pour la production du vin.

Les levures jouent un rôle majeur dans la production de vin en assurant la fermentation alcoolique, illustrée dans le **document 4**.

Les courbes du **document 4** montrent deux temps différents dans la croissance de la levure. Le premier temps est une fermentation alcoolique.

Q5. Indiquer à quel moment cesse la fermentation alcoolique. Analyser ces trois courbes pour dégager le substrat, le produit et la transformation réalisée au cours de la fermentation alcoolique.

Une fois la fermentation alcoolique terminée, un autre métabolisme se met en place.

Q6. A partir du **document 4**, émettre une hypothèse sur la nature de ce nouveau métabolisme.

3. Dosage du D-glucose et D-Fructose résiduels pour déterminer la teneur en sucres totaux d'un vin botrytisé. Estimation de la qualité d'un vin botrytisé

Lors de la vinification des vins botrytisés, lorsque le vin a atteint un bon équilibre sucre-alcool, il faut le stabiliser, c'est-à-dire arrêter la fermentation. La stabilisation peut être naturelle (arrêt spontané de la fermentation) ou provoquée (par addition de SO₂). La quantité de sucres résiduels totaux représentée par la somme de D-glucose et de D-fructose est dosée afin d'estimer la teneur en sucres du vin. Cette concentration peut aller jusqu'à 200 g.L⁻¹.

Le vin doit contenir au minimum 13° alcoolique pour 50 g.L⁻¹ de sucres.

3.1. Dosage des sucres totaux du vin.

Le dosage du D-glucose et du D-fructose se fait par méthode enzymatique. Le principe de la méthode est donné dans le **document 5** et le mode opératoire dans le **document 6**.

Q7. Représenter à l'aide d'un schéma les étapes du mode opératoire. Expliquer ces différentes étapes en précisant les réactions mises en jeu, en justifiant les temps d'incubation. Rappeler le rôle du blanc.

Q8. Sachant que le vin a été dilué au 1/100, calculer sa concentration en D-glucose et D-fructose pour les variations d'absorbances suivantes :

$$\Delta A_{D\text{glucose}} = 0.730$$

$$\Delta A_{D\text{-fructose}} = 0.570$$

En déduire la teneur en sucres du vin en g.L⁻¹.

Q9. Ce dosage peut être fait par comparaison avec un étalon. Proposer une concentration pour la solution étalon de glucose qui permettrait de doser l'échantillon par cette méthode. La limite de linéarité est précisée dans le **document 6**.

3.2. Vérification de l'équilibre sucres/alcool du vin.

Après fermentation, la concentration massique en alcool (éthanol) du vin est déterminée. On obtient le résultat suivant :

$$\rho(\text{éthanol ; vin}) = 118.3 \text{ g.L}^{-1}$$

Le titre alcoométrique volumique d'un vin est le pourcentage volumique d'éthanol mesuré à une température de 20°C, c'est-à-dire le volume d'éthanol exprimé en mL pour 100mL de vin à 20°C (% V/V)

Q10. Démontrer en utilisant la formule suivante que le titre alcoométrique de ce vin est de 15% :

Donnée :

$$\text{Titre alcoométrique volumétrique} = \frac{m_{\text{éthanol}} \text{ pour } 100 \text{ mL de vin}}{\rho_{\text{éthanol}}}$$

Masse volumique de l'éthanol : $\rho_{\text{éthanol}} = 0.789 \text{ g.mL}^{-1}$

Q11. A partir de résultats obtenus en Q8 et Q10, conclure sur la qualité du vin.

4. Identification de *Botrytis cinerea* par PCR :

La technique d'amplification en chaîne par une polymérase (PCR) est utilisée pour la détection de *Botrytis cinerea* présent sur les baies de raisins. Des kits de détection rapide par PCR de *Botrytis cinerea* sont commercialisés. Le mode opératoire simplifié du kit est le suivant :

La recherche est effectuée à partir de grains de raisins pourris.

- a) Un échantillon est mis en présence de tampon de lyse et de petites billes d'acier pour détruire les cellules.
- b) La deuxième étape consiste à isoler l'ADN à partir du mélange obtenu lors de la lyse par chromatographie d'affinité.
- c) On amplifie ensuite un fragment précis de l'ADN de *Botrytis cinerea* à l'aide amorces spécifiques par PCR.
- d) Une électrophorèse en gel d'agarose 1,7% est ensuite réalisée afin de détecter les fragments amplifiés. Le fragment amplifié de *B. cinerea* est de 381 pb,

La photographie du gel soumis aux ultraviolets est présentée sur le **document 7**.

Q12. Analyser les différents échantillons A, B et C de l'électrophorégramme et identifier les baies de raisin qui seront choisies par le vendangeur pour produire du vin botrytisé.

DOCUMENT 1

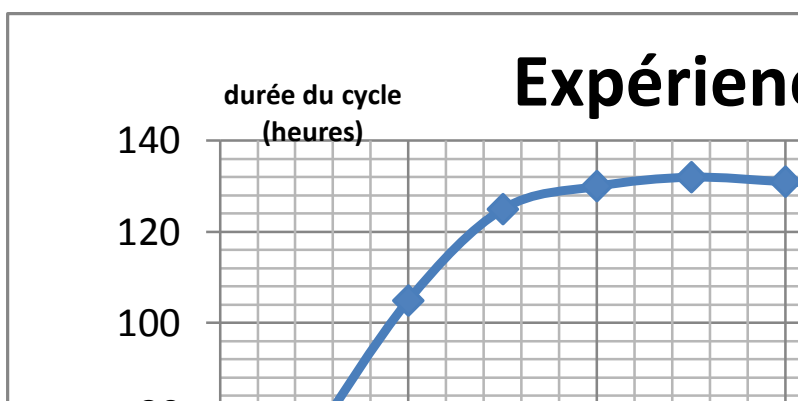
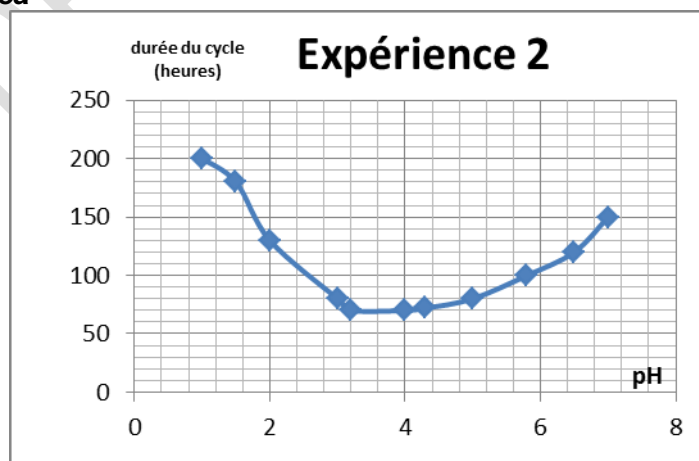
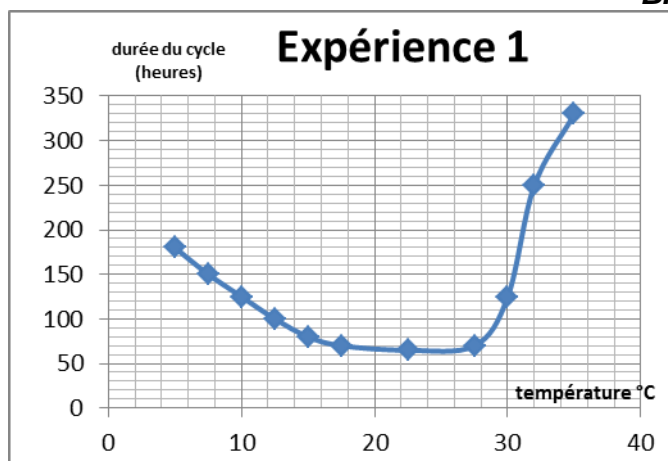
Composition des milieux synthétiques

Milieux pour expériences	Composants
Milieu de base	$\text{KH}_2\text{PO}_4 = 3 \text{ g/L}$ $\text{KCl} = 0.5 \text{ g/L}$ $\text{MgSO}_4 = 0.5 \text{ g/L}$ $\text{NaNO}_3 = 5 \text{ g/L}$ $\text{FeSO}_4 = 1 \text{ mg/L}$ $\text{ZnSO}_4 = 1 \text{ mg/L}$ $\text{CuSO}_4 = 1 \text{ mg/L}$
Expérience 1	Milieu de base
Expérience 2	glucose = 100 g/L fructose = 100 g/L acide tartrique = 5 g/L acide malique = 10 g/L
Expérience 3	Milieu de base Concentrations du mélange glucose+fructose de 50 à 400 g/L pH 3.5 Température d'incubation 20°C

Chaque milieu est réparti dans des boîtes de Pétri stériles, à raison de 10 mL/boîte.

DOCUMENT 2

Influence de la température, du pH et de la concentration en sucres (g.L^{-1}) sur le développement de *B.cinerea*



DOCUMENT 3

Données climatologiques sur le vignoble de Bordeaux

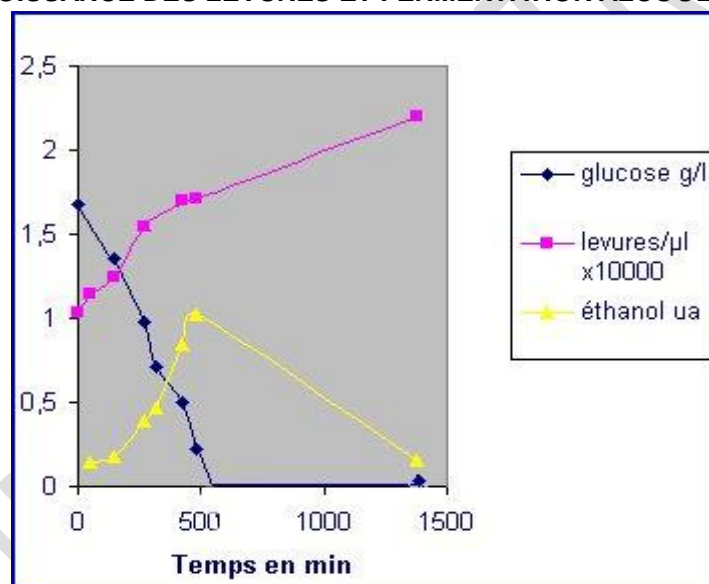
Relevés à [Bordeaux-Mérignac](#)

Mois	jan.	fév.	mar.	avr.	mai	juin.	juil.	août.	sep.	oct.	nov.	déc.	année
Température minimale moyenne (°C)	2,8	3,4	4,6	6,6	10,3	13	15,1	15,2	12,5	9,5	5,5	3,8	8,5
Température maximale moyenne (°C)	10	11,7	14,5	16,5	20,5	23,5	26,4	26,6	23,7	18,8	13,4	10,7	18,1
Ensoleillement (h)	107	114	180	177	222	225	243	243	183	134	91	72	1 992
Précipitations (mm)	92	83	70	80	84	64	55	60	90	94	107	107	984,2

Source : Météo-France¹⁴.

DOCUMENT 4 :

CROISSANCE DES LEVURES ET FERMENTATION ALCOOLIQUE



DOCUMENT 5

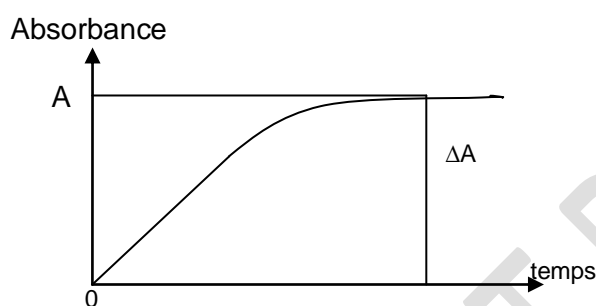
Dosage de substrats par voie enzymatique

Grâce à leur **spécificité**, les enzymes sont d'excellents réactifs pour le dosage de leur substrat. Il existe deux méthodes de dosage de substrats par voie enzymatique : **la méthode cinétique et la méthode en point final**.

Pour effectuer la mesure, on utilise ici **la méthode en point final** : la réaction est poursuivie jusqu'à son terme car elle peut être, dans ces conditions, totale. Les enzymes sont placées en excès et donc nous ne sommes pas à V_{max} .

La méthode consiste à mesurer la différence d'absorbance entre le temps zéro, qui correspond au démarrage de la réaction et le temps t qui correspond à la fin de la réaction. Si la transformation du substrat en produit est totale, **la différence d'absorbance est proportionnelle à la concentration en substrat**.

GRAPHE



Il faut donc attendre suffisamment pour la fin de la réaction.

- **Contrainte de température** : il faut qu'elle soit suffisante pour que, dans la durée choisie, la réaction soit totale. Elle n'a pas à être absolument constante et on ne travaille pas forcément à température optimale.
- **Contrainte de pH** : le pH doit être adéquat sans forcément être optimal, mais permettre la fin de la réaction dans la durée impartie. Il n'a pas à être fixe.

Dans le cas du dosage du D-glucose et D-Fructose la réaction principale est la réaction catalysée par la **Glucose-6-phosphate déshydrogénase ; G6P-DH (réaction 4 dans le document 5)** qui produit du **NADPH+H⁺**. Ce composé a comme propriété d'absorber la lumière à **340nm**. Les absorbances seront donc mesurées à cette longueur d'onde.

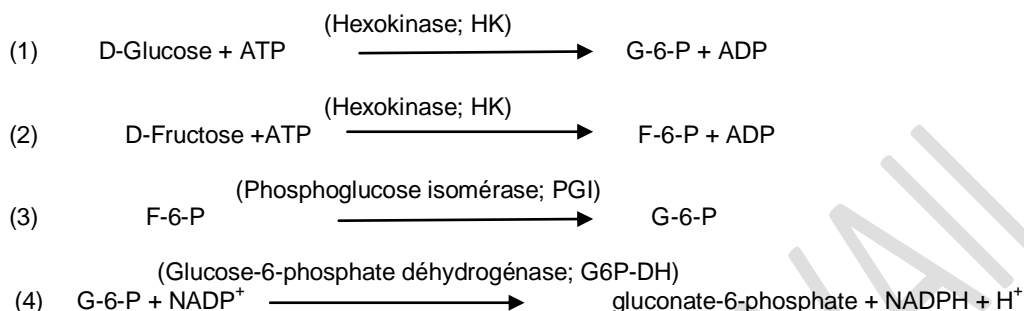
Pour pouvoir convertir la différence d'absorbance en concentration D- glucose ou D- fructose on applique **la loi de Beer-Lambert**.

DOCUMENT 6

Kit Glucose/Fructose

Ce kit est approprié pour la mesure spécifique de D-glucose et le D-fructose dans des vins, des boissons, des produits alimentaires

PRINCIPE:



REACTIFS

R1 : 1 x 30 mL – tampon pH 7.5 / NADP⁺ 70 mg / ATP 90 mg

R2 : 1 x 0,6 mL - HK 160 U / G-6-PDH 200 U

R3 : 1 x 0,6 mL - PGI 380 U

Préparation de l'échantillon :

La concentration en D-Glucose/D-Fructose dans l'échantillon utilisé pour l'essai doit être comprise entre 0,05 et 0,8 g/l

Procédure d'essai :

Longueur d'onde: 340nm / Trajet optique: 1cm / Température: 20-37 °C

	Blanc	Echantillon
R1 (mL)	1	1
Eau distillée (mL)	2	1.9
Echantillon(mL)	0	0.1
A1 Agiter et lire l'absorbance contre le blanc A1		
R2(mL)	0.02	0.02
Agiter, attendre 15min et lire l'absorbance contre le blanc A2		
R3 (mL)	0.02	0.02
Agiter, attendre 15min et lire l'absorbance contre le blanc A3		

CALCULS

$$\Delta A_{\text{D-glucose}} = A2 - A1$$

$$\Delta A_{\text{D-fructose}} = A3 - A2$$

Soit, dans les conditions de l'essai :

$$C = 0,8636 \times \Delta A \text{ [g/l de D-Glucose dans l'échantillon]}$$

$$C = 0,8693 \times \Delta A \text{ [g/l de D-Fructose dans l'échantillon]}$$

Le résultat doit être multiplié par le facteur de dilution F, si nécessaire.

Instruction de stockage et stabilité des réactifs :

Les réactifs sont stables jusqu'à la date d'expiration indiquée, s'ils sont stockés entre 2 et 8 °C.

Précaution :

Ne pas avaler. Eviter tout contact avec la peau et les muqueuses.

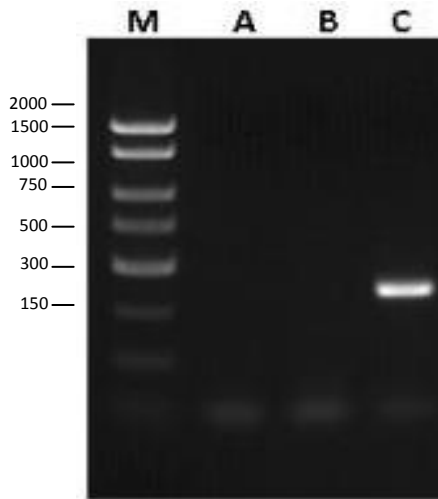
Prendre les précautions nécessaires vis-à-vis de l'utilisation de réactifs de laboratoire.

Informations générales de préparation de l'échantillon :

Utiliser des échantillons liquides transparents, clairs

Document 7

Électrophorèse en gel d'agarose 1,7 %



Dépôts effectués :

M : marqueur de taille (en pb)

A : grains de raisins sains

B : grains de raisins avec une pourriture blanche

C : grains de raisins avec une pourriture grise

TABLEAU D'ÉVALUATION

REPÈRES	OBJECTIFS DE FORMATION ET SUPPORTS THÉORIQUES ET COMPETENCES	ELEMENTS D'ÉVALUATION	C1 Extraire informations			C2 Analyser documents			C3 Expliquer démarche			C4 Argumenter réponse			C5 Construire synthèse			C6 S'exprimer à l'écrit		
			I	A	M	I	A	M	I	A	M	I	A	M	I	A	M			
Q1	La durée du cycle de développement du champignon dépend des conditions environnementales.	Identifie, à partir des graphes, les valeurs optimales en prenant compte que la durée du cycle du développement de la moisissure est minimale pour des conditions optimales de développement																		
Q2	Formuler une réponse argumentée.	Met en relation les valeurs optimales des paramètres avec des données climatologiques (document 3) et des valeurs de pH de l'énoncé																		
Q3	Formule du taux de croissance népérien.	Réalise le calcul à partir de valeurs données. (0,09h ⁻¹)																		
Q4	Conditions de croissance	compare les deux taux de croissance qui sont très proches donc les conditions de croissances notamment la température sont satisfaisantes.																		
Q5	Fermentation alcoolique, description du phénomène, durée	Détermine le moment de la fin de la fermentation alcoolique (500 min).																		
		Analyse les 3 courbes de la représentation graphique, en début de processus, pour en déduire la transformation du glucose en éthanol lors de la fermentation alcoolique en même temps que l'augmentation de la biomasse.																		
Q6	Consommation de l'éthanol	Analyse le graphe et en déduit l'utilisation de l'éthanol comme substrat pour produire de la biomasse après épuisement du glucose.																		
Q7	Dosage de substrat par voie enzymatique en point final	Schématise le mode opératoire (représentation compréhensible des, étapes, explication des réactions, rôle du blanc).																		
Q8	Dosage des sucres	Effectue les calculs en utilisant le document 6.																		
		Respecte les unités.																		
		applique la démarche d'addition des quantités de glucose et de fructose pour déterminer la teneur en sucres totaux dans le vin. (63 + 49.5 =112,5g/L)																		

DOCUMENT DE TRAVAIL