Ce document a été mis en ligne par l'organisme FormaV®.

Toute reproduction, représentation ou diffusion, même partielle, sans autorisation préalable, est strictement interdite.

Pour en savoir plus sur nos formations disponibles, veuillez visiter :
formav.co/explorer

BTS BIOALC • CORRIGÉ DÉTAILLÉ

BTS BioAlc

Biochimie et technologies d’analyse

Session 2018 • Code sujet : **BAE3BT** • Durée : **3 heures** • Coefficient : **3**

Sommaire

Cliquez sur une partie pour y accéder directement

1. Préparation de l’extrait coagulant végétal (4 questions) **Page 3**

2. Purification et suivi de la protéine d’intérêt (7 questions) **Page 5**

3. Caractéristiques structurales et cinétiques de la protéase (4 questions) **Page 8**

4. Fermentation du lactose et coagulation végétale (2 questions) **Page 11**

5. Ce qu’il faut retenir & Questions fréquentes (FAQ) (Synthèse & Q&A Examen) **Page 12**

Sujet officiel (PDF) : https://btsbioalc.fr/assets/annales/bts-bioalc/E3 - Gestion opérationnelle et documentaire du laboratoire/2018/BTS BioAlc - E3 - Gestion opérationnelle et documentaire du laboratoire - Session 2018 - 1-Sujet.pdf

1. Préparation de l’extrait coagulant végétal

L’étude porte sur la préparation d’un extrait protéique coagulant issu des fruits du dattier du désert, envisagé comme substitut végétal à la présure. Le schéma retrace l’extraction à froid, la précipitation au sulfate d’ammonium, la dialyse, l’ultrafiltration et la décoloration.

Question Q1. Expliquer pourquoi les manipulations de la première étape d’extraction sont réalisées à 4 °C et en milieu tamponné.

Le maintien à 4 °C ralentit les réactions enzymatiques susceptibles de dégrader la protéine coagulante, notamment la protéolyse et l’autolyse. Le froid freine aussi le développement des microorganismes. Il aide donc à préserver la structure et l’activité des protéines durant la macération, la trituration et la centrifugation. Le tampon phosphate de sodium maintient un pH stable, fixé ici à 6. Cette stabilité limite les variations de charge et les modifications de conformation qui pourraient altérer la solubilité ou l’activité de la protéine extraite.

> ✓ RÉPONSE À RETENIR
>
> À 4 °C, les protéines sont moins dégradées; le tampon phosphate maintient le pH à 6 et contribue à préserver leur structure et leur activité.

Question Q2. Nommer et expliquer le mécanisme par lequel le sulfate d’ammonium provoque la précipitation des protéines, puis préciser le contenu attendu du surnageant et du culot après centrifugation.

La précipitation correspond au relargage, ou « salting out ». À forte concentration, le sulfate d’ammonium mobilise une grande part de l’eau disponible et augmente la force ionique du milieu. Les protéines perdent une partie de leur couche d’hydratation, deviennent moins solubles, s’agrègent et précipitent. Après centrifugation, la répartition attendue est la suivante :

- **Culot :** protéines précipitées, dont la protéine d’intérêt d’environ 70 kDa, ainsi que d’autres protéines.
- **Surnageant :** sulfate d’ammonium, molécules solubles et protéines qui n’ont pas précipité.

> ✓ RÉPONSE À RETENIR
>
> Le relargage précipite des protéines dans le culot, dont la protéine d’intérêt; le surnageant conserve le sel et les composés ainsi que les protéines encore solubles.

Question Q3. Indiquer le rôle de la dialyse réalisée après solubilisation du culot dans le tampon phosphate.

La dialyse élimine le sulfate d’ammonium résiduel après la précipitation et permet de placer les protéines dans le tampon phosphate de sodium à pH 6. La membrane du boudin retient les protéines, tandis que les ions et les autres petites molécules peuvent diffuser vers le bain.

1. Le sulfate d’ammonium et les petites molécules traversent la membrane.
2. Le renouvellement du bain maintient leur diffusion hors du boudin.

3. Les protéines restent dans le boudin, en solution dans le tampon, avant l'ultrafiltration.

> **✓ RÉPONSE À RETENIR**
>
> La dialyse désalinise l'échantillon et échange le milieu contre le tampon phosphate, tout en retenant les protéines dans le boudin.

Question Q4. Indiquer le but de l'ultrafiltration avec une membrane de seuil de coupure de 10 000 Da et expliquer la composition qualitative du rétentat et du perméat.

L'ultrafiltration concentre les protéines en retenant principalement les molécules dont la masse moléculaire dépasse le seuil de coupure de 10 000 Da. La protéine d'intérêt, de masse approximative 70 kDa, est donc attendue dans le rétentat. La séparation reste qualitative : d'autres protéines de grande taille y sont aussi retenues.

Fraction	Composition qualitative attendue
Rétentat	Protéine d'intérêt et autres protéines retenues par la membrane
Perméat	Eau, ions du tampon et petites molécules passant à travers la membrane

> **✓ RÉPONSE À RETENIR**
>
> L'ultrafiltration concentre les protéines dans le rétentat; le perméat contient principalement l'eau, les ions et les petites molécules passant le seuil de 10 000 Da.

2. Purification et suivi de la protéine d’intérêt

L’extrait brut concentré est purifié par chromatographie d’échange d’ions sur Q-Sepharose, puis les fractions sont étudiées par dosage des protéines et des activités coagulante et protéolytique. Les supports comprennent un chromatogramme, des protocoles expérimentaux et des tableaux de résultats.

Question Q5. Exposer le principe de la chromatographie d’échange d’ions avec la Q-Sepharose. Expliquer l’élution par gradient discontinu de NaCl et présenter une méthode alternative d’élution fondée sur une propriété physico-chimique des protéines.

La Q-Sepharose porte des groupements ammonium quaternaire positifs : c’est un échangeur d’anions fort. À pH 8, les protéines négatives peuvent s’y fixer, tandis que les protéines non retenues sont éluées en premier. Les paliers de NaCl augmentent la force ionique : les ions chlorure concurrencent les protéines pour les charges de la résine et favorisent leur élution. Une autre méthode consiste à modifier le pH, ce qui change la charge nette des protéines et peut réduire leur interaction avec la résine, notamment près de leur point isoélectrique.

> ✓ **RÉPONSE À RETENIR**
>
> Q-Sepharose est un échangeur d’anions fort. Élution par compétition avec Cl^- ou par modification du pH.

Question Q6. Analyser le profil d’élution pour déduire une caractéristique physico-chimique des protéines du pic 1 par rapport à celles des trois autres pics.

Le pic 1 sort avant les paliers d’augmentation du NaCl : ses protéines ne sont donc pas retenues, ou seulement très faiblement, sur la Q-Sepharose. À pH 8, elles sont moins négatives que les protéines des pics 2, 3 et 4, retenues puis éluées quand la force ionique augmente. Les protéines du pic 1 peuvent être neutres ou positives à pH 8 ; dans ce dernier cas, leur point isoélectrique est supérieur à 8. Le profil permet donc de conclure à une charge nette moins négative, sans déterminer à lui seul leur pI exact.

> ✓ **RÉPONSE À RETENIR**
>
> À pH 8, les protéines du pic 1 sont moins négatives que celles des pics 2, 3 et 4 ; elles peuvent être neutres ou positives.

Question Q7. À partir du protocole de coagulation du lait et de la définition de l’unité coagulante, démontrer la formule donnant la concentration d’activité coagulante en $U \cdot mL^{-1}$ d’extrait.

Le test mélange 0,2 mL d’extrait à 1 mL de lait. Par définition, 1 U coagule 1 mL de lait en 60 min ; pour un temps mesuré de coagulation de t minutes, l’activité présente dans les 0,2 mL d’extrait est donc 60/t U. Pour obtenir l’activité par mL d’extrait, on divise par 0,2 mL, soit un facteur 5. Ainsi, la concentration d’activité vaut (60/t) × 5 $U \cdot mL^{-1}$ d’extrait. Pour l’EB, t = 160 min, ce qui donne 1,875 $U \cdot mL^{-1}$.

> ✓ **RÉPONSE À RETENIR**
>
> Concentration d’activité coagulante = (60 / temps de coagulation) × 5, en $U \cdot mL^{-1}$ d’extrait.

Question Q8. Établir les équations aux grandeurs permettant de calculer, pour chaque fraction, l'activité coagulante spécifique et le facteur d'enrichissement par rapport à l'extrait brut. Établir les équations aux valeurs numériques pour l'EBC, commenter les valeurs obtenues et formuler une hypothèse sur la fraction contenant la protéine d'intérêt.

Pour chaque fraction, l'activité spécifique rapporte l'activité coagulante par mL à la concentration protéique par mL. Le facteur d'enrichissement compare cette activité spécifique à celle de l'EB. Les unités se simplifient en $U \cdot mg^{-1}$ pour l'activité spécifique ; le facteur est sans unité.

Grandeur	Équation aux grandeurs	Application à l'EBC
Activité spécifique		$15 / 4{,}56 = 3{,}29\ U \cdot mg^{-1}$
Facteur d'enrichissement		$3{,}29 / 6{,}93 = 0{,}47$

L'EBC est concentré en activité par volume, mais son activité spécifique et son facteur d'enrichissement sont inférieurs à ceux de l'EB. La fraction du pic 3 est l'hypothèse la plus probable pour la protéine d'intérêt : elle présente les valeurs les plus élevées au cours de la purification.

✓ RÉPONSE À RETENIR

EBC : activité spécifique = $3{,}29\ U \cdot mg^{-1}$; facteur d'enrichissement = 0,47. La protéine d'intérêt est probablement dans le pic 3.

Question Q9. Évaluer les situations exposant à un risque chimique lors de la mesure colorimétrique et établir les mesures de prévention à mettre en œuvre.

La préparation et l'emploi de l'ATCA à 10 % et de la soude à 4 % exposent à des projections corrosives, avec risque de brûlures cutanées et de lésions oculaires graves. L'ATCA peut aussi irriter les voies respiratoires et présente un danger important pour les organismes aquatiques. Les ajouts, la neutralisation et l'élimination des solutions sont des situations exposantes.

- Porter blouse, lunettes de protection et gants compatibles avec les produits.
- Manipuler l'ATCA sous hotte et réaliser les ajouts lentement pour limiter les projections.
- Éliminer les déchets dans une filière dédiée aux déchets chimiques, sans rejet à l'évier.

✓ RÉPONSE À RETENIR

Équipements de protection, manipulation de l'ATCA sous hotte, prévention des projections et collecte dédiée des déchets chimiques.

Question Q10. Rappeler le principe de la méthode enzymatique « deux points » et les conditions opératoires à respecter pour mesurer une activité enzymatique. Présenter sous forme de tableau le mode opératoire des témoins et d'un échantillon, puis donner le rôle du témoin substrat.

La méthode « deux points » compare l'absorbance au temps zéro à celle après une durée d'incubation fixée ; leur différence reflète l'hydrolyse enzymatique. Amener enzyme et substrat à 40 °C, démarrer en mélangeant, incuber 1 h, puis arrêter par l'ATCA. Après centrifugation à 8000 g pendant 5 min, neutraliser avec la soude et lire à 440 nm.

Tube	Préparation et traitement
Témoin substrat	150 µL de tampon + 250 µL de substrat ; suivre le traitement du dosage, sans enzyme.
Témoin activité t_0	150 µL d'enzyme + 250 µL de substrat ; arrêter immédiatement par 1,2 mL d'ATCA.
Échantillon	150 µL d'enzyme + 250 µL de substrat ; incuber 1 h à 40 °C, puis ajouter 1,2 mL d'ATCA.

Pour chaque tube, centrifuger, neutraliser avec 1,4 mL de NaOH à 4 % et lire à 440 nm. Le témoin substrat mesure le signal non attribuable à l'activité enzymatique, notamment le bruit de fond du substrat.

> ✓ **RÉPONSE À RETENIR**
>
> Comparer l'absorbance à t_0 et après 1 h. Le témoin substrat mesure le signal de fond non enzymatique.

Question Q11. À partir des résultats d'activité protéolytique, justifier le choix de poursuivre les manipulations sur la fraction du pic 3.

Le pic 3 présente l'activité protéolytique spécifique la plus élevée : 0,0850 $\Delta A_{440}\cdot min^{-1}\cdot mg^{-1}$, contre 0,0040 pour le pic 2, 0,0033 pour l'EBC et 0,0011 pour l'EB. Les pics 1 et 4 sont indiqués à des valeurs très inférieures à 0,0010. Cette activité nettement dominante, cohérente avec la forte activité coagulante spécifique du pic 3, justifie de poursuivre les manipulations sur cette fraction.

> ✓ **RÉPONSE À RETENIR**
>
> Le pic 3 est retenu : son activité protéolytique spécifique, 0,0850 $\Delta A_{440}\cdot min^{-1}\cdot mg^{-1}$, est la plus élevée.

3. Caractéristiques structurales et cinétiques de la protéase

La protéase du pic 3 est étudiée par SDS-PAGE en présence ou en absence de β-mercaptoéthanol, puis par analyse de son activité selon la température, le pH et la concentration en caséine. Les profils électrophorétiques et les courbes servent à caractériser sa structure et à la comparer à la chymosine.

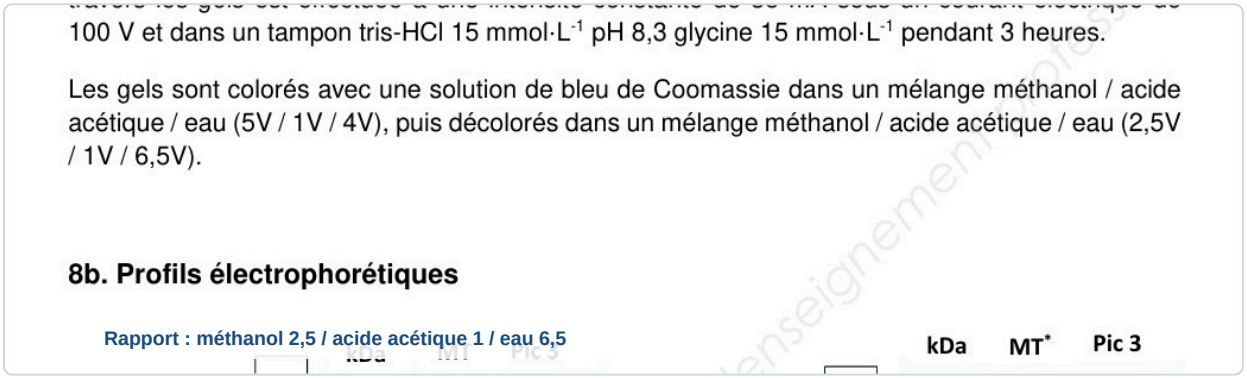
Question Q12. Calculer les volumes d'eau déminéralisée, d'acide acétique et de méthanol nécessaires pour préparer 100 mL de bain de décoloration, à partir de la composition indiquée.

Le document 8 donne le rapport méthanol / acide acétique / eau : 2,5 / 1 / 6,5. Il totalise 10 volumes. Pour préparer 100 mL, on répartit ce volume final selon la proportion de chaque composant, en divisant son nombre de volumes par 10.

Composant	Calcul	Volume
Méthanol	100 × 2,5 / 10	25 mL
Acide acétique	100 × 1 / 10	10 mL
Eau déminéralisée	100 × 6,5 / 10	65 mL

La somme des volumes calculés est bien égale au volume final demandé.

Composition du bain de décoloration


100 V et dans un tampon tris-HCl 15 mmol·L^{-1} pH 8,3 glycine 15 mmol·L^{-1} pendant 3 heures.

Les gels sont colorés avec une solution de bleu de Coomassie dans un mélange méthanol / acide acétique / eau (5V / 1V / 4V), puis décolorés dans un mélange méthanol / acide acétique / eau (2,5V / 1V / 6,5V).

8b. Profils électrophorétiques

Rapport : méthanol 2,5 / acide acétique 1 / eau 6,5

kDa MT* Pic 3

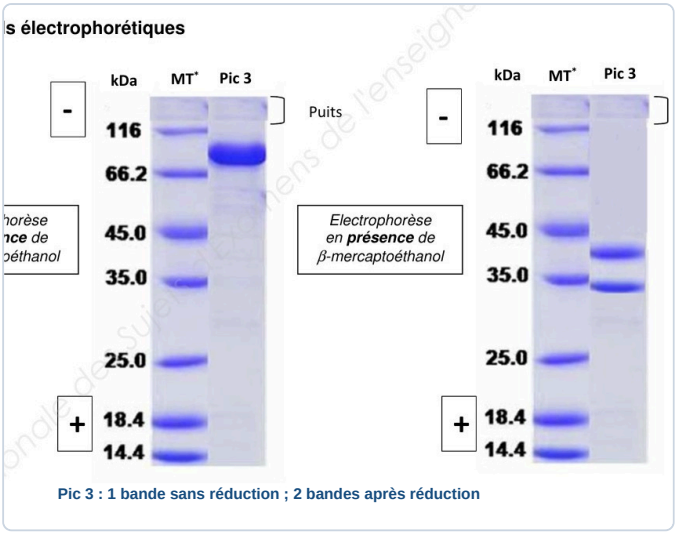
> ✓ **RÉPONSE À RETENIR**
>
> Pour 100 mL : 65 mL d'eau, 10 mL d'acide acétique et 25 mL de méthanol.

Question Q13. Expliquer les rôles respectifs du SDS et du β-mercaptoéthanol, puis analyser les profils électrophorétiques obtenus avec et sans agent réducteur afin de déduire la structure de la protéase d'intérêt.

Le SDS dénature les protéines et leur confère une charge négative, de sorte que leur migration dépend principalement de leur masse moléculaire. Le β-mercaptoéthanol réduit les ponts disulfure et dissocie les chaînes qui y sont liées.

Sans agent réducteur, le pic 3 présente une bande autour de 70 kDa. En présence de β-mercaptoéthanol, deux bandes apparaissent, autour de 40 et 33 kDa. La protéase est donc formée de deux sous-unités de masses différentes, reliées par des ponts disulfure.

Bandes observées sur les profils SDS-PAGE



Pic 3 : 1 bande sans réduction ; 2 bandes après réduction

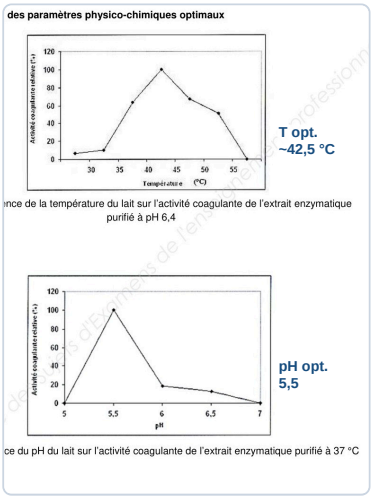
✓ **RÉPONSE À RETENIR**

La protéase est un hétérodimère d'environ 70 kDa dont les deux chaînes sont reliées par des ponts disulfure.

Question Q14. À partir des courbes d'influence de la température et du pH sur l'activité coagulante, déduire la température optimale et le pH optimal de la protéase.

La courbe 1 montre un maximum d'activité vers 42,5 °C, pour le lait à pH 6,4. La courbe 2 atteint son maximum à pH 5,5, pour une température de 37 °C. Ces valeurs sont les optima lus dans les conditions expérimentales indiquées ; elles ne correspondent pas à une mesure simultanée des deux paramètres.

Optima lus sur les courbes d'activité



nce de la température du lait sur l'activité coagulante de l'extrait enzymatique purifié à pH 6,4

ce du pH du lait sur l'activité coagulante de l'extrait enzymatique purifié à 37 °C

✓ **RÉPONSE À RETENIR**

Température optimale : environ 42,5 °C. pH optimal : 5,5.

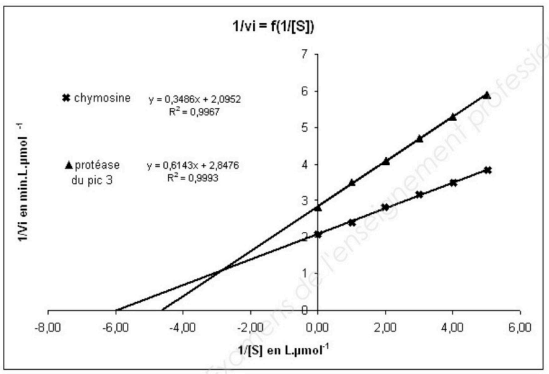
Question Q15. Déterminer et comparer les paramètres cinétiques des deux enzymes à partir de la représentation en coordonnées inverses, puis discuter l'utilisation éventuelle de la protéase végétale en remplacement de la présure.

Pour une droite de Lineweaver-Burk, l'ordonnée à l'origine vaut $1/V_{max}$ et la pente vaut K_m/V_{max}. Ainsi, V_{max} est l'inverse de l'ordonnée à l'origine et K_m est le rapport pente / ordonnée à l'origine. Les coefficients sont lus directement sur les équations des droites du document.

Enzyme	V_{max} (µmol·L^{-1}·min^{-1})	K_m (µmol·L^{-1})
Chymosine	1 / 2,0952 = 0,477	0,3486 / 2,0952 = 0,166
Protéase du pic 3	1 / 2,8476 = 0,351	0,6143 / 2,8476 = 0,216

La protéase végétale a une vitesse maximale plus faible et un K_m plus élevé, donc une affinité apparente moindre pour la caséine. Son activité coagulante en fait une candidate possible, mais elle n'est pas cinétiquement équivalente à la chymosine.

Paramètres cinétiques déduits des droites



Chymosine : Vmax 0,477 ; Km 0,166

Pic 3 : Vmax 0,351 ; Km 0,216

✓ RÉPONSE À RETENIR

Chymosine : $V_{max} \approx 0,477$ et $K_m \approx 0,166$. Protéase végétale : $V_{max} \approx 0,351$ et $K_m \approx 0,216$. Substitut possible, mais moins performant cinétiquement.

4. Fermentation du lactose et coagulation végétale

Le sujet envisage d'associer l'extrait coagulant végétal à la bactérie lactique indiquée dans l'énoncé afin d'améliorer le rendement fromager. Le document métabolique présente le transport et la transformation du lactose jusqu'au lactate, notamment les étapes de phosphorylation et la régénération du NAD^+.

Question Q16. Préciser dans quelles conditions la voie fermentaire est prépondérante et discuter l'intérêt métabolique de la dernière étape de cette fermentation.

La voie fermentaire devient prépondérante lorsque le dioxygène manque ou que sa disponibilité ne permet pas la respiration. Selon le document 10, le pyruvate est alors réduit en lactate par le $NADH,H^+$. Cette dernière réaction réoxyde le $NADH,H^+$ en NAD^+, coenzyme nécessaire à la glycolyse. La glycolyse peut donc se poursuivre et fournir de l'ATP. Le lactate produit acidifie le lait et favorise sa coagulation.

> ✓ **RÉPONSE À RETENIR**
>
> En conditions pauvres en O_2, la formation de lactate régénère le NAD^+, permettant la poursuite de la glycolyse et l'acidification du lait.

Question Q17. Établir, en détaillant le raisonnement et à partir du schéma métabolique, le bilan moléculaire de la transformation d'une molécule de lactose en acide lactique.

Le lactose phosphorylé est scindé en glucose et galactose, deux sucres à six carbones. Chacun suit la voie jusqu'à deux pyruvates, ensuite réduits en lactate. La réaction consomme de l'eau pour le bilan moléculaire et régénère le NAD^+ consommé dans la glycolyse. D'après les étapes ATP du schéma, huit ATP sont formés et quatre consommés, soit un gain net de quatre ATP.

$$\mathbf{C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O \rightarrow 4\ C_3H_6O_3}$$

> ✓ **RÉPONSE À RETENIR**
>
> 1 lactose + 1 H_2O → 4 acides lactiques, avec un gain net de 4 ATP par lactose.

Ce qu'il faut retenir de ce sujet (Session 2018)

Bilan de l'épreuve : Épreuve BTS Bioanalyses et contrôles, unité U31 Biochimie et technologies d'analyse, session 2018, code BAE3BT, durée 3 heures, coefficient 3. Elle étudie un extrait coagulant protéolytique des fruits du dattier du désert : préparation, purification et caractérisation structurale et cinétique. Elle aborde aussi la fermentation du lactose et évalue l'analyse de protocoles, de résultats et de procédés.

Notions-clés, formules & règles à maîtriser

- Le sulfate d'ammonium provoque le relargage des protéines en diminuant leur solubilité.
- La Q-Sepharose est un échangeur d'anions à charges fixes positives qui retient les protéines négatives au pH de travail.
- L'activité spécifique correspond à l'activité enzymatique rapportée à la masse de protéines, en $U \cdot mg^{-1}$.
- La réduction du pyruvate en lactate régénère le NAD^+ nécessaire à la poursuite de la glycolyse.

Points de vigilance & attentes du jury

- Distinguer culot et surnageant, puis rétentat et perméat, en reliant chaque fraction à l'opération effectuée.
- Interpréter le chromatogramme en reliant charge des protéines, pH du tampon et concentration en NaCl.
- Vérifier les unités, les volumes et le facteur de dilution dans les calculs d'activité.
- Comparer les profils SDS-PAGE avec et sans agent réducteur avant de conclure sur les sous-unités et les ponts disulfure.

Questions fréquentes sur cette épreuve (Q&A Examen)

Q : Comment calculer la concentration d'activité coagulante à partir du temps mesuré ?

La formule donnée est C = (60 / t) × 5, où t est le temps de coagulation en minutes. Le facteur 5 correspond au rapport entre le volume de lait testé, 1 mL, et le volume d'extrait ajouté, 0,2 mL.

Q : Comment interpréter l'élution sur Q-Sepharose avec un gradient de sel ?

La Q-Sepharose porte des charges positives et retient les protéines négatives dans les conditions de l'essai. Le NaCl concurrence les interactions ioniques et permet l'élution des protéines retenues, selon leur affinité pour la résine.

Q : Le sujet indique-t-il un barème ou un temps conseillé pour chaque partie ?

Aucun barème par partie ni temps conseillé par exercice n'est indiqué. L'épreuve dure trois heures et son coefficient est 3. La page de garde répartit les points entre compétences évaluées, avec trois points réservés à la qualité de l'expression et de la présentation.

Q : Quels critères de sécurité et de qualité expérimentale retenir pour le dosage à l'azocaséine ?

L'ATCA et la soude peuvent provoquer de graves brûlures : prévenir les projections et utiliser les protections adaptées. Respecter les volumes, la température, les durées, la centrifugation et les témoins pour obtenir des résultats interprétables.

Sujet officiel associé (PDF) : https://btsbioalc.fr/assets/annales/bts-bioalc/E3 - Gestion opérationnelle et documentaire du laboratoire/2018/BTS BioAlc - E3 - Gestion opérationnelle et documentaire du laboratoire - Session 2018 - 1-Sujet.pdf

Ressources BTS BioAlc : Toutes les annales & corrigés • Fiches de révision complètes • Simulateur de notes d'examen

Copyright © 2027 FormaV®. Tous droits réservés.

FormaV® est une marque déposée auprès de l'INPI sous le numéro 5227897.

Ce document a été élaboré par FormaV® avec le plus grand soin afin d'accompagner chaque apprenant vers la réussite de ses examens. Son contenu (textes, graphiques, méthodologies, tableaux, exercices, concepts, mises en forme) constitue une œuvre protégée par le droit d'auteur.

Toute copie, partage, reproduction, diffusion ou mise à disposition, même partielle, gratuite ou payante, est strictement interdite sans accord préalable et écrit de FormaV®, conformément aux articles L.111-1 et suivants du Code de la propriété intellectuelle. Dans une logique anti-plagiat, FormaV® se réserve le droit de vérifier toute utilisation illicite, y compris sur les plateformes en ligne ou sites tiers.

En utilisant ce document, vous vous engagez à respecter ces règles et à préserver l'intégrité du travail fourni. La consultation de ce document est strictement personnelle.

Merci de respecter le travail accompli afin de permettre la création continue de ressources pédagogiques fiables et accessibles.