

**BTS QUALITE DANS LES INDUSTRIES ALIMENTAIRES
ET LES BIO-INDUSTRIES**

Epreuve : Techniques d'analyses et de contrôles

Modifications sujet à donner oralement aux candidats le jour de l'épreuve

- **Sujet codé QATAC A1 du Mardi 1^{er} juin de 14h00 à 19h00 :**

Page 2/6 Question 3.1 : lire Réaliser les examens macroscopiques et microscopiques au lieu de Réaliser le(s) examen(s) microscopique(s)

Page 2/6 Question 3.2 Proposer sur l'annexe 1 une orientation de diagnostic

E52 – Technique d'analyse et de contrôles

MICROBIOLOGIE

Matière d'œuvre

Premier jour

Etuves à 37°C

Etuves à 30°C

Par candidat :

1. Contrôle de la viabilité et dénombrement du levain avant inoculation du moût.

- 5 mL de bouillon Sabouraud ou équivalent avec $2,5 \text{ à } 3 \cdot 10^7$ levures. mL^{-1}
(Bouillon Sabouraud avec *Saccharomyces* cultivé pendant 24 heures à 30°C) noté P_x conservée au réfrigérateur.
- un tube contenant 9 mL d'eau physiologique stérile
- un tube à hémolyse stérile
- 3 pipettes graduées stériles de 1 mL ou équivalent
- un tube à hémolyse contenant 1 mL de bleu de méthylène tamponné de Funk :

Bleu de méthylène à 0,2% en solution aqueuse	100mL
Tampon phosphate 0,2 mole. L^{-1} p H 7	100mL
- une cellule de Malassez + lamelle adaptée
- une pipette Pasteur stérile
- document : fiche technique de la cellule de Malassez
- un bac d'eau de javel en paillasse latérale

2. Dénombrement des micro- organismes du moût en fermentation.

- 5 mL de bouillon Sabouraud ou équivalent avec $1,5 \cdot 10^6$ levures. mL^{-1}
(Bouillon Sabouraud avec *Saccharomyces* cultivé pendant 24 heures à 30°C puis dilué) notés M_x , conservée au réfrigérateur.
- 6 tubes contenant 9 mL d'eau physiologique stérile
- 6 pipettes graduées stériles de 1 mL + système d'aspiration ou système équivalent (selon disponibilité du centre)
- 6 géloses YGC ou OGA coulées et sèches
Gélose YGC chez Sanofi Diagnostics Pasteur : 64 104
- Billes ou étaleur
- Système de prélèvement pour 9-10 mL

3. Identification d'un contaminant isolé d'un moût en fermentation

- Une gélose nutritive avec isolement notées C_x d'une souche d'entérobactérie ; 3 souches différentes seront distribuées dans un même laboratoire *Proteus*, *Klebsiella*, *E.coli*.
 - un tube à hémolyse stérile
 - un tube d'eau distillée stérile $V = 5 \text{ mL}$
 - colorants de Gram, lames, papier filtre
 - pipettes Pasteur stériles
 - 1 disque d'oxydase
 - H_2O_2
- } A disposition au milieu de la paillasse ou 1 kit pour 2

A distribuer après avoir ramassé l'annexe 1 :

- une galerie API 20^E
- une gélose nutritive en boîte de Petri
- un tube contenant 5 mL d'eau distillée stérile
- une gélose VF en surfusion
- un étalon de 0, 5 de Mac Farland à disposition
- un mode opératoire pour ensemer la galerie API 20 E
- document fournisseur Api

Deuxième jour :

- réactifs de lecture de la galerie API 20 E
- une fiche de lecture API 20 E
- un tableau API 20 E ou programme ordinateur ou catalogue.
- une notice de lecture de la galerie Api 20E.(document fournisseur)
- un document avec la formule AFNOR de calcul de la moyenne pondérée.

BIOCHIMIE Matière d'œuvre
--

1. Réactifs et matériel par candidat.

- **Solution étalon mère de fer à 0,100 g.L⁻¹** **15 mL**
Solution à 0,7022 g de sel de Mohr ($M = 392,13 \text{ g.mol}^{-1}$) par litre.
Ajouter 50 mL d'acide sulfurique concentré avant d'ajuster au litre avec eau distillée afin d'augmenter la stabilité de la solution.
- **Echantillon de bière dégazée étiqueté B** **50 mL**
Bière blonde dégazée, type Heineken Prestige 920 mL + 80 mL de solution étalon mère de fer à 0,100 g.L⁻¹. L'échantillon de bière ainsi préparé présentera une concentration en fer voisine de 8 mg de fer par L.
- **Echantillon de bière sans alcool dégazée étiqueté BS** **5 mL**
Bière blonde sans alcool, type Tourtel.
- **Solutions témoins de glucides à 2 g.L⁻¹** **2 mL de chaque solution répartie en tube à hémolyse**
Glucose, maltose, saccharose, fructose, maltotriose.

- Fiole jaugée de 50 mL 1
- Pipettes jaugées de 5 mL 2
- Pipettes graduées de 5 mL au 1/100 2
- Portoir pour pipette 1
- Bêchers de 100 ou 150 mL 2
- Bécher de 250 mL 1
- Tubes à essais 10
- Portoir pour tubes à essais 1
- Cuves pour spectrophotométrie 10
- Portoir pour cuve de spectrophotométrie 1
- Pissette d'eau distillée 1
- Papier filtre
- Papier Joseph
- Plaques chromatographiques (gel de silice sur support aluminisé) 100 x 100 mm 1
- Cuve chromatographique pour migration 1
- Capillaires 8
- Thermoventilateur 1 pour 2 candidats
- Compte-gouttes ou Pipettes molles 3
- Parafilm
- Dessicateur (pour chromatoplaque réactivée)

2. Réactifs et matériel collectifs

- **Solution d'hydroquinone à 2 g.L⁻¹ (T, R : 45-20/22, S : 53-24/25-39-45)** **15 mL par candidat**
Dissoudre à chaud, 2 g d'hydroquinone dans 1 litre de tampon acétate de pH = 4,5 à 0,1 mol.L⁻¹
Soit 650 mL d'acide acétique à 0,1 mol.L⁻¹ + 350 mL d'acétate de sodium à 0,1 mol.L⁻¹.
Placer le réactif nécessaire à l'ensemble de la salle, sous la hotte, en flacon distributeur réglé sur 1 mL.
- **Réactif à l'orthophénanthroline à 5 g.L⁻¹ (S : 22-24/25)** **30 mL par candidat**
Solution à 5 g de chlorhydrate d'orthophénanthroline par litre.
Placer le réactif nécessaire à l'ensemble de la salle, sous la hotte, en flacon distributeur réglé sur 2 mL.

- Solvant de chromatographie **20 mL par candidat**

(F, C, Xi, R : 10-11-23/24/25-35-36-36-66-67, S : 7-9-16-26-36/37/39-45-66-67)

- Méthyléthylcétone: 3 vol ;
- Acide acétique: 1 vol ;
- Méthanol: 1 vol.

- Révélateur : Mélange extemporané d'aniline et de diphénylamine en milieu acide phosphorique

(C, F, T, R : 11-20/21/22-23/24/25-33-34-40-48-50/53, S : 7-16-26-28-36/37-45-60-61)

- Confection du révélateur :
- Solution A : - 0,5 mL d'aniline
 - 0,5 g de diphénylamine
 - 25 mL d'éthanol à 95 %
 - Solution B : - 5 mL d'acide phosphorique pur
 - 25 mL d'éthanol à 95 %

Mélanger extemporanément les solutions A et B. Mettre à disposition sous la hotte dans un récipient permettant l'immersion des chromatoplaques (boîte de pétri carrée, 120 mm * 120 mm par exemple).

Prévoir un poste de révélation sous la hotte avec une « rampe » de séchage vertical des chromatoplaques ~~en carton~~. Une pince brucelle pour manipuler les chromatogrammes.

- | | |
|---|-------------|
| - Spectrophotomètres ($\lambda = 490 \text{ nm}$) + Notices d'utilisation | 2 par salle |
| - Bidon de récupération des déchets liquides | 1 |
| - Etuve. Point de consigne + 120°C | 1 |
| - Ballon de récupération spécifique pour les solvants | 1 |
| - Réfractomètres+ Notices d'utilisation | 2 par salle |

**BTS QUALITÉ DANS LES INDUSTRIES ET
LES BIO-INDUSTRIES**

Session 2004

U52 – TECHNIQUES D'ANALYSE ET DE CONTRÔLES

Durée : 6 heures

Coefficient : 3

BTS Qualité dans les industries alimentaires et les bio- industries

Session 2004

U 52 : Techniques d'analyse et de contrôle

Durée : 6 heures

Coefficient : 3

Premier jour : 5 heures

LA BIÈRE

La plupart des bières sont préparées à partir d'orge. Lors du maltage, les grains d'orge sont mis à germer, il y a synthèse d'enzymes. L'orge malté est ensuite brassé dans de l'eau à 67°C pendant plusieurs heures. Les enzymes synthétisées lors du maltage catalysent l'hydrolyse de l'amidon et de protéines. La partie aqueuse, appelée moût, est séparée des restes des grains et additionnée de houblon. Le moût est alors stérilisé puisensemencé avec une souche de *Saccharomyces*, qui effectue la fermentation alcoolique. Après fermentation puis maturation la bière est filtrée, pasteurisée et conditionnée.

MICROBIOLOGIE (30 points)

1. Contrôle de la viabilité et dénombrement du levain avant inoculation du moût

Pour la fermentation alcoolique, le volume d'inoculum de la préculture doit être compris entre 5 et 10% du volume total du moût et le nombre de levures viables doit être, en début de fermentation, de l'ordre de $1,5 \cdot 10^6$ Cellules. mL⁻¹.

Le contrôle de la viabilité et le dénombrement sont réalisés à partir d'une préculture P_x de *Saccharomyces* en cellule de Malassez.

1.1 Effectuer la dilution 10⁻¹ de la préculture P_x.

1.2 Dans un tube à hémolyse stérile, introduire 0,5 mL de la dilution précédente et 0,5 mL de bleu de méthylène tamponné de Funk.

Monter la préparation en cellule de Malassez.

Montrer à un examinateur cette mise en cellule.

1.3 Dénombrement du levain

Effectuer la numération : la numération d'un rectangle sera montrée à un examinateur.

Déterminer le pourcentage de viabilité ainsi que le nombre de levures viables par mL de préculture.

Expliciter le calcul et en déduire le volume de préculture à introduire pour 1 litre de moût.

Remarques :

Le bleu de méthylène tamponné de Funk colore en bleu foncé les cellules mortes. Les cellules vivantes sont peu ou pas colorées.

Un bourgeon est considéré comme une cellule si son diamètre est supérieur ou égal à la moitié du diamètre de la cellule dont il est issu.

Le pourcentage de viabilité de la préculture doit être supérieur ou égal à 80.

2. Dénombrement des micro-organismes du moût en fermentation

Un moût M a été inoculé avec la préculture précédente. Le nombre de cellules viables du moût attendu est de $1,5 \cdot 10^6$ Cellules. mL⁻¹.

- 2.1 - Vérifier la concentration des levures dans le moût M en réalisant une numération en surface sur gélose sélective YGC, ou gélose équivalente.
 - Tester trois dilutions successives. Effectuer deux essais par dilution.
 - Montrer la réalisation d'une dilution à un examinateur.
- 2.2 Justifier par écrit les dilutions testées. Préciser le temps et la température d'incubation choisis.

3. Identification d'un contaminant isolé d'un moût en fermentation

La souche de *Saccharomyces* utilisée étant généralement recyclée plusieurs fois, une contamination de la souche est possible.

Lors d'une précédente fermentation un contaminant bactérien C a été isolé.

Une colonie de ce contaminant a été ensemencée sur gélose nutritive notée "Cx"

- 3.1 Réaliser le (s) examen(s) microscopique(s).
 - Montrer un champ microscopique caractéristique à un examinateur.
- 3.2 Réaliser le ou les tests enzymatiques nécessaire(s) à l'orientation.
 - Proposer sur l'annexe une orientation de diagnostic.
 - Cette annexe est à rendre 30 minutes avant la fin l'épreuve.
- 3.3 Poursuivre l'identification jusqu'au stade de l'espèce en ensemencant les milieux et la galerie distribués.
 - Cette distribution se fera après la remise de l'annexe.

BIOCHIMIE (30 points)

Les analyses biochimiques qualitatives et quantitatives de plusieurs constituants de la bière permettent d'apprécier sa qualité.

1. Dosage du fer dans la bière

Lorsque la bière présente une mousse grisâtre et une mauvaise stabilité colloïdale, on suspecte une pollution par le fer au cours de la fabrication. La bière ne doit pas contenir plus de 0,1 mg de fer par litre.

Le dosage du fer (II) est réalisé par la méthode colorimétrique à l'orthophénanthroline.

1.1 Réactifs.

- Solution étalon mère de fer à $0,100 \text{ g.L}^{-1}$;
- Echantillon de bière dégazée étiqueté B ;
- Solution d'hydroquinone (T, R : 45-20/22, S : 53-24/25-39-45);
- Réactif à l'orthophénanthroline (S : 22-24/25).

1.2 Réalisation de la gamme d'étalonnage et des dosages.

1.2.1. Gamme d'étalonnage

A partir de la solution étalon mère de fer à $0,100 \text{ g.L}^{-1}$, préparer par dilution une solution étalon fille de fer à $10,0 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$. Avec cette solution fille, réaliser une gamme d'étalonnage contenant de 0 à 50 μg de fer par tube.

1.2.2. Dosages sur la bière dégazée (2 essais)

Les essais seront réalisés sur des prises d'essais de 5 mL de la bière B. Pour éliminer l'absorbance due à la couleur de la bière, il est nécessaire de réaliser, dans les mêmes conditions, le « témoin bière ».

1.2.3. Mode opératoire de la colorimétrie

Dans chaque tube, introduire :

- X mL de la solution contenant le fer ;
 - Eau distillée qsp 5 mL ;
 - 1 mL de solution d'hydroquinone. Agiter et laisser reposer 10 minutes ;
 - 2 mL de réactif à l'orthophénanthroline. Agiter et laisser reposer 20 minutes.
- Lire toutes les absorbances à 490 nm contre le témoin réactif de la gamme.

1.3 Compte rendu et résultats

1.3.1 Expliquer la préparation de la solution fille

1.3.2 Rassembler dans un tableau les indications relatives à la préparation des tubes de gamme, des essais et de leurs témoins.

1.3.3 Compléter la feuille de relevé des valeurs expérimentales (annexe 2).

1.3.4 Exploitation des résultats.

Donner l'équation de la droite de régression et le coefficient de corrélation.

1.3.5 Déterminer la concentration massique en fer dans la bière B analysée, en mg.L^{-1} . Conclure sachant que le CV de la méthode est de 3 %.

2. Identification des glucides et estimation de la teneur en glucides dans la bière.

La bière « sans alcool » est une bière dans laquelle le processus de fermentation est réalisé par des levures issues du génie génétique et produisant peu d'alcool. La nature des glucides et la teneur en glucides de ces bières sont donc différentes des bières traditionnelles. L'analyse comparative des glucides de ces deux types de bière sera réalisée par chromatographie sur couche mince. L'estimation de la quantité de glucides dans les deux types de bière sera réalisée par réfractométrie.

2.1. Matériel et réactifs

- Plaque recouverte d'une couche mince de gel de silice (10 cm x 10 cm)
- Cuve à chromatographie
- Solvant de chromatographie :
(F, C, Xi, R : 10-11-23/24/25-35-36-36-66-67, S : 7-9-16-26-36/37/39-45-66-67)
 - Méthyléthylcétone : 3 vol ;
 - Acide acétique : 1 vol ;
 - Méthanol : 1 vol.
- Solutions témoins de glucides à 2 g.L⁻¹ : glucose, maltose, saccharose, fructose, maltotriose.
- Révélateur : mélange extemporané d'aniline et de diphénylamine en milieu éthanol et acide phosphorique fourni prêt à l'emploi
(C, F, T, R : 11-20/21/22-23/24/25-33-34-40-48-50/53, S : 7-16-26-28-36/37-45-60-61)
- Réfractomètre
- Échantillons de bières à analyser préalablement dégazées : « traditionnelle » étiquetée B et « sans alcool » étiquetée BS

2.2. Mode opératoire pour l'identification des glucides

Introduire le solvant dans la cuve et la laisser se saturer en vapeurs de solvant pendant 15 minutes (manipuler sous hotte).

Réactiver la chromatoplaque par passage à l'étuve à 120°C pendant 5 minutes.

A l'aide de capillaires ou de cônes, réaliser 1 dépôt de chaque solution, en séchant.

Placer la plaque dans la cuve.

A l'issue de la migration noter le front de solvant. Puis, sécher rapidement la plaque.

Révéler à l'aide du matériel à disposition.

Mettre à l'étuve à 120°C (3 minutes).

2.3 Mode opératoire pour l'estimation de la teneur en glucides

Après avoir vérifié le zéro de l'appareil avec de l'eau distillée, réaliser la détermination rapide de la teneur en glucides (Brix) de la bière « traditionnelle », notée B et de la bière « sans alcool », notée BS (1 essai par bière). Montrer les mesures à l'examineur.

La notice de l'appareil est à disposition à côté du réfractomètre.

2.4. Compte rendu et résultats

2.4.1. Compléter la feuille de relevé des valeurs expérimentales sur l'annexe 2.

2.4.2. Analyser le chromatogramme obtenu et compléter l'annexe 2.

2.4.3. Comparer la composition en glucides des deux bières analysées. Conclure.

Le chromatogramme sera laissé au poste de travail.

2.4.4. Comparer les teneurs en glucides des deux bières analysées. Conclure.

Nom et Prénom du candidat :

N° de poste :

BTS Qualité dans les industries alimentaires et les bio- industries

Session 2004

U 52 : Techniques d'analyse et de contrôle

Annexe 1

A compléter et à rendre avec la copie

Numéro de la souche :

- Observation macroscopique :

- Observation microscopique :

- Résultat du ou des test (s) :

- Orientation proposée :

BTS Qualité dans les industries alimentaires et les bio- industries

Session 2004

U 52 : Techniques d'analyse et de contrôle

Biochimie

Annexe 2

A compléter et à rendre avec la copie

1. Dosage de fer dans la bière

	Etalons	Témoins	Essais
N° des tubes			
Masse de fer par tube en μg			
Absorbance ($\lambda = 490 \text{ nm}$)			

2. Identification des glucides et estimation de la teneur en glucides dans la bière

2.1. Identification des glucides de la bière

	Glucose	Maltose	Saccharose	Fructose	Maltotriose	B	BS
Rf							
Couleur des spots							

2.2. Estimation de la teneur en glucides dans la bière

	B	BS
Brix		

BTS Qualité dans les industries alimentaires et les bio- industries

Session 2004

U 52 : Techniques d'analyse et de contrôle

Durée : 6 heures

Coefficient : 3

Deuxième jour : 1 heure

LA BIÈRE

MICROBIOLOGIE

1. Dénombrement des micro- organismes du moût en fermentation.

Déterminer le nombre de micro-organismes par mL de moût. Exprimer le résultat en se référant aux données de l'annexe 1.

Discuter le résultat obtenu.

2. Identification d'un contaminant isolé d'un moût en fermentation

Procéder à l'identification du contaminant.

* Rappel : le nombre de levures viables, en début de fermentation, doit être de l'ordre de $1,5 \cdot 10^6$ cellules.mL⁻¹

ANNEXE 1
EXTRAIT DE LA NORME NF ISO 7218/A1 DE DÉCEMBRE 2001

Mode de calcul : Cas général (comptage des colonies en totalité ou des colonies caractéristiques).

Pour qu'un résultat soit valable, on estime en général qu'il est nécessaire de compter les colonies sur au moins 1 boîte contenant au minimum 15 colonies [colonies en totalité, colonies caractéristiques ou colonies répondant aux critères d'identification ou de confirmation (9.3.5.3)].

Calculer le nombre N de microorganismes présents dans l'échantillon pour essai, en tant que moyenne pondérée à partir de deux dilutions successives, à l'aide de l'équation suivante :

$$N = \frac{\sum C}{V \times [n_1 + (0,1 \times n_2)] \times d}$$

où

$\sum C$ est la somme des colonies comptées sur toutes les boîtes retenues de deux dilutions successives dont au moins une contient au minimum 15 colonies ;

V est le volume de l'inoculum appliqué à chaque boîte, en millilitres ;

n_1 est le nombre des boîtes retenues à la première dilution ;

n_2 est le nombre des boîtes retenues à la deuxième dilution ;

d est le taux de dilution correspondant à la première dilution retenue [d = 1 dans le cas où l'échantillon pour essai (produits liquides) ensemencé directement est retenu].

Arrondir le résultat calculé à deux chiffres significatifs. Pour cela, si le troisième chiffre est inférieur à 5 le chiffre précédent n'est pas modifié ; si le troisième chiffre est supérieur ou égal à 5 le chiffre précédent est augmenté d'une unité.

Retenir comme résultat un nombre compris de préférence entre 1,0 et 9,9 multiplié par la puissance appropriée de 10, ou un nombre entier avec 2 chiffres significatifs.

Exprimer le résultat comme suite :

- nombre N de microorganismes par millilitre (produits liquides) ou par gramme (autres produits).

Cas de deux boîtes (échantillon pour essai ou suspension mère ou première dilution) contenant moins de 15 colonies.

Si les deux boîtes, au niveau de l'échantillon pour essai (produits liquides) ou de la suspension mère (autres produits) ou de la première dilution ensemencée ou retenue, contiennent moins de 15 colonies (colonies en totalité, colonies caractéristiques ou colonies répondant aux critères d'identification ou de confirmation), calculer le nombre estimé N_E de microorganismes présents dans l'échantillon pour essai en tant que moyenne arithmétique des colonies comptées sur les deux boîtes à l'aide de l'équation suivante :

$$N_E = \frac{\sum C}{V \times n \times d}$$

où

$\sum C$ est la somme des colonies comptées sur les 2 boîtes ;

V est le volume de l'inoculum appliqué à chaque boîte, en millilitres.

n : le nombre de boîtes retenues.

d : le taux de dilution correspondant à la première dilution retenue.

Code : QATAC 42.