

BTS QUALITÉ DANS LES INDUSTRIES ALIMENTAIRES ET LES BIO-ALIMENTAIRES

MATIERE D'ŒUVRE BIOCHIMIE

REACTIFS : DOSAGE DES NITRITES

- **SOLUTION ETALON = Solution de nitrite à 2 mg/L** **30 mL/él**

Peser exactement 300 mg de nitrite de sodium.
Compléter à 1 litre.
Ajouter 1 mL de chloroforme.
Agiter énergiquement le chloroforme avec la solution.
Diluer 100 fois la solution avec de l'eau distillée.

FILTRAT DE JAMBON = filtrat Jn **15 mL/él**

Peser 0,3000 g de NaNO_2 qsp 100 mL
Diluer au 1/2000
Soit $C_x = 3 * 46 * 1000 / 69 * 2000 = 1 \text{ mg /L de NO}_2$

On peut aussi diluer la solution étalon au 1/2

- **Réactif phénol-sulfanilique :** **15 mL/él**

Acide chlorhydrique ($d=1,19$)	130 mL
Acide sulfanilique	2,5 g
Phénol cristallisé	3,75 g
Chlorure d'ammonium	62,5 g
Eau distillée	312,5 mL

Dissoudre par agitation, en s'aidant d'un B.M.,
l'acide sulfanilique et le phénol dans l'eau et l'acide chlorhydrique.
Ajouter le chlorure d'ammonium.
Après dissolution et refroidissement compléter à 500 mL. flacon pipettor

- **Ammoniaque $d = 0,925$ sous une hotte en flacon dispenseur réglé sur 1 mL** **15 mL/él**
en flacon pipettor

REACTIFS : DOSAGE DE L'ACIDE ASCORBIQUE

- **Solution de 2,6 dichlorophénol-indophénol à 0,5 g/L** **100 mL/él**
noter DCPIP en flacon brun

Dissoudre par petites fractions 1g de 2,6 DCPIP dans l'eau distillée chaude
Compléter à 2 L puis filtrer.
A conserver en flacon brun . A étalonner au moment de l'emploi

- **Solution étalon de vitamine C = solution d'ac. ascorbique à 0,5 g/L** **15 mL/él**
dans l'acide métaphosphorique à 20 g/L

- filtrat de jambon noté « Jac »
- solution d'ac.ascorbique à 1 g/L dans l'acide métaphosphorique

15 mL/él

solution d'acide métaphosphorique
noter ac. métaphosphorique
(en prévoir pour la préparation des solutions « Jac » et étalon)

100 mL/él

- Broyer au mortier l'acide métaphosphorique vitreux et en peser 40 g.
- Les laver rapidement en les recouvrant d'eau distillée et en agitant.
- Rejeter cette eau de lavage.
- Dissoudre l'acide ainsi lavé dans de l'eau distillée en agitant.
- Compléter à 200 mL et conserver au réfrigérateur 8 jours maximum.

Diluer cette solution au 1/10 juste avant l'emploi pour obtenir une solution à 20 g/L

MATERIEL PAR ELEVE

Dosage des nitrites

Pipettes jaugées de 2,5 mL
2 Pipettes graduées de 5, 10 mL
8 tubes à essais
8 macrocuvettes
pissette d'eau distillée
propipettes
lunettes
papier filtre
papier joseph
parafilm
3 petits bécards ou pots de yaourt / poubelle ou récipient secondaire

Dosage de l'ac. ascorbique

1 pipette jaugée de 25 mL
Une burette de 25 mL
2 Pipettes jaugées de 5 mL
Eprouvette de 25 mL ou 50 ou 100 mL
Fiole de 50 mL
4 erlens de 250 mL
1 bécher de 250 mL (chauffage de l'eau)

1 spectro /8 élèves

1 agitateur / 2 él (éventuellement)

Bidons déchets toxique, acides, bases

MATIERE D'OEUVRE : IMMUNOLOGIE

Produits

- | | | |
|--|---|----------------------------------|
| - Agarose à 1% en tampon PBS supplémentaires en surfusion au bain-marie. | 10 mL/élève (présentés en 2 tubes de 5 mL)+ 2 tubes supplémentaires | |
| - 1 tube d'eau physiologique | 10 mL/élève | |
| - Sérum humain | 30 ou 50 µL/élève minimum | tubes notés : E. |
| - Sérum humain | 30 µL/élève | tubes notés : extrait de porc. |
| - H ₂ O | 30 µL/élève | tubes notés : extrait de poulet. |
| - H ₂ O | 30 µL/élève | tubes notés : extrait de dinde. |
|
 | | |
| - Sérum anti-humain | 30 µL /élève | tubes notés : anti-porc. |
| - Sérum anti-humain | 30 µL/élève | tubes notés : anti-poulet. |
| - H ₂ O | 30 µL/élève | tubes notés : anti-dinde. |
| - H ₂ O | 30 µL/élève | tubes notés : anti-bœuf. |

Remarque : *Ajouter un colorant aux tubes contenant H₂O pour « mimer » un extrait ou un sérum*

Matériel par élève

- 2 petites boîtes de Pétri (diamètre 5 cm).
- 1 Emporte-pièce (cloche de Durham ou pipette 10 mL) (\varnothing inférieur à 6 mm, 4 ou 5 serait mieux).
- 1 Pipette automatique (5-50 ou 10-100) + cônes jaunes.
- Gants.

Matériel commun

- 1 ou 2 boîtes à gâteaux (chambre humide).
- 1 sac à autoclave.
- bain thermostaté à 56°C
- table à niveau

1er Jour :

Dénombrement de la flore aérobie mésophile :

Étuve à 30°C

Par élève :

Sac contenant le broyat de jambon cuit note "Bx"

Préparation du broyat :

90mL de tryptone –sel contaminé avec une suspension d'*E.coli*(contamination finale 10^4 /mL)

10g de jambon cuit

fermer hermétiquement

broyer au Stomacher

(donner le sachet ou pour plus de facilité, donner le broyat en flacon stérile ou erlen)

Tubes de 16 mL de PCA en surfusion : 6

Tubes de 4 mL de PCA en surfusion : 6

Pipettes pailles ou pipettes à usage unique de 1 mL : 8

Boite de Pétri vides stériles : 6

Tubes de diluant de 9 mL stérile tryptone-sel : 4

Agitateur mécanique

NB

1-il est prudent de faire un test avec le jambon seul au préalable, afin de modifier la contamination du tryptone-sel si nécessaire

2-en cas d'échec du test , remplacer le tryptone sel par du diluant neutralisant

Recherche et identification de germes responsables de surissement

Par élève :

Tube de liquide exudat noté "Lx" : 0.5mL de bouillon cœur-cerveau ~~glycérolé au 2/3~~ avec un mélange *Lactobacillus/Pseudomonas* non pigmenté : proportions en fonction des tests préliminaires suivant les souches à disposition, de façon à obtenir le bacille Gram-prédominant (à titre indicatif : 3/4-1/4)

Matériel courant de laboratoire

Réactifs Gram

Igélrose TS présentée en boîte de Petri sèche

Igélrose MRS présentée en boîte de Petri sèche

1 souche notée "S_x" *Pseudomonas* non pigmenté présentée sur gélose nutritive inclinée

Réactif oxydase extemporané } A disposition au milieu de la pailleasse
H₂O₂ }

1tube d'eau physiologique stérile de 2 mL

1galerie Api20NE + accessoires

1 notice d'ensemencement de la galerie Api 20 NE

1Vf régénéré en surfusion à 51°C

1 boîte GTS

Fiche technique du milieu MRS fournisseur.

2^{ème} Jour :

Réactifs de lecture de la galerie + document formule de la norme $\frac{\sum C}{v(n_1+0,1n_2)}$

Notice de lecture

Fiche Api 20NE

Outil d'identification : logiciel, index....

Fonds noirs

Réactifs Gram

H₂O₂

Réactif oxydase } A disposition au milieu de la pailleasse

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

Session 2004

E5 – TECHNIQUES D'ANALYSES ET DE PRODUCTIONS

U52 – TECHNIQUES D'ANALYSES ET DE CONTROLES

Durée : 6 heures

Coefficient : 3

BTS QUALITÉ DANS LES INDUSTRIES ALIMENTAIRES ET LES BIO-INDUSTRIES

Session 2004

E5 – TECHNIQUES D'ANALYSES ET DE PRODUCTIONS

U52 – TECHNIQUES D'ANALYSES ET DE CONTROLES

Durée : 6 heures

Coefficient : 3

CONTRÔLE DE LA QUALITE DES PRODUITS DE CHARCUTERIE

L'élaboration des produits de charcuterie fait intervenir des viandes d'origine diverse, des additifs comme les nitrates et les nitrites, de l'acide ascorbique....

Des contrôles biochimiques, immunologiques et microbiologiques permettent de vérifier le respect des bonnes pratiques de fabrication d'un jambon.

PREMIER JOUR : 4 h 30

1. CONTRÔLES BIOCHIMIQUES (20 POINTS)

Les nitrites sont introduits dans les produits de charcuterie, sous forme de sels nitrités (E250) en association avec la salaison. L'emploi de l'acide ascorbique (E 300) ainsi que des sels alcalins de cet acide (E301 et E 302) sont admis comme adjuvant de salaison.

Les normes européennes pour la charcuterie stipulent :

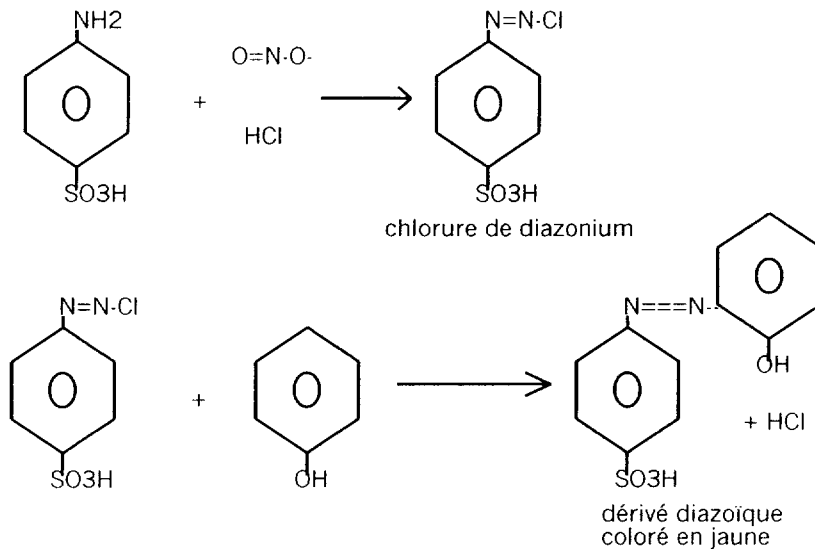
- taux de nitrites < 150 mg de nitrite de sodium par kg de jambon
- acide ascorbique < 300 mg/kg de jambon

1.1. Dosage des nitrites

L'extraction des ions nitrites du jambon a été réalisée selon le protocole suivant :

- peser exactement 25 g de jambon haché dans un ballon de 100 mL ;
- ajouter 5 mL d'une solution de borax saturée, 50 mL d'eau distillée ;
- chauffer au bain-marie bouillant, à reflux, sous agitation 15 minutes ;
- laisser refroidir ;
- transvaser le contenu du ballon dans une fiole jaugée de 200 mL ;
- défécation : ajouter 2 mL de solution d'hexacyanoferrate de potassium et 2 mL d'éthanoate de zinc puis 50 mL d'eau distillée ;
- agiter fortement ;
- laisser reposer 30 minutes ;
- compléter au trait de jauge avec de l'eau distillée ;
- filtrer, la solution obtenue est appelée « Jn ».

Le dosage des nitrites sur le filtrat «Jn» s'effectue par diazotation de l'acide sulfanilique, suivi d'une réaction avec le phénol. Le produit final est un composé diazoïque de couleur jaune photométable à 435 nm. Le schéma réactionnel est indiqué ci-dessous :



1.1.1 Réactifs

Réactif phénol-sulfanilique

Ammoniaque

Solution étalon de nitrite de sodium à 3 mg/L

Filtrat de jambon «Jn » fourni déjà dilué au 1/10.

1.1.2 Étalonnage du spectrophotomètre

A partir de la solution étalon de nitrite de sodium à 3 mg/L, préparer une gamme de 0 à 10 µg de nitrites par tube. Les tubes de la gamme seront traités comme les essais (voir tableau de résultats = annexe 1).

Données : NO₂ = 46 g/mol ; Na NO₂ = 69 g/mol

1.1.3. Dosage des nitrites sur le filtrat de jambon « Jn ».

Réaliser deux essais comme indiqué ci-dessous :

N° tubes	Essai 1	Essai 2
Filtrat de jambon« Jn » au 1/10 (mL)	2	5
Eau distillée (mL)	3	0
Réactif phénol-sulfanilique (mL)	1	1
Agiter et attendre 10 minutes		
Ammoniaque (mL) sous hotte	1	1
Agiter attendre 10 minutes. Lire l'absorbance à 435 nm.		

I.1.4 Résultats :

Compléter la feuille de résultats fournie en annexe 1. Conclure.

1.2 Dosage de l'acide ascorbique

Ce dosage est effectué sur un deuxième filtrat noté « Jac » obtenu par filtration de 200 g d'un broyat de jambon dans 50 mL exactement d'acide métaphosphorique.

Le principe du dosage est basé sur les propriétés réductrices de l'acide ascorbique. L'oxydant utilisé est le 2,6 dichlorophénol-indophénol (DCPIP) ; 1 mole de DCPIP oxyde 1 mole d'acide ascorbique.

1.2.1 Réactifs

Solution de 2,6 dichlorophénol-indophénol à C voisine de $1,50 \text{ mmol L}^{-1}$

Solution étalon d'acide ascorbique à exactement $0,5 \text{ g/L}$

Eau distillée bouillie et refroidie

Filtrat de jambon « Jac »

1.2.2. Étalonnage de la solution de 2,6 dichlorophénol-indophénol

Dans un erlenmeyer, introduire :

- E = 5 mL de solution étalon d'acide ascorbique
- 15 mL d'eau distillée bouillie et refroidie

Verser la solution de 2,6 dichlorophénol-indophénol jusqu'à l'apparition d'une couleur rose pâle persistant pendant 30 secondes.

Faire deux essais.

1.2.3 Dosage de l'acide ascorbique dans le filtrat « Jac »

Préparer 50 mL de filtrat dilué au 1/2 dans l'acide métaphosphorique.

Dans un erlenmeyer, introduire :

- E = 5 mL de filtrat dilué
- 15 mL d'eau distillée bouillie et refroidie

Verser la solution de 2,6 dichlorophénol-indophénol jusqu'à l'apparition d'une coloration rose pâle persistant 30 secondes.

Faire deux essais.

1.2.4 Résultats

Compléter la feuille de résultats en annexe 2. Conclure.

2. CONTRÔLES IMMUNOLOGIQUES (14 points)

La technique d'Ouchterlony est utilisée afin d'identifier dans les produits de charcuterie :

- l'origine des espèces animales (porc, bœuf, mouton, cheval, volaille...).
- les protéines étrangères à la viande (soja, œufs, caséines, protéines de lactosérum, gluten...)

Le premier objectif est de vérifier la spécificité de l'immun-sérum anti-porc.

Le second objectif est de tester un extrait de jambon de porc pour vérifier sa composition en viande. Pour cela, on dispose d'immuns sérums anti-porc, anti-poulet, anti-dinde et anti-bœuf. La spécificité des immuns-sérums anti-poulet, anti-dinde et anti-bœuf est avérée.

2.1 Réactifs et matériel

- 2 tubes de 5 mL d'agarose à 1% en tampon PBS, maintenu en surfusion au bain-marie à 55°C.
- Immuns sérums :- anti-porc, anti-poulet, anti-dinde, anti-bœuf.
- Extrait de jambon à tester (dilué en eau physiologique) noté E.
- Extrait de viande de porc.
- Extrait de viande de poulet.
- Extrait de viande de dinde.
- 2 boîtes de Pétri (diamètre 5,5 cm).
- Emporte-pièce : cloche de Durham ou équivalent.
- 1 tube d'eau physiologique

2.2 Mode opératoire

2.2.1 Préparation des boîtes

Se référer à l'annexe 3 : contrôles immunologiques.

2.2.2 Remplissage des puits

- Une boîte est utilisée pour tester la spécificité de l'immun sérum anti-porc dont on dépose 20µL dans le puits central = Boîte A.
- L'autre boîte est utilisée pour tester l'extrait de jambon (E) dont on dépose 20µL dans le puits central = Boîte B.
- Définir les réactifs à introduire dans les puits 1 à 4 de chaque boîte afin d'atteindre les objectifs respectifs. Sur l'annexe 3, présenter les plans de dépôts en annotant les schémas des boîtes.
- Introduire 20 µ L de réactif par puits

2.2.3 Incubation

Placer les boîtes en chambre humide à température ambiante pendant 24 à 48 heures.

3. CONTRÔLES MICROBIOLOGIQUES (26 points)

Du fait de sa richesse en protéines, la viande offre de bonnes conditions à la prolifération de germes. D'autre part, les manipulations préalables à l'obtention du produit de charcuterie constituent une source de contamination non négligeable.

Les contrôles microbiologiques sont nécessaires pour vérifier la qualité sanitaire et commerciale du produit. Les critères microbiologiques concernant le jambon cuit sont indiqués ci-après :

Flore aérobie mésophile	10^4 /g
Coliformes	10/g
Coliformes fécaux	absence dans 1 g
<i>Staphylococcus aureus</i>	absence dans 1 g
Anaérobies sulfito-réducteurs	absence dans 1 g
<i>Salmonella</i>	absence dans 1 g

3.1. Dénombrement de la flore aérobie mésophile

Il s'effectue sur une suspension mère de jambon préparée en pesant 10 g de jambon, introduits dans un sachet stérile auquel on ajoute 90 mL d'eau peptonée ; Le broyage est effectué dans un appareil homogénéisateur type Stomacher et est présenté en erlenmeyer, ou flacon stérile, et noté "Bx".

3.1.1. Matériel

- Flacon ou erlen stérile contenant le broyat = B x.
- 6 Tubes de 16 mL de PCA en surfusion : les demander à l'examineur.
- 6 Tubes de 4 mL de PCA en surfusion : les demander à l'examineur.
- 5 Pipettes pailles ou pipettes à usage unique de 1 mL.
- 6 Boîtes de Pétri vides stériles.
- 4 Tubes de diluant de 9 mL stérile : tryptone-sel .
- 1 Agitateur mécanique.

3.1.2. Protocole

- A partir du broyat "Bx" fourni procéder à un dénombrement dans la masse en double couche en milieu PCA.
- Ensemencer 3 dilutions successives en double exemplaire.
- Les dilutions à tester sont à déterminer
- Montrer une des dilutions à un examinateur.

Données : le nombre de germes est évalué à environ 10^5 /g de jambon

- Justifier le choix des dilutions
- Préciser les conditions d'incubation
- Discuter l'intérêt de cette recherche

3.2 Recherche et identification de germes responsables de surissement.

Les streptocoques, les microcoques, les *Pseudomonas*, et les lactobacilles sont responsables de l'altération du jambon, en particulier lorsqu'il est emballé sous vide. Un prélèvement du liquide exsudé, dans le paquet contenant le jambon étudié au 3.1 est proposé pour étude. Il est présenté en tube noté "Lx".

3.2.1. Recherche de germes responsables de surissement.

- Procéder à l'examen microscopique du produit noté "Lx".
- Faire le compte rendu de vos observations.
- Montrer un champ caractéristique à un examinateur.
- Isoler sur gélose trypticase-soja et sur gélose Man Rogosa Sharp.
- Justifier le choix de ces milieux.

3.2.2 Identification de germes responsables de surissement.

Une souche isolée du liquide prélevé est présentée sur gélose nutritive inclinée notée « Sx » .

- Réaliser le ou les examens microscopiques adéquats.
- Réaliser le ou les tests enzymatiques utiles à l'orientation du germe.
- Procéder à l'identification du germe. Justifier la composition de la galerie d'identification choisie.
- L'ensemencement de la galerie d'identification sera réalisé après remise du compte rendu 30 minutes avant la fin des épreuves.
- Ensemencer la galerie fournie par le centre.