

BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR

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

U52 – TECHNIQUES D'ANALYSE ET DE CONTRÔLE

Durée : 6 heures

Coefficient 3

PREMIER JOUR

Durée : 4 heures 45

Document à rendre avec la copie : Feuille de résultats, page 6/8

Dès que le sujet vous est remis, assurez-vous qu'il est complet.
Le sujet comporte 8 pages numérotées de 1 à 8.

CONTRÔLE D'UN JUS D'ORANGE

PREMIER JOUR (4h45)

Un jus d'orange a été extrait sur le lieu de récolte des fruits puis concentré afin de limiter les coûts de transport. Une fois sur le lieu de conditionnement, il est reconstitué avec de l'eau.

Des contrôles biochimiques sont réalisés lors de la reconstitution : analyse des nitrites présents dans l'eau utilisée, contrôle de la quantité d'eau ajoutée par mesure du degré Brix et dosage de la vitamine C dans le jus. Deux accidents microbiologiques de fabrication sont également analysés.

1. CONTRÔLES BIOCHIMIQUES LORS DE LA RECONSTITUTION (30 points)

1.1. Contrôle de la qualité de l'eau : dosage des nitrites

Les nitrites proviennent de la transformation de la matière organique azotée sous l'action de bactéries. Ils peuvent être toxiques. D'après la législation française, la concentration en nitrites d'une eau destinée à la consommation humaine ne doit pas dépasser $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$.

1.1.1. Réactifs

solution de nitrite de sodium de concentration $0,3 \text{ g.L}^{-1}$
eau X à analyser

1.1.2. Préparation de la solution étalon

À l'aide de la solution de nitrite de sodium de concentration $0,3 \text{ g.L}^{-1}$, préparer par dilution 100 mL d'une solution étalon contenant 2 mg.L^{-1} de nitrites (NO_2^-).

Données : $M(\text{NaNO}_2) = 69 \text{ g.mol}^{-1}$ $M(\text{NO}_2^-) = 46 \text{ g.mol}^{-1}$

1.1.3. Réalisation de la gamme d'étalonnage et des essais

Dans une série de 9 cuves, préparer la gamme d'étalonnage et les essais selon le tableau de colorimétrie ci-dessous :

N° cuve	0	1	2	3	4	5	6	X1	X2
Volume (mL) de solution étalon à 2 mg de nitrites /L	0	0,25	0,5	1	1,5	2	2,5		
Eau X, à analyser (mL)								2,5	2,5
eau désionisée (mL) qsp 2,5 mL									
Réactif phénol-sulfanilique (PS) (mL)	<<— 0,5 mL —>>								
Ammoniaque (mL)	<<— 0,5 mL —>>								
Masse de nitrites (μg)									

Lire l'absorbance à 435 nm après une attente de 10 min.

1.1.4. Résultats

Compléter le tableau de la feuille de résultats biochimie (Annexe 1).

À l'aide d'une régression linéaire, déterminer la concentration massique en nitrites de l'eau X à analyser.

Conclure sur sa potabilité.

Donnée : CV de la méthode = 2%

1.2. Contrôle de la quantité d'eau ajoutée par mesure du degré Brix.

1.2.1. Teneur en matière sèche réfractométrique et contrôle de la quantité d'eau ajoutée.

La teneur en matière sèche réfractométrique (ou extrait sec réfractométrique) est la concentration en saccharose d'une solution aqueuse ayant le même indice de réfraction que le produit analysé dans des conditions déterminées de préparation et de température. Cette concentration est exprimée en pourcentage en masse ou en degré Brix.

La mesure du degré Brix est extrêmement utile pour l'entreprise car elle permet de contrôler la quantité d'eau ajoutée lors de la reconstitution du jus.

1.2.2 Matériel et réactifs

Réfractomètre (il a été préalablement étalonné).

Jus d'orange (10 mL).

1.2.3 Manipulation et résultats

Effectuer 3 mesures du degré Brix du jus d'orange (à 0,25 % près).

Compléter la feuille de résultats biochimie (annexe 1).

Retenir comme résultat la moyenne arithmétique des valeurs obtenues.

Après reconstitution, le degré Brix du jus d'orange doit être compris dans une fourchette de valeurs qui sera donnée par un examinateur.

Conclure sur la qualité de la reconstitution.

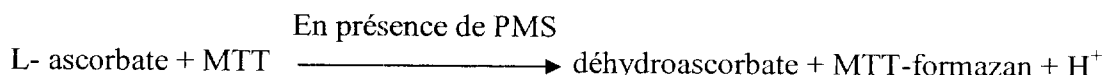
1.3 Dosage de la vitamine C

Le fabricant veut s'assurer que le produit n'a pas perdu trop de vitamine C (L-ascorbate) lors de la concentration, du transport et de la reconstitution du jus d'orange.

1.3.1. Principe

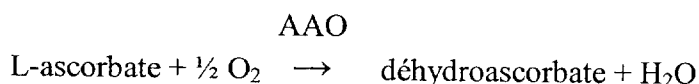
La vitamine C du jus d'orange est dosée par méthode enzymatique.

Les réactions mises en jeu sont les suivantes :



On détermine la quantité de MTT-formazan formée en mesurant l'absorbance à 578 nm en fin de réaction.

Pour le blanc, la fraction de L-ascorbate est oxydée par l'ascorbate oxydase (AAO) en présence de dioxygène :



Le déhydroascorbate ne réagit pas avec le MTT.

1.3.2. Réactifs

Solution 1 : tampon citrate, MTT
 Tube 2 : spatules AAO
 Solution 3 : PMS (transporteur d'électrons)

1.3.3. Mode opératoire

1.3.3.1. Préparation de la solution à doser

Diluer le jus d'orange au 1/10.

1.3.3.2. Protocole du dosage

Introduire dans des cuves :	Blanc	Essai (à doubler)
Solution 1	1,000 mL	1,000 mL
Eau désionisée	1,500 mL	1,500 mL
Jus d'orange dilué au 1/10	0,100 mL	0,100 mL
Tube 2 (spatules AAO)	1 spatule	–
Mélanger (bien remuer la spatule pour le blanc et la laisser en place) et incuber 6 min à 37° C. Après avoir à nouveau mélangé (et retiré la spatule pour le blanc), lire l'absorbance A ₁ . Déclencher la réaction par addition de :		
Solution 3	0,100 mL	0,100 mL
Mélanger et incuber 15 min à 37°C à l'obscurité. Lire l'absorbance A ₂ immédiatement après avoir sorti la cuve de l'obscurité.		

1.3.3.4 Résultats

Compléter le tableau de la feuille de résultats biochimie (Annexe 1).
 La variation d'absorbance de chaque échantillon est déterminée de la façon suivante : $\Delta A = (A_2 - A_1) \text{ essai} - (A_2 - A_1) \text{ blanc}$.

Déterminer les concentrations molaire et massique de vitamine C dans le jus d'orange.

Conclure sachant que le jus après concentration-reconstitution doit encore contenir de 200 à 300 mg de vitamine C par litre.

Données :

$$\epsilon \text{ du MTT - formazan à } 578 \text{ nm} = 16\,900 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$$

$$M_{\text{vitamine C}} = 176,13 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

$$\text{CV de la méthode} = 4 \%$$

2. ANALYSE DE DEUX ACCIDENTS MICROBIOLOGIQUES DE FABRICATION (30 points)

Du fait de son pH acide, le jus d'orange est naturellement préservé du développement de nombreuses bactéries, exception faite des micro-organismes acidophiles. Les accidents de fabrication sont donc en général dûs à des contaminations fongiques. On se propose d'analyser deux types d'accidents microbiologiques.

2.1. Contamination par des levures

Après conditionnement, certaines bouteilles plastiques gonflent du fait du développement de levures produisant du gaz.

2.1.1. Dénombrement des levures

Un échantillon (noté Ld) issu d'une bouteille gonflée est analysé.

Dans un tube à hémolyse stérile, introduire 0,5 mL de cet échantillon et 0,5 mL de bleu de méthylène.

Monter la préparation en cellule de Malassez décrite en annexe 2).

Réaliser la numération et déterminer la concentration en levures de cet échantillon.

Vérifier ce résultat par un dénombrement dans la masse d'une gélose Sabouraud.

Ensemencer en double les 3 dilutions appropriées par la technique de la simple couche. Le choix des dilutions est à justifier sur la copie.

2.1.2. Identification des levures

Un isolement (noté Li) sur gélose Sabouraud a été réalisé à partir d'une bouteille gonflée.

Identifier cette levure grâce à une galerie miniaturisée Api 20CAux et un isolement sur milieu RAT.

2.2. Contamination par des moisissures

L'entreprise est confrontée de temps en temps à la contamination de ses chaînes de fabrication par des moisissures. Afin de rechercher un désinfectant efficace permettant d'éliminer ces champignons, l'identification du genre de la moisissure incriminée doit être réalisée.

La souche fongique est présentée en boîte de pétri.

Effectuer un examen microscopique (technique du scotch) et à l'aide du document fourni en annexe 3, identifier le genre de la moisissure. Réaliser un schéma légendé.

ANNEXE 1

Feuille de résultats Biochimie À rendre avec la copie

1. Dosage des nitrites

N° cuve	0	1	2	3	4	5	6	X1	X2
Volume de solution étalon à 2mg de nitrites/L (mL)	0	0,25	0,5	1	1,5	2	2,5		
Eau X, à analyser (mL)								2,5	2,5
eau désionisée qsp 2,5 mL (mL)									
Réactif phénol-sulfanilique (PS) (mL)	<<— 0,5 mL —>>								
Ammoniaque (mL)	<<— 0,5 mL —>>								
Masse de nitrites (µg)									
Absorbance à 435 nm									

Régression linéaire :

2. Mesure du degré Brix du jus

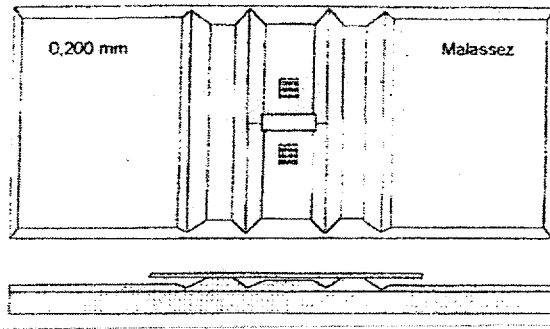
$^{\circ}\text{B}_1 =$ $^{\circ}\text{B}_2 =$ $^{\circ}\text{B}_3 =$
 $^{\circ}\text{B}_{\text{moy}} =$

3. Dosage de la vitamine C

	Blanc	Essai 1	Essai 2
A1			
A2			

ANNEXE 2

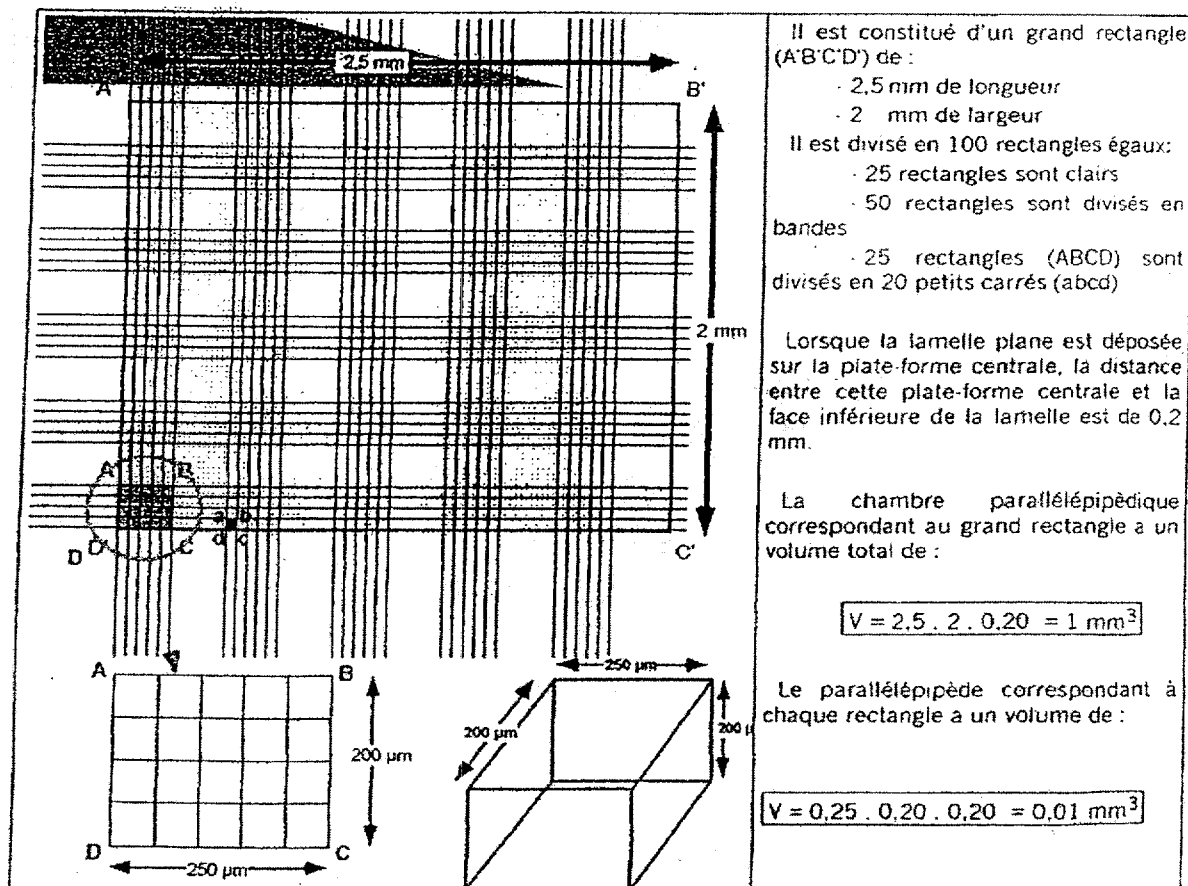
Hématimètre de Malassez



C'est une épaisse lame de verre, creusée de rigoles qui délimitent des plates-formes :

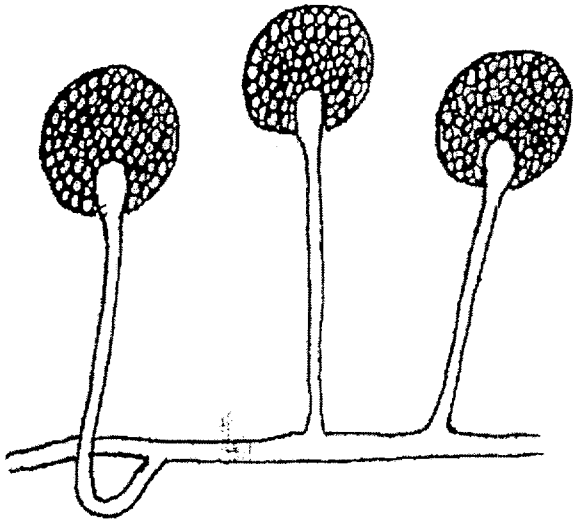
- Deux plates-formes latérales élevées qui supporteront une lamelle épaisse et plane
- Une plate-forme centrale légèrement abaissée, sur laquelle est gravé un quadrillage (ou deux quadrillages)

Le quadrillage de l'hématimètre de Malassez est conçu de la façon suivante :

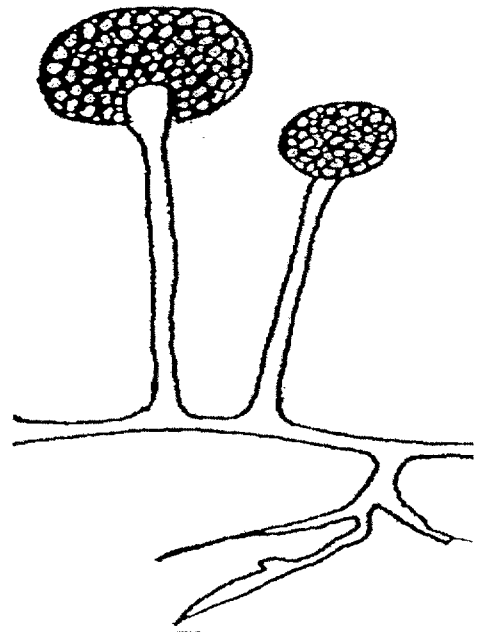


ANNEXE 3

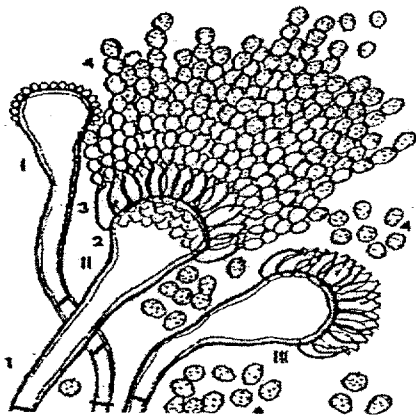
Schémas d'organes de fructification de moisissures



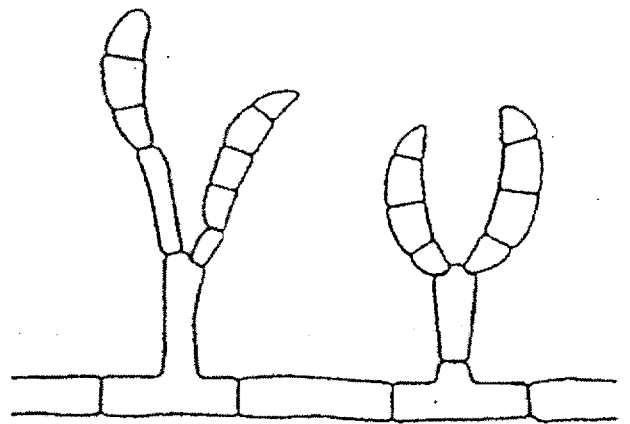
Mucor



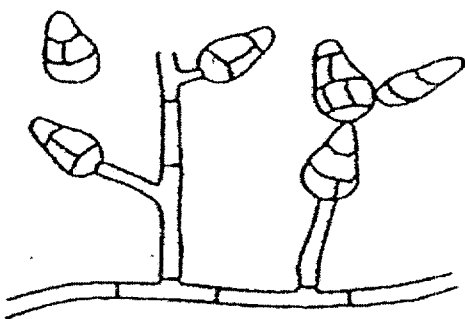
Rhizopus



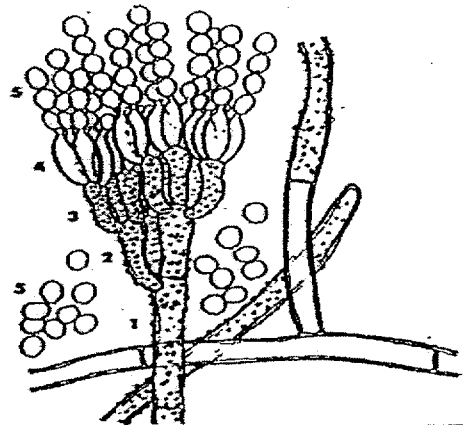
Aspergillus



Fusarium



Alternaria



Penicillium

<p>BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR QUALITÉ DANS LES INDUSTRIES ALIMENTAIRES ET LES BIO-INDUSTRIES</p>

U52 – TECHNIQUES D'ANALYSE ET DE CONTRÔLE

Durée : 6 heures	Coefficient : 3
------------------	-----------------

PREMIER JOUR

Durée : 4 heure 30

Document à rendre avec la copie : feuilles de résultats, pages 8/9 et 9/9

Ce sujet comporte 9 pages, numérotées de 1 à 9.
Assurez-vous qu'il est complet dès qu'il vous est remis.

CONTRÔLES DE QUALITÉ DANS LES INDUSTRIES FROMAGÈRES

PREMIER JOUR (4 h 30)

En fabrication fromagère, la qualité des produits dépend :

- des matières premières (lait et ferments lactiques utilisés),
- des processus de fabrication.

PARTIE MICROBIOLOGIE

1. CONTRÔLES DES MATIÈRES PREMIÈRES

Il s'agit de contrôler à la réception certaines caractéristiques d'un lait entier cru afin de vérifier sa conformité aux critères suivants :

flore totale : $< 10^5$ microorganismes aérobies mésophiles mL⁻¹
antibiotique : absence

1.1. Dénombrement de la flore aérobie mésophile

La technique utilisée est un dénombrement dans la masse en gélose glucosée à 1% au lait écrémé.

1.1.1. Matériel à disposition

- 1 tube de 5 mL de lait cru noté "LC" (à conserver dans la glace)
- 6 tubes de 9 mL de tryptone-sel stérile
- 6 tubes ou un flacon de gélose glucosée à 1% au lait écrémé en surfusion
(à demander à l'examineur)
- 6 grandes boîtes de Pétri stériles
- 7 pipettes de 1 mL stériles

1.1.2. Réalisation des dilutions

Réaliser les dilutions successives et montrer à un examinateur la réalisation d'une dilution.
Choisir trois dilutions pour le dénombrement.

1.1.3. Dénombrement en milieu solide dans la masse en simple couche

Ensemencer les dilutions choisies ; faire 2 essais par dilution.
Incuber à 30°C pendant 24 h.

1.2 Recherche d'antibiotique par la méthode des disques sur milieu gélosé

La présence d'antibiotique dans le lait lors du traitement d'une mammite chez la vache est une cause très fréquente d'inhibition de la fermentation du lait par le levain lactique.

1.2.1. Matériel

- 1 tube de 2 mL de culture jeune de *Bacillus stearothermophilus* variété *cadidolactis*
- 1 tube de 2 mL de lait témoin positif (lait stérile + 0,5 µg/mL de pénicilline), noté « T+ »
- 1 tube de 2 mL de lait témoin négatif (lait stérile sans pénicilline), noté « T- »
- 1 tube de 8 mL de gélose Mueller-Hinton en surfusion (à demander à l'examineur)
- 1 grande boîte de Pétri stérile
- 1 pipette de 1 mL stérile
- 3 disques de papier filtre stériles
- 2 feuilles de papier filtre
- 1 feuille de papier d'aluminium

1.2.2. Ensemencement de la souche sensible

Introduire 1 mL de la culture de *Bacillus stearothermophilus* dans 8 mL de gélose Mueller-Hinton en surfusion.
Homogénéiser et couler dans une boîte de Pétri stérile.

1.2.3. Dépôt des disques

Plonger un disque de papier filtre dans chacun des laits suivants :
témoin négatif,
témoin positif,
lait cru à tester.

Bien égoutter le disque contre la paroi du tube.
Déposer chaque disque sur la gélose Mueller-Hinton ensemencée.
Incuber en chambre humide à 55°C pendant 24h.

2. CONTRÔLES EN COURS DE FABRICATION

Lors des contrôles en cours de fabrication des fromages, l'apparition d'un goût de savon dans la pâte a conduit à la recherche d'un contaminant bactérien lipolytique.

La feuille de résultats microbiologie (annexe 1) doit être remplie à chaque étape et rendue avant l'heure indiquée.

Ce contaminant a été repiqué sur une gélose trypticase-soja notée « GTS ».

A partir de cette souche, réaliser une coloration de Gram. Montrer à un examinateur le résultat obtenu.

Réaliser devant un examinateur le test enzymatique utile à l'orientation de la souche.

Proposer par écrit une orientation justifiée du contaminant bactérien à identifier.

Indiquer par écrit le(s) milieu(x) et la galerie miniaturisée nécessaires à l'identification du contaminant bactérien. Rendre la feuille de résultats. Les milieux seront distribués par les examinateurs.

Ensemencer les milieux fournis par le centre.

Incuber les milieux ensemencés 24 h à 30°C.

PARTIE BIOCHIMIE

Certaines caractéristiques des matières premières utilisées en industrie fromagère sont vérifiées.

1. CONTRÔLE DE L'ACTIVITÉ ACIDIFIANTE DU FERMENT LACTIQUE

La réussite des fabrications fromagères dépend de la qualité du lait et de celle des ferments lactiques utilisés.

Le ferment lactique est choisi par l'industriel en particulier pour son activité acidifiante. Cette activité est exprimée en unité (U). Sa détermination nécessite l'utilisation de la soude Dornic.

Donnée : une unité (U) est la quantité de ferment en grammes nécessaire pour produire 150 mmoles d'acide lactique en 4 h dans du lait.

1.1. Étalonnage de la soude Dornic

1.1.1. Mode opératoire

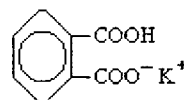
Peser une masse d'environ 0,120 g d'hydrogénophthalate de potassium.
Procéder à la semi-microburette, au dosage de la soude Dornic « NaOH Dornic », en présence de phénolphtaléine ; sa concentration est d'environ 1/9 mol.L⁻¹.
Réaliser deux essais.

1.1.2. Résultats

Compléter la feuille de résultats biochimie (annexe 2).
Calculer la concentration de la soude Dornic.

Données :

hydrogénophthalate de potassium :



$M_{\text{hydrogénophthalate de potassium}} = 204,22 \text{ g.mol}^{-1}$

CV de la méthode = 0,5%

1.2. Détermination de l'activité spécifique acidifiante du ferment lactique

1.2.1. Détermination de la quantité d'acide lactique apparu

1.2.1.1 Mode opératoire

On dispose :

- d'une fiole d'Erlenmeyer noté « t = 0 » contenant 70 mL de lait écrémé stérile dont 5 mL de la préculture du ferment correspondant au temps t = 0 (à conserver dans la glace),
- d'une fiole d'Erlenmeyer noté « t = 4h » contenant 70 mL de lait écrémé stérile dont 5 mL de la préculture du ferment correspondant au temps t = 4 h (à conserver dans la glace).

Pour chaque fiole d'Erlenmeyer « t = 0 » et « t = 4 h » :

- prélever 10 mL de lait (si le lait est caillé, bien vortexer pour pouvoir prélever correctement les 10 mL) ;
- ajouter 10 gouttes de phénolphtaléine ;
- verser la soude Dornic jusqu'à l'obtention d'une coloration rose persistant pendant une dizaine de secondes.

1.2.1.2. Résultats

Compléter la feuille de résultats biochimie (annexe 2).

Calculer la quantité d'acide lactique produit en 4h.

Donnée : acide lactique : $\text{CH}_3\text{-CHOH-COOH}$

1.2.2. Détermination de la quantité de ferment présent dans les fioles d' Erlenmeyer

Dans une manipulation préalable, l'absorbance d'une dilution au 1/20 de la préculture de ferment introduite dans les fioles d'Erlenmeyer a été mesurée à 600 nm.

On a trouvé : $A \text{ à } 600 \text{ nm} = 0,35$

Donnée : 1 unité d'absorbance à 600 nm correspond à $0,7 \text{ g.L}^{-1}$

Calculer la quantité de ferment présent dans les fioles d'Erlenmeyer.

1.2.3. Détermination de l'activité acidifiante du ferment

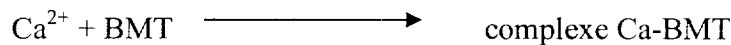
Calculer l'activité acidifiante du ferment exprimée en U.
Donnée : CV de la méthode = 1,5 %

2. DOSAGE DU CALCIUM DU LAIT

La teneur en calcium du lait est un critère déterminant la coagulation du lait.
Cette teneur est de 1,05 à 1,40 g.kg⁻¹ de lait.
La masse volumique du lait écrémé utilisé est de 1,0369 kg.L⁻¹.

2.1. Principe

Le Ca-Kit permet le dosage colorimétrique du calcium.
L'ion calcium réagit en milieu alcalin avec l'indicateur bleu de méthylthymol (BMT) :



L'intensité de la coloration du complexe Ca-BMT mesurée à 612 nm est proportionnelle à la quantité de calcium présent dans l'échantillon.
L'hydroxy-8-quinoléine élimine l'interférence du magnésium.

2.2 Réactifs et matériel

2.2.1. Réactifs

Réactif 2 : bleu de méthylthymol à 0,092 mmol/L (en distributeur)
hydroxy-8-quinoléine à 11 mmol/L

Réactif 3 : réactif pH 11 (en distributeur)

Le dosage est réalisé sur un minéralisat de lait qui a été obtenu selon le mode opératoire suivant : une prise d'essai E de 1 mL de lait a été minéralisée en milieu sulfo-nitrique. La totalité du minéralisat obtenu a été transférée dans une fiole jaugée U de 20 mL. La fiole jaugée est ajustée avec de l'eau désionisée. On obtient le minéralisat de lait « Lm ».

2.2.2. Matériel

4 tubes Eppendorf
8 semi-microcuves visibles
pipette automatique P1000
pipette automatique P20
1 flacon de solution de calcium à 0,100 g/L notée « Ca »
1 flacon de minéralisat de lait noté « Lm »

2.3. Mode opératoire

2.3.1. Préparation des solutions étalons de calcium.

Préparer en tubes Eppendorf, sous un volume de 1 mL, 5 solutions étalons de calcium de concentration de 0,02 à 0,10 g.L⁻¹. Le diluant utilisé est l'eau désionisée.

20 µL de chaque solution ainsi préparée dans des semi-microcuves selon le protocole en page suivante.

2.3.2. Réaction colorée (gamme d'étalonnage et essais)

Introduire en semi microcuves 20 µL de chaque solution étalon de 0,02 à 0,10 g.L⁻¹ ou 20 µL de minéralisat de lait « Lm » (deux essais).

Réaliser un blanc réactif (tube 6) avec 20 µL d'eau désionisée.

Ajouter 1 mL de réactif R2 puis 1 mL de réactif R3.

Mélanger et mesurer l'absorbance à 612 nm après 1 minute.

2.4. Résultats

Compléter le tableau de préparation des solutions étalons (Annexe 2).

Calculer la masse de calcium dans chaque cuve de la gamme d'étalonnage (en µg).

Effectuer la régression linéaire à la calculatrice et en donner les paramètres caractéristiques.

Calculer la quantité de calcium dans chaque essai.

Déterminer la concentration massique en calcium dans le minéralisat de lait « Lm ».

Déterminer la concentration massique en calcium dans le lait étudié puis la teneur en calcium de ce lait exprimée en g.kg⁻¹ de lait.

Conclure.

Donnée : CV de la méthode = 2%

Annexe 1

FEUILLE DE RÉSULTATS : MICROBIOLOGIE

A compléter et à rendre avec la copie

N° de poste du candidat :

À remplir avant :

Étude du contaminant bactérien

Observation microscopique :

Résultat du test enzymatique :

Orientation proposée (justifiée) :

Milieu(x) et galerie miniaturisée demandés :

Annexe 2

FEUILLE DE RÉSULTATS : BIOCHIMIE

A compléter et à rendre avec la copie

1. Activité acidifiante du ferment

1.1 Étalonnage de la soude Dornic :

	Masse pesée (g)	V _{eq} (mL)
Essai 1		
Essai 2		

1.2 Détermination de l'activité acidifiante du ferment

	« t = 0 »	« t = 4 h »
volume de soude versé (mL)	V ₀ =	V ₄ =

2. Dosage du calcium du lait

➤ Préparation des solutions étalons :

Tube	1	2	3	4	5
volume de solution à 0,100 g.L ⁻¹ (mL) de calcium					
volume d'eau désionisée (mL)					
concentration en calcium (g.L ⁻¹)	0,02	0,04	0,06	0,08	0,10

➤ Résultats de la colorimétrie :

Cuve	0	1	2	3	4	5	E1	E2
masse de calcium dans la cuve (µg)								
A à 612nm								