

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 30

Document à rendre avec la copie : Feuille de résultats, page 10/10

Ce sujet comporte 10 pages, numérotées de 1 à 10
Assurez-vous qu'il est complet dès qu'il vous est remis.

CONTRÔLES SUR UN MIEL

PREMIER JOUR : 4 h 30

CONTRÔLES BIOCHIMIQUES DE LA QUALITÉ D'UN MIEL (30 points)

Le miel que l'on se propose d'analyser est un miel polyfloral, dit : " toutes fleurs ", destiné à la consommation.

1. DÉTERMINATION DE LA TENEUR EN EAU PAR RÉFRACTOMÉTRIE

La diminution de la teneur en eau du miel correspond à une étape de maturation qui a lieu dans la ruche avant l'operculation des alvéoles.

Les miels doivent, à part quelques exceptions (miel de bruyère, miels destinés à l'industrie), respecter la norme suivante : teneur en eau $\leq 21\%$; au-delà, il y a risque de fermentation rapide par des levures.

Plus précisément, pour les miels polyfloraux :

le miel est dit « d'excellente qualité » si sa teneur en eau est inférieure à 18 % ;

il est de « bonne qualité » pour une teneur en eau comprise entre 18 % et 18,5 % ;

de 18,5 à 19%, il est de « qualité moyenne » ;

de 19 à 21%, la qualité est « médiocre » ;

enfin, au dessus de 21 %, c'est un produit de mauvaise qualité qui d'après la législation, ne peut être commercialisé que sous les dénominations « miel de pâtisserie » ou « miel d'industrie ».

1. 1. Principe

L'indice de réfraction du miel parfaitement liquéfié est fonction de sa teneur en eau.

1.2. Mode opératoire

1.2.1. Contrôle de l'étalonnage du réfractomètre par mesure de l'indice de réfraction n_D de l'eau désionisée (à réaliser en présence d'un examinateur).

Déposer une goutte d'eau désionisée sur le prisme du réfractomètre. Fermer l'appareil. Lire l'indice de réfraction et noter la température. Se reporter à la table 1 de l'annexe 1 et vérifier si le résultat est conforme à la valeur attendue.

1.2.2. Préparation de l'échantillon

L'échantillon fourni a été préparé de la manière suivante : le miel a été placé à l'étuve à 50 ± 2 °C en récipient fermé pendant un temps suffisant pour assurer la disparition des cristaux de sucre. Puis il a été homogénéisé et refroidi.

1.2.3. Mesure de l'indice de réfraction du miel (2 essais)

À l'aide d'une baguette de verre, déposer rapidement une goutte de miel sur le prisme du réfractomètre. Fermer l'appareil. Lire l'indice de réfraction et noter la température.

1. 3. Résultats

Se reporter à la table 2 de l'annexe 1 pour obtenir la teneur en eau du miel analysé, exprimée en pourcentage pondéral. Effectuer si nécessaire une correction de température, selon les indications données en annexe 1.

Conclure.

Compléter la feuille de résultats de l'annexe 3.

2. DÉTERMINATION DE L'ACIDITÉ LIBRE PAR POTENTIOMÉTRIE

Une autre caractéristique de composition exigée, en vue de la commercialisation d'un miel, est la teneur en acides libres ; celle-ci doit être inférieure à 40 mmol d'ions H^+ .kg⁻¹ ; une valeur plus élevée pourrait correspondre à une acidité modifiée artificiellement et notamment indiquer un résidu d'acide oxalique ou formique venant d'un traitement anti-varroa (acarien parasite de l'abeille).

2. 1. Principe

On entend par acidité libre, l'acidité titrable par l'hydroxyde de sodium jusqu'au pH du point équivalent. Elle est obtenue en traçant la courbe de titration du miel par une solution titrée d'hydroxyde de sodium et en déterminant à partir de cette courbe le volume équivalent de solution titrante.

2. 2. Mode opératoire

2.2.1. Préparation de l'échantillon

Peser, au centigramme près, une masse m voisine de 5 g de miel ; dissoudre dans quelques mL d'eau désionisée puis transférer quantitativement dans une fiole jaugée de 50 mL et compléter à 50 mL avec de l'eau désionisée.

2.2.2. Dosage (1 essai)

Réaliser un montage potentiométrique avec une sonde pHmétrique et étalonner le dispositif en utilisant la procédure fournie.

Dans un bécher de contenance appropriée, introduire :

- E = 25 mL de la dilution obtenue précédemment,
- un barreau aimanté.

Noter le pH.

Placer le bécher sur un agitateur magnétique et régler celui-ci de façon à obtenir une agitation modérée qui sera maintenue pendant toute la durée du dosage. Verser la solution d'hydroxyde de sodium contenue dans une semi-microburette de 10 mL, par fractions de 0,2 mL réduites à 0,1 mL dès que les variations de pH deviendront plus importantes. Noter le pH immédiatement après chaque addition d'hydroxyde de sodium.

2. 3. Résultats

Compléter la feuille de résultats de l'annexe 3.

Construire la courbe de titration $\text{pH} = f(V_{\text{NaOH}})$. Joindre le graphe à la copie.

Déterminer graphiquement le point d'équivalence ; noter ses coordonnées (pH , V_{NaOH}).

Calculer la teneur du miel en acides libres, exprimée en mmol/kg^{-1} . Conclure.

Donnée :

Concentration de la solution d'hydroxyde de sodium : voisine de $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$.

La valeur exacte sera communiquée au cours de l'épreuve.

3. DOSAGE ENZYMATIQUE DU GLYCÉROL

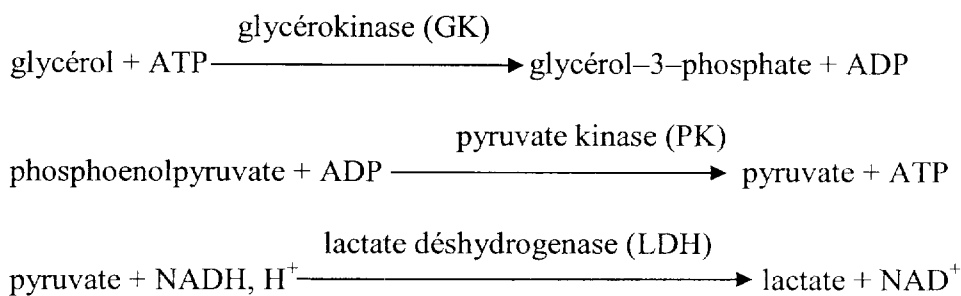
Le dosage du glycérol par méthode enzymatique constitue un procédé efficace et rapide pour mettre en évidence la fermentation d'un miel. En effet, le glycérol est naturellement présent en faible quantité dans les miels, mais il s'en forme en quantité appréciable au cours du processus de fermentation du miel ; la corrélation est parfaite entre le taux de glycérol dans le miel et l'importance de la fermentation subie par celui-ci.

Si le taux mesuré dépasse 100 mg.kg^{-1} la fermentation est certaine mais imperceptible à la gustation et ceci jusqu'à 200 mg.kg^{-1} .

A partir de 200 mg.kg^{-1} , des anomalies sensorielles et gustatives deviennent perceptibles.

Au-delà de 300 mg.kg^{-1} , ces anomalies sont évidentes et le miel n'est alors plus commercialisable.

3. 1. Principe de la méthode



3. 2. Mode opératoire

3.2.1 Préparation de la solution « S »

La solution « S » **fournie a été obtenue** de la manière suivante :

Une masse $m = 4,896 \text{ g}$ de miel a été pesée et additionnée de quelques mL d'eau désionisée. Après homogénéisation, la solution obtenue a été transférée quantitativement dans une fiole jaugée de 10 mL que l'on a ajusté avec de l'eau désionisée.

3.2.2. Dosage du glycérol de la solution « S » et du contrôle « C »

Se reporter à l'annexe 2 (réactifs et mode opératoire).

Effectuer un essai sur la solution « S » et un essai sur le contrôle « C ».

La concentration en glycérol du contrôle C sera communiquée au cours de l'épreuve.

3.3. Résultats

Calculer les variations d'absorbance : $\Delta A = A_1 - A_2$ pour chaque cuve.

Calculer la variation d'absorbance nette de chaque essai : $\Delta A_E = \Delta A_{\text{essai}} - \Delta A_{\text{témoin}}$.

Établir la relation littérale donnant la concentration molaire du glycérol dans les solutions S et C.

Faire les applications numériques de façon à obtenir les concentrations molaires puis massiques du glycérol dans chacune de ces 2 solutions.

Interpréter le résultat obtenu pour la solution contrôle.

Calculer la teneur en glycérol, exprimée en mg.kg^{-1} , du miel analysé. Conclure.

Compléter la feuille de résultats de l'annexe 3.

Données :

ϵ_{NADH} à 340 nm = 6 300 $\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$

M glycérol = 92,10 g.mol^{-1}

CV de la méthode = 2,5%.

ASPECTS MICROBIOLOGIQUES DU MIEL (30 points)

Les micro-organismes présents dans le miel sont essentiellement des levures et des bactéries sporulantes. Les formes végétatives de ces bactéries sont absentes. Le miel présente en effet des propriétés antimicrobiennes qui empêchent la croissance de nombreux micro-organismes. On se propose de mesurer l'activité bactériostatique d'un miel « toutes fleurs » du commerce.

1. ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ BACTÉRIOSTATIQUE D'UN MIEL

L'activité antibactérienne du miel peut être caractérisée par une note de 0 à 5 en fonction de la dilution nécessaire pour obtenir l'inhibition de la croissance d'une culture de *Bacillus subtilis* (souche Pasteur).

1.1 Vérification de la pureté de la souche test de *Bacillus subtilis*

Isoler la souche sur une gélose normale ordinaire. Incuber 24h à 37°C.

1.2 Mise en culture de la souche test sur un milieu contenant différentes dilutions du miel

1.2.1. Matériel et réactifs

6 Tubes à essai (témoin de croissance et n°1 à n°5) contenant différents volumes (voir tableau ci-après) d'un milieu de culture de composition :

Peptone 10 g
Agar 25 g
Eau distillée qsp 1L

Solution de miel (solution à 50% (masse/volume) en eau physiologique)

Culture de *Bacillus subtilis* en suspension en eau physiologique

Bain thermostaté à 50°C

6 boîtes de Pétri stériles

Pipettes stériles de 10 mL

Pipettes Pasteur stériles

1.2.2. Mode opératoire

Maintenir à une température voisine de 50°C les tubes contenant le milieu de culture d'une part et le miel de l'autre.

A l'aide d'une pipette, prélever la solution de miel et la mélanger au milieu dans les proportions suivantes :

Tubes n°	1	2	3	4	5	Témoin de croissance
Milieu de culture (mL)	7,5	9	10,5	12	13,5	13,5
Solution de miel (mL)	7,5	6	4,5	3	1,5	1,5
Proportion du miel dans le milieu de culture final (%)	25	20	15	10	5	5

Agiter au vortex et couler chaque mélange en boîte de Pétri stérile.

Après refroidissement, étaler à la surface de chaque boîte 4 gouttes de suspension bactérienne.

Incuber 24 h à 35°C.

2. NUMÉRATION DES LEVURES PRÉSENTES DANS LE MIEL

Les levures que l'on peut trouver dans le miel sont des levures osmophiles, capables de se multiplier dans des solutions très concentrées en sucre. Elles peuvent être responsables d'une fermentation du miel, processus naturel, exploité par l'homme pour obtenir une boisson alcoolisée, l'hydromel. Ce processus débute lorsque la teneur en eau du miel est trop élevée. La production d'hydromel reste un débouché intéressant pour les apiculteurs dont les miels ont commencé une fermentation.

On souhaite dénombrer les levures dans le miel.

2.1. Matériel et réactifs

2 mL d'une dilution au 1/10 du miel à analyser
deux tubes de 9 mL de diluant stérile (eau peptonée à 0,1% + saccharose à 20%)
6 géloses à l'extrait de malt contenant 50% de saccharose
2 pipettes graduées de 1 mL
1 P100 ou 1 pipette graduée de 1 mL (pour distribuer 0,1 mL)

2.2. Préparation des échantillons

Une dilution au 1/10 du miel a été préparée en introduisant de façon aseptique 25 g de miel dans 225 ml du diluant.
Préparer les dilutions 10^{-1} et 10^{-2} de cette solution de miel en eau peptonée avec saccharose.

2.3. Ensemencement

Ensemencer 0,1 mL de la solution de miel initiale ou 0,1 mL de chacune de ses dilutions à la surface de géloses d'extrait de malt contenant 50 % (m/m) de saccharose.
Prévoir deux essais par dilution.
Incuber 48 heures à 25°C.

3. ASPECTS MACROSCOPIQUE ET MICROSCOPIQUE DES LEVURES PRÉSENTES DANS LE MIEL

Les levures présentes dans le miel ont été isolées sur un milieu Sabouraud – chloramphénicol.

Réaliser l'examen macroscopique de la culture.
Réaliser un examen microscopique (état frais).
Présenter les résultats de vos observations dans un compte-rendu.

ANNEXE 1

TABLE 1

correspondance entre l'indice de réfraction de l'eau et la température

°C	n_D	°C	n_D	°C	n_D
15	1,33339	22	1,33280	29	1,33206
16	1,33331	23	1,33271	30	1,33194
17	1,33324	24	1,33261	31	1,33182
18	1,33316	25	1,33250	32	1,33170
19	1,33307	26	1,33240	33	1,33157
20	1,33299	27	1,33229	34	1,33144
21	1,33290	28	1,33217	35	1,33131

TABLE 2

INDICE de réfraction à 20 °C.	POURCENTAGE réel d'eau.	INDICE de réfraction à 20 °C.	POURCENTAGE réel d'eau.
1,5041.....	13,0	1,4910.....	18,2
1,5035.....	13,2	1,4905.....	18,4
1,5030.....	13,4	1,4900.....	18,6
1,5025.....	13,6		
1,5020.....	13,8	1,4895.....	18,8
1,5015.....	14,0	1,4890.....	19,0
1,5010.....	14,2	1,4885.....	19,2
1,5005.....	14,4	1,4880.....	19,4
1,5000.....	14,6	1,4876.....	19,6
		1,4871.....	19,8
1,4995.....	14,8	1,4866.....	20,0
1,4990.....	15,0	1,4862.....	20,2
1,4985.....	15,2	1,4858.....	20,4
1,4980.....	15,4	1,4853.....	20,6
1,4975.....	15,6	1,4849.....	20,8
1,4970.....	15,8	1,4844.....	21,0
1,4965.....	16,0	1,4828.....	21,5
1,4960.....	16,2	1,4815.....	22,0
1,4955.....	16,4	1,4802.....	22,5
1,4950.....	16,6	1,4789.....	23,0
1,4945.....	16,8	1,4777.....	23,5
1,4940.....	17,0	1,4764.....	24,0
1,4935.....	17,2	1,4752.....	24,5
1,4930.....	17,4	1,4739.....	25,0
1,4925.....	17,6	1,4726.....	25,5
1,4920.....	17,8	1,4714.....	26,0
1,4915.....	18,0	1,4702.....	26,5

Correction de température

Si la mesure a été effectuée à une température différente de 20°C, l'indice de réfraction lu doit être corrigé de façon à obtenir l'indice à 20°C.

Le terme correctif est de 0,00023 par °C ; la correction est additive si la mesure a été faite à une température inférieure à 20°C, soustractive dans le cas contraire.

ANNEXE 2

DOSAGE ENZYMATIQUE DU GLYCÉROL (d'après Boehringer)

RÉACTIFS :

Solution 1 : tampon glycine pH 7,4 ; NADH ; ATP ; phosphoénolpyruvate ; sulfate de magnésium ; stabilisateurs

Suspension 2 : pyruvate kinase ; lactate déshydrogénase

Suspension 3 : glycérokinase

MODE OPÉRATOIRE :

Conditions de mesure :

Longueur d'onde : 340 nm

Trajet optique : 1 cm

Température : 20-25 °C

Lire contre l'air ou l'eau désionisée

Réalisation du test :

Introduire dans les cuves :	Témoin	Essai
Solution 1	1,000 mL	1,000 mL
Echantillon à analyser		0,100 mL
Eau désionisée	2,000 mL	1,900 mL
Suspension 2	0,010 mL	0,010 mL
Mélanger. Attendre 5 à 7 minutes et lire l'absorbance A_1 . Déclencher la réaction principale par addition de :		
Suspension 3	0,010 mL	0,010 mL
Mélanger. Attendre 10 minutes et lire l'absorbance A_2 .		

N° de poste :

ANNEXE 3

Feuille de résultats BIOCHIMIE (à compléter et à joindre à la copie)

1. Détermination de la teneur en eau d'un miel

	n_D	température
Eau désionisée		
Miel essai 1		
Miel essai 2		

2. Détermination de l'acidité libre

Tableau de résultats :

V_{NaOH} (mL)	
pH	

V_{NaOH} (mL)	
pH	

Point d'équivalence : pH = V_{NaOH} (mL) =

3. Dosage du glycérol

Absorbance à 340 nm	Témoin	Solution « S »	Contrôle « C »
A_1			
A_2			