

BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR BIOANALYSES ET CONTRÔLES

Épreuve E5 - Unité U51

Techniques de biochimie

Au cours de l'épreuve, le jury appréciera les qualités d'organisation, le respect des règles d'hygiène et de sécurité en laboratoire.

L'ordre de déroulement des manipulations sera indiqué aux candidats en début d'épreuve.

Documents interdits - Calculatrice autorisée

ÉPREUVE E5. UNITÉ U51
Techniques de biochimie

QUELQUES ASPECTS DES CONTRÔLES
DE QUALITÉ SUR UN MIEL

La qualité d'un miel peut être étudiée par différentes approches : sensorielle, organoleptique, pollinique, physicochimique, biochimique.

On se propose d'effectuer quelques analyses relatives au contrôle de la qualité d'un miel d'acacia liquide :

- teneur en eau par mesure réfractométrique,
- composition en glucides par chromatographie sur couche mince,
- activité diastase par une technique enzymatique,
- teneur en proline par une méthode colorimétrique.

On dispose de miel d'acacia liquide pur et de deux échantillons « M » et « P » obtenus selon le protocole suivant :

Homogénéiser le miel d'acacia à l'aide d'une baguette de verre. Peser à 0,01 g près 10 g de miel dans un bécher de 50 mL, les dissoudre dans 25 à 30 mL d'eau distillée, transvaser quantitativement dans une fiole jaugée de 100 mL et compléter jusqu'au trait de jauge.

On obtient l'échantillon « M ». L'échantillon « P » a la même concentration massique en miel mais a été préparé de manière à stabiliser la proline contenue.

1 - Teneur en eau. (14 points)

La teneur en eau (W) est un paramètre légal. Seuls les produits qui contiennent au maximum 20 % d'eau peuvent prétendre à l'appellation « miel ».

1.1 - Principe.

La teneur en eau d'un miel est déterminée à partir de l'indice de réfraction du miel à 20°C. L'indice est corrélé à la teneur en eau par l'expression suivante (arrêté du 15/02/1977) :

$$W = \frac{-0,26810 - \log (IR-1)}{0,002243}$$

Avec : - W en g d'eau pour 100 g de miel.
- IR : indice de réfraction à 20°C.

Si la mesure de l'indice se fait à une température différente de 20°C, une correction de l'indice de réfraction est nécessaire :

- Pour une mesure de l'indice réfraction réalisée à une température supérieure à 20°C, corriger l'indice mesuré par soustraction de $2,3 \cdot 10^{-4}$ par °C supérieur.
- Pour une mesure de l'indice réfraction réalisée à une température inférieure à 20°C, corriger l'indice mesuré par addition de $2,3 \cdot 10^{-4}$ par °C inférieur.

1.2 - Matériel et réactifs :

- Réfractomètre du type ABBE non numérique étalonné par de l'eau distillée à la température ambiante avec fiche de procédure d'utilisation.
- Thermomètre.
- Chronomètre.
- Bâtonnet de prélèvement.
- Miel d'acacia liquide à température ambiante noté « Miel ».

1.3 - Protocole opératoire.

Vérifier l'étalonnage de l'appareil.

S'assurer que le prisme du réfractomètre est propre et sec.

A l'aide d'une spatule, recouvrir la surface du prisme avec l'échantillon.

Après 2 min d'attente, lire l'indice de réfraction.

Nettoyer le prisme.

Recommencer l'opération avec une nouvelle prise d'essai de miel.

Effectuer les mesures en présence d'un examinateur.

1.4 - Compte-rendu.

Compléter la feuille de résultats.

À partir de l'indice de réfraction mesuré, calculer la teneur en eau du miel à 20°C (en g d'eau pour 100 g de miel).

Conclure.

Justifier les 2 minutes d'attente avant lecture de l'indice de réfraction.

Préciser les précautions à prendre lors du nettoyage du prisme.

2 - Composition qualitative en glucides. (18 points)**2.1 – Principe.**

Les glucides représentent 80 % de la masse des miels. Leur identification et leur dosage sont des éléments clé du contrôle des appellations florales et de la recherche de certaines fraudes.

Les glucides en concentration suffisante peuvent être aisément identifiés par chromatographie sur couche mince.

2.2 - Matériel et réactifs :

- **Phase stationnaire** : 2 plaques de gel de silice activées (dimensions : 5 x 10 cm).
- **Phase mobile** : n-butanol, acide acétique, eau distillée en 4V/2V/1V (NOCIF ; CORROSIF).
- Solutions aqueuses de glucides témoins : fructose, glucose, maltose, mélibiose, raffinose, saccharose.
- Solution « M » de miel notée « M » à 100 g.L⁻¹ (3 mL).
- Réactif et dispositif de révélation.

2.3 - Protocole opératoire.

Dans un tube à hémolyse, diluer la solution « M » au 1/20^e.

Saturer la cuve de chromatographie par la phase mobile.

Utiliser judicieusement les deux plaques pour réaliser les dépôts des témoins et de la solution « M » diluée. Réaliser les dépôts.

Placer les plaques dans la cuve de chromatographie et laisser migrer.

Laisser sécher les plaques.

Appliquer le réactif de révélation.

Placer quelques minutes à l'étuve à 110°C.

2.4 - Compte rendu.

Compléter la feuille de résultats.

Identifier les glucides présents dans le miel. Justifier.

Conclure.

Préciser l'intérêt de l'activation des plaques de silice.

Laisser les chromatogrammes sur le poste de travail.

3 - Activité diastase (amylase). (21 points)

La transformation par l'abeille des nectars et miellats en miel se fait par l'adjonction d'enzymes. L'activité diastase (amylase) dépend de l'origine florale du miel et du traitement que ce dernier subit. Un chauffage du miel détruit les enzymes.

L'activité diastase du miel s'exprime en unités « Schade » ; elle doit être au minimum égale à 8 unités.

1 unité « Schade » correspond à la quantité d'enzyme contenue dans 1 g de miel, capable d'hydrolyser 0,01 g d'amidon en 1 heure à 40°C.

3.1 – Principe.

Le substrat est un polymère d'amidon insoluble couplé à un chromophore bleu. Lorsqu'il est hydrolysé, le substrat libère des fragments solubles colorés. L'absorbance à 620 nm de la solution est proportionnelle à l'activité diastase.

3.2 - Matériel et réactifs :

- Substrat : Tablettes Phadebas ® (amylase test) noté « Phadebas » (3 tablettes).
- Solution d'hydroxyde de sodium à 0,5 mol.L⁻¹ noté « NaOH 0,5 mol.L⁻¹ » (CORROSIF) (5 mL).
- Tampon acétate 0,1 mol.L⁻¹, pH = 5,2 noté « Tampon acétate » (50 mL).
- Solution « M » de miel notée « M » à 100 g.L⁻¹ (3 mL).
- Filtres.

3.3 - Protocole opératoire.

Essais (2)

À partir de la solution « M », préparer une solution à 10 g.L^{-1} de miel en tampon acétate.
Dans un tube à essais, introduire 5 mL de solution de miel à 10 g.L^{-1} .
Préincuber à 40°C .
Démarrer la réaction enzymatique par addition d'une tablette de Phadebas® (temps = 0).
Agiter au vortex jusqu'à désintégration complète du substrat (environ 10 secondes).
Incuber 15 min exactement dans un bain thermostaté à 40°C .
Arrêter la réaction enzymatique par addition de 1 mL de solution d'hydroxyde de sodium à $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$.
Agiter au vortex.
Filtrer rapidement la solution obtenue.
Mesurer l'absorbance du filtrat à 620 nm contre de l'eau distillée.

Témoin

Réaliser exactement dans les mêmes conditions opératoires que les essais, un témoin permettant d'estimer l'autolyse du substrat.

3.4 - Compte-rendu.

Dans les conditions du dosage, l'activité diastase (DN = « diastase number »), exprimée en unités « Schade », est donnée par l'expression suivante :

$$\text{DN} = 28,2 \times \Delta A_{620 \text{ nm}} + 2,64$$

Donner la composition du témoin réalisé.
Calculer l'activité diastase du miel analysé.
Conclure.
Préciser le mode d'action de la solution d'hydroxyde de sodium.

Donnée : le coefficient de variation de la méthode est de 5 %.

4 - Teneur en proline. (27 points)

La teneur en proline est une indication pour apprécier la qualité et déceler d'éventuelles fraudes. En effet, la norme exige une teneur en proline supérieure à 200 mg de proline par kg de miel. La teneur en proline est déterminée au moyen du dosage colorimétrique à la ninhydrine. Elle est exprimée en mg de proline par kg de miel.

4.1 - Principe : méthode dérivée de la méthode de COUGH.

La proline et la ninhydrine forment un complexe coloré dont le maximum d'absorbance se situe à 510 nm.

4.2 - Réactifs :

- Réactif à la ninhydrine en distributeur noté « Ninhydrine » : mélange volume à volume de :
 - Acide formique (HCOOH) à 98-100% (CORROSIF).
 - Solution de ninhydrine à 3 % dans du méthylcellosolve (TOXIQUE).
- Mélange propanol-2 / eau (V/V) noté « Propanol-2/eau » (INFLAMMATOIRE et IRRITANT).
- Solution étalon mère de proline notée « Etalon proline » à 80 mg.L^{-1} (3 mL).
- Solution « P » notée « P » à $100 \text{ g miel.L}^{-1}$ (3 mL).

4.3 - Protocole opératoire.

Gamme étalon

Réaliser une gamme étalon de 6 tubes selon le protocole suivant :
0 à $500 \mu\text{L}$ de la solution étalon mère.
Compléter à $500 \mu\text{L}$ avec de l'eau distillée.
Ajouter 2 mL du réactif à la ninhydrine.
Mélanger, boucher les tubes avec du coton cardé.
Incuber 20 minutes au bain thermostaté à 100°C ., refroidir dans un bain d'eau froide.
Ajouter 5 mL de la solution propanol-2/eau dans chaque tube et boucher immédiatement.
Après 20 minutes, lire les absorbances à 510 nm. La coloration est stable pendant 1 heure.

Essais

Réaliser dans les mêmes conditions que la gamme étalon, deux essais avec $500 \mu\text{L}$ de solution « P ».

4.4 - Compte-rendu.

Compléter la feuille de résultats.

Exploiter les résultats expérimentaux à l'aide de l'outil informatique.

Calculer la teneur en proline du miel en mg.kg^{-1} .

Conclure.

Préciser pourquoi les tubes de colorimétrie sont bouchés immédiatement après ajout du mélange propanol-2/eau.

Indiquer combien de temps on peut conserver les tubes après ajout du mélange propanol-2/eau.

Donnée : le coefficient de variation de la méthode est de 5 %.

Feuille de résultats

poste n°.....

1 - Teneur en eau.

Température de mesure en °C	Indices mesurés		Indice de réfraction moyen	Indice de réfraction corrigé

2 - Composition en glucides.

	Fructose	Glucose	Maltose	Mélibiose	Raffinose	Saccharose
Couleur						
Rf						

<u>Miel</u>	
Couleur	
Rf	

3 - Activité diastase (amylase).

	Témoin	Essais	
A 620 nm			
ΔA 620 nm			

4 - Teneur en proline.

N° Tube	1	2	3	4	5	6	E 1	E 2
Volume solution étalon à 80 mg.L ⁻¹ en mL								
Quantité de proline en $\mu\text{g}/\text{tube}$								
A 510 nm								