

**BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR**  
**QUALITÉ DANS LES INDUSTRIES ALIMENTAIRES**  
**ET LES BIO-INDUSTRIES**

**U52 – TECHNIQUES D'ANALYSES ET DE CONTRÔLES**

Durée : 6 heures

Coefficient 3

**PREMIER JOUR**

**Durée : 4 heures 30**

Les calculatrices de poche sont autorisées conformément à la circulaire n° 99-186  
du 16 novembre 1999.

Tout autre document est interdit

Documents à rendre avec la copie : Feuilles de résultats, pages 9/11 et 10/11.

Ce sujet comporte 11 pages numérotées de 1 à 11.  
Assurez-vous qu'il est complet dès que le sujet vous est remis.

# BTS QUALITÉ DES LES INDUSTRIES ALIMENTAIRES ET LES BIO-INDUSTRIES

SESSION 2007

U52 – Techniques d'analyses et de contrôles

## CONTRÔLE DE QUALITÉ DU VIN

Le vin est, selon sa définition légale, « le produit de la fermentation du raisin frais ou du jus de raisin frais ». Il s'agit d'un produit biologique issu d'une fermentation alcoolique menée par des levures, suivie d'une fermentation malolactique bactérienne.

PREMIER JOUR (4 heures30)

### BIOCHIMIE (25 points)

L'acidité est une des caractéristiques essentielles du vin. Elle résulte de nombreux facteurs, en particulier la présence de gaz dissous (dioxyde de carbone et dioxyde de soufre) et de nombreux acides organiques.

Ces acides organiques peuvent être naturellement présents dans le raisin. Une fois la fermentation alcoolique terminée, le vin présente un excès d'acidité dû à ces différents acides : acide tartrique (biologiquement stable), acide malique, acide citrique.

Lors de la fermentation malolactique, l'acide malique (diacide) est transformé en acide lactique (monoacide). L'acidité diminue et le vin devient plus moelleux.

En parallèle de la fermentation malolactique, beaucoup de bactéries lactiques transforment l'acide citrique en acide éthanoïque ce qui augmente l'acidité volatile du vin.

Accidentellement, l'acide tartrique peut être attaqué par certaines bactéries lactiques qui le décomposent en acide lactique avec augmentation de l'acidité volatile : c'est la maladie de la « tourne ».

### 1. DOSAGE DE L'ACIDE CITRIQUE

La concentration en acide citrique des vins est variable. Elle est généralement comprise entre 0 à 0,5 g.L<sup>-1</sup>.

L'acide citrique est parfois ajouté à certains vins pour :

- remonter l'acidité fixe (surtout pour les vins blancs secs) et ainsi améliorer l'acidité gustative du vin ;
- fixer le fer ferrique dans un complexe afin de traiter la « casse ferrique ».

## 1.1. Principe

### 1.1.1. Préparation de l'échantillon de vin à doser

Le dosage sera réalisé sur un échantillon de distillat obtenu selon le mode opératoire suivant :  
E = 25 mL de vin sont déposés sur une résine échangeuse d'anions.

L'acide citrique est élué sélectivement par une solution d'hydroxyde de sodium à 2 mol.L<sup>-1</sup>.

Il est alors transformé par oxydation ménagée en acétone et en éthanal ; une mole d'acide citrique donne une mole d'éthanal et une mole d'acétone.

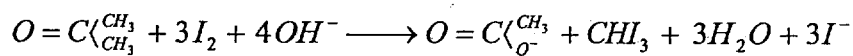
Acétone et éthanal sont séparés par distillation ; on obtient un distillat appelé « D ».

L'acétone du distillat est dosé par iodométrie.

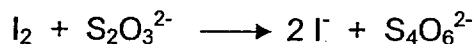
### 1.1.2. Principe du dosage iodométrique

Il s'agit d'un dosage en retour.

En milieu basique, l'acétone est oxydée par un excès de diiode selon l'équation :



Le diiode n'ayant pas réagi est dosé par une solution de thiosulfate selon l'équation :



## 1.2. Matériel et réactifs

Distillat à doser « D » présenté en flacon étanche

Solution d'hydroxyde de sodium à 5 mol.L<sup>-1</sup> notée « NaOH »

Solution de diiode à environ 0,01 mol.L<sup>-1</sup> notée « diiode »

Solution d'acide sulfurique au 1/5 notée « H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1/5 »

Solution de thiosulfate à environ 0,03 mol.L<sup>-1</sup> notée « thiosulfate »

« thiodène » ou « empois d'amidon »

Eprouvette de 10 mL

Fiole d'Erlenmeyer

Pipette jaugée de 25 mL

Burette

## 1.3. Mode opératoire

### 1.3.1. Essais

Deux essais seront réalisés.

Introduire dans une fiole d'Erlenmeyer bouchant émeri contenant 10 mL du distillat « D » :

- 5 mL d'hydroxyde de sodium,

- 25 mL de solution de diiode.

Laisser en contact 20 minutes à l'obscurité.

Ajouter 8 mL d'acide sulfurique et titrer l'excès de diiode par une solution de thiosulfate . La visualisation à l'approche du virage peut être facilitée par addition de thiodène ou d'empois d'amidon.

Soient V<sub>1</sub> et V<sub>2</sub> les volumes de thiosulfate versés.

Ajouter 8 mL d'acide sulfurique et titrer l'excès de diode par une solution de thiosulfate . La visualisation à l'approche du virage peut être facilitée par addition de thiodène ou d'empois d'amidon.

Soient  $V_1$  et  $V_2$  les volumes de thiosulfate versés.

### 1.3.2. Témoin

Réaliser 1 témoin :

Faire dans les mêmes conditions un dosage à blanc en remplaçant le volume de distillat par 10 mL d'eau désionisée.

Soit  $V_t$  le volume de thiosulfate versé.

## 1.4. Résultats

Compléter l'annexe 1 (à rendre avec la copie).

Établir, à partir du témoin, la formule littérale de la concentration molaire de la solution de diode utilisée.

Etablir la formule littérale donnant la concentration massique en acide citrique du vin étudié. Effectuer l'application numérique.

Calculer la concentration massique en acide citrique du vin testé.

Données :

la concentration exacte de la solution de thiosulfate sera fournie par le centre.

$M_{\text{acide citrique}} = 192,12 \text{ g.mol}^{-1}$

$CV = 2 \%$  ou  $s = 0,003 \text{ g.L}^{-1}$

Conclure par rapport aux concentrations d'acide citrique généralement retrouvées dans les vins.

## 2. DOSAGE DU FER

Le vin contient toujours du fer en faibles concentrations (2 à 5  $\text{mg.L}^{-1}$ ). Dans les vins maintenus à l'abri de l'air, le milieu étant réducteur, le fer est entièrement à l'état ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Dans les vins renfermant du dioxygène dissous à la suite d'une aération, le fer s'oxyde et passe à l'état ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) qui est capable de précipiter la matière colorante « casse bleue » ou l'acide phosphorique « casse blanche ». Ces deux phénomènes forment la casse ferrique pouvant apparaître lorsque la teneur en fer atteint 10 à 20  $\text{mg.L}^{-1}$ .

La méthode de référence du dosage du fer est la spectrophotométrie d'absorption atomique. Il existe par ailleurs une méthode usuelle de dosage qui consiste, après minéralisation du vin par le peroxyde d'hydrogène, à doser le fer par colorimétrie en présence d'orthophénantroline.

### 2.1. Préparation de l'échantillon de vin à doser

Le dosage sera réalisé sur un échantillon de minéralisat de vin obtenu selon le mode opératoire suivant :

E = 50 mL de vin a été minéralisé en présence de peroxyde d'hydrogène, d'acide chlorhydrique et d'hydroxyde d'ammonium. La totalité du minéralisat obtenu a été transférée dans une fiole jaugée de volume U = 10 mL et complétée à U mL.

Ce minéralisat est appelé « M ».

## 2.2. Dosage du fer du minéralisat de vin

### 2.2.1. Matériel et réactifs

Minéralisat de vin noté « M »

Solution étalon de fer à  $0.200 \text{ g.L}^{-1}$  notée « Fer à  $0.200 \text{ g/L}$  »

Solution d'hydroquinone à  $2 \text{ g.L}^{-1}$  notée « Hydroquinone »

Solution d'orthophénantroline à  $5 \text{ g.L}^{-1}$  notée « Orthophénantroline »

Fliale jaugée de 100 mL

Pipette jaugée de 5 mL

Semi-microcuvettes visibles + portoir

Pipette jaugée de 1 mL

Pipette automatique P1000 + cônes bleus

### 2.2.2. Mode opératoire

Colorimétrie : Dans chaque cuve, introduire :

X mL de la solution de fer (étalon ou solution à doser)

eau désionisée qsp 1 mL

0,2 mL de solution d'hydroquinone

Agiter et laisser reposer 10 minutes.

0,4 mL de réactif à l'orthophénantroline

Agiter et laisser reposer 20 minutes.

Gamme d'étalonnage :

- à partir de la solution de fer à  $0.200 \text{ g.L}^{-1}$ , préparer une solution étalon à  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$  ;

- avec cette solution à  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , réaliser une gamme d'étalonnage (6 cuvettes) contenant de 0 à  $10 \mu\text{g}$  de fer par cuvette.

Essais :

Réaliser deux essais sur le minéralisat « M » selon le même protocole.

Introduire 1 mL de minéralisat dans la cuvette.

### 2.2.3. Compte-rendu

Expliquer la préparation de la solution à  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Compléter le tableau de colorimétrie de l'annexe 1.

Après traitement informatique, donner l'équation de la droite de régression et le coefficient de corrélation.

Déterminer la concentration massique en fer dans le minéralisat étudié en  $\text{mg.L}^{-1}$ .

Données : CV = 3 % ou s =  $0,12 \text{ mg.L}^{-1}$

Déterminer la concentration massique en fer dans le vin analysé en  $\text{mg.L}^{-1}$ .

## 3. CONCLUSION GÉNÉRALE

Au vu des résultats obtenus, proposer la mesure qui devrait être prise afin d'améliorer la qualité du vin testé.

## **IMMUNOLOGIE (10 points)**

Lors du procédé de fabrication du vin, une étape de soutirage par filtration permettant l'élimination des levures est nécessaire afin d'assurer la stabilité microbiologique du vin.

Afin de faciliter cette étape, certains producteurs réalisent préalablement une étape appelée collage. Il s'agit d'éliminer des débris cellulaires et des protéines en ajoutant au vin une quantité importante de protéines comme l'albumine (addition de blanc d'œuf) ou du gluten (addition d'un hydrolysate enzymatique du gluten obtenu à partir de farine). Ces protéines réagissent avec les colloïdes et les tanins pour former des floculats qui sédimentent au fond des cuves et qui seront éliminés lors du passage du vin sur des presses.

Le vin peut être ensuite plus aisément filtré.

La présence résiduelle de ces protéines utilisées pour le collage du vin doit être étudiée et quantifiée afin d'évaluer le risque que présente le produit pour les personnes allergiques (albumine de l'œuf) ou intolérantes (gluten).

### **1. MATÉRIEL ET RÉACTIFS**

Boîte de gel d'agarose à 1%

Echantillons de vin à analyser notés « V<sub>1</sub> » et « V<sub>2</sub> »

Sérum anti gluten noté « Ac anti gluten »

Sérum anti albumine de poule noté « Ac anti albumine »

Emporte pièce pour creuser les puits

Pipette automatique P20 ou P50 + cônes jaunes

### **2. MODE OPÉRATOIRE**

#### **2.1. Préparation des puits**

Creuser les puits à l'aide d'un emporte pièce selon le gabarit fourni en annexe 2.

#### **2.2. Répartition des réactifs**

Déposer 5 µL par puits.

Choisir une disposition permettant de vérifier la présence des différentes protéines utilisables pour le collage dans le vin à tester.

#### **2.3. Diffusion**

Mettre en chambre humide à température ambiante pendant 24-48 heures.

### **3. COMPTE-RENDU**

3.1. Donner le nom de la technique utilisée.

3.2. Compléter le gabarit (Annexe 2) en identifiant clairement la nature et la localisation des différents dépôts.

## **MICROBIOLOGIE (25 points)**

Les levures et les bactéries sont responsables des étapes de transformation conduisant au vin. Parmi celles-ci, on trouve des bactéries lactiques (bactéries à Gram positif) et des bactéries acétiques (bactéries à Gram négatif).

L'analyse microbiologique des vins et des moûts correspond à la détection, la différenciation et le dénombrement des micro-organismes. Quelques unes de ces analyses sont abordées dans le sujet.

### **1. DÉNOMBREMENT DES LEVURES VIVANTES D'UN VIN BLANC**

#### **1.1. Matériel**

1 tube de 5 mL de « vin blanc + n° » dans la glace  
1 tube contenant 0,5 mL de « bleu de Funk »  
6 tubes de 9 mL d'eau physiologique stérile  
6 géloses Sabouraud-chloramphénicol en grande boîte de Pétri notées « Sabouraud »  
1 hématimètre de Malassez  
1 compte globules  
6 pipettes stériles de 1 mL ou équivalent  
billes de verre stériles ou râteau stérile  
pipettes Pasteur stériles

#### **1.2. Numération en hématimètre de Malassez**

A partir du tube noté « vin blanc + n° », réaliser une dilution au 1/2 en bleu de méthylène de Funk. Attendre 5 minutes.

Dénombrer les levures vivantes de cette dilution en hématimètre de Malassez (Annexe 3).

Préciser dans le compte-rendu l'aspect des cellules vivantes.

Montrer à un examinateur :

- la mise en hématimètre,
- un champ microscopique mis au point ainsi que la valeur du nombre de levures vivantes dénombrées dans ce champ.

Déterminer le nombre de levures vivantes par mL de vin blanc.

#### **1.3. Dénombrement en milieu solide**

En fonction des résultats de la numération précédente, déterminer les trois dilutions à ensemercer pour dénombrer les levures vivantes du vin blanc, en milieu solide par une technique en surface et en double essai.

Justifier sur le compte-rendu le choix des dilutions à ensemercer.

Montrer à un examinateur la réalisation d'une dilution.

Réaliser ce dénombrement et incubé les boîtes pendant 48 heures à 30°C.

## **2. OBSERVATION DES MICRO-ORGANISMES PRESENTS DANS UN VIN BLANC**

Un essai de tenue à l'air est réalisé à partir d'un vin blanc. Il s'agit de placer un échantillon de vin dans une fiole d'Erlenmeyer stérile bouché par un coton et de le laisser trois jours à température ambiante.

### **2.1. Matériel et réactifs**

1 tube de l'échantillon de vin noté « V + n° » dans la glace  
lame de verre  
pipettes Pasteur stériles  
colorants pour la coloration de Gram.

### **2.2. Manipulation et compte-rendu**

Décrire l'aspect du tube noté « V+n° ».  
Réaliser une coloration de Gram.  
Montrer un champ microscopique après rédaction du compte-rendu à un examinateur.  
Proposer une orientation pour chacun des micro-organismes observés.  
Conclure sur une contamination éventuelle du vin blanc analysé.



**ANNEXE 1**

**À COMPLÉTER ET À RENDRE AVEC LA COPIE**

**FEUILLE DE RÉSULTATS BIOCHIMIE**

Candidat n°

Dosage de l'acide citrique

Essai 1		Essai 2		Témoin	
$V_1 =$	mL	$V_2 =$	mL	$V_T =$	mL

Dosage du fer

Tube								
V solution étalon à $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (mL)								
V minéralisat « M » (mL)								
V eau désionisée (mL)								
V hydroquinone (mL)								
V orthophénantroline (mL)								
Masse de fer ( $\mu\text{g}$ )								
Absorbance à 490 nm								

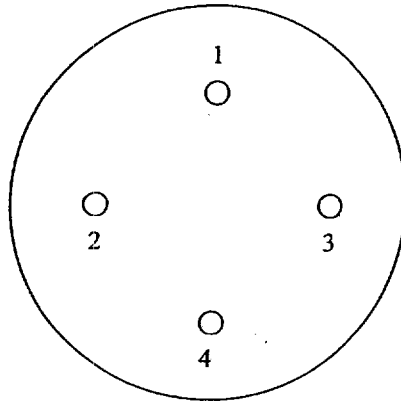
ANNEXE 2

À COMPLÉTER ET À RENDRE AVEC LA COPIE

Candidat n°

Etude des résidus de protéines

Gabarit :



Nature des dépôts :

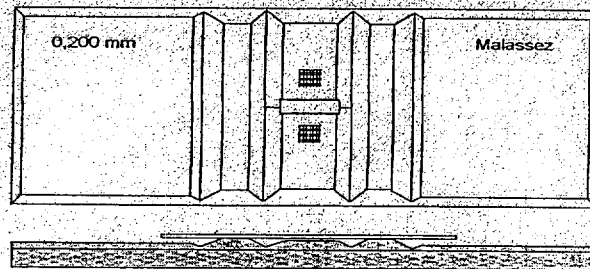
1 :

2 :

3 :

4 :

# 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 :

