

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.

Documents interdits - Calculatrice autorisée

ÉPREUVE E5. UNITÉ U51
Techniques de biochimie

CONTRÔLE DES POLYPHOSPHATES AJOUTÉS DANS UN FILET DE CABILLAUD SURGELÉ

L'arrêté du 02/10/1997 autorise l'emploi de polyphosphates en quantité limitée à **5 g/kg** dans les filets de poissons et les produits de crustacés congelés ou surgelés pour leur effet cryoprotecteur et rétenteur d'eau. L'extension de ces dispositions aux mollusques a été publiée dans la directive 98/72/CE du 15/10/1998.

Cette réglementation distingue 4 groupes de phosphates : orthophosphates (E338-341), diphosphates (E450), triphosphates (E451), polyphosphates (E452). Toutefois, ces composés sont indissociables dans les préparations commerciales. Au sein des denrées, ils subissent une hydrolyse inévitable en leur terme ultime : les orthophosphates. Le texte prévoit donc une utilisation seule ou en mélange de ces additifs, avec une limite maximale par denrée exprimée en P_2O_5 (g/kg).

On se propose de contrôler la conformité d'un échantillon de filet de cabillaud surgelé avec l'arrêté du 02/10/1997 :

- analyse chromatographique de la présence des polyphosphates ajoutés dans l'échantillon (CCM),
- le dosage du phosphore total,
- le dosage des protéines de l'échantillon.

Les données de sécurité figurent en **annexe 3**.

1 - Recherche des polyphosphates ajoutés par chromatographie sur couche mince (CCM) **(16 points)**

1.1 - Principe

La séparation d'un extrait trichloracétique contenant les polyphosphates est réalisée sur couche mince de cellulose avec l'éluant : isopropanol / eau / acide trichloracétique / ammoniacque.

Les molécules phosphorées sont révélées par pulvérisation successive de deux réactifs :

- le réactif n° 1 hydrolyse les polyphosphates et forme un complexe phospho-molybdique jaune,
- le réactif n° 2 réduit ce complexe en un complexe de couleur bleue, mieux marquée.

1.2 - Matériel et Réactifs

- Cuve à chromatographie (sous la hotte) + couvercle.
- Phase stationnaire : plaque CCM cellulose 10 x 5 cm prête à l'emploi.
- Phase mobile : solvant (acide trichloracétique, eau, ammoniacque, propan.2-ol) en distributeur réglé sur 10 mL (sous la hotte).
- Solutions témoins à $1,25 \text{ g.L}^{-1}$ en tube à hémolyse conservées dans la glace :
 - monophosphate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4, \text{H}_2\text{O}$),
 - diphosphate ($\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7, 10 \text{ H}_2\text{O}$),
 - triphosphate ($\text{Na}_5 \text{P}_3\text{O}_{10}$).
- Échantillon « C » en tube à hémolyse conservé dans la glace.
- Tubes capillaires.
- Thermoventilateurs (sous la hotte).
- Étuve réglée à $100 \text{ }^\circ\text{C}$.
- Réactif de révélation n° 1 (sous la hotte) en pulvérisateur.
- Réactif de révélation n° 2 (sous la hotte) en pulvérisateur.
- Gants de protection en latex.
- Gants de protection thermique.

1.3 - Protocole opératoire

1.3.1 - Préparation de l'échantillon « C » (déjà réalisée)

- Peser 25,0 g de filet de cabillaud broyé, directement dans un bécher.
- Ajouter 7,5 g d'eau. Homogénéiser le mélange.
- Ajouter 5,0 g d'acide trichloracétique ; mélanger.
- Après 30 minutes d'attente au réfrigérateur, filtrer.
- Soit « C » l'échantillon obtenu, conservé dans la glace.

1.3.2 - Chromatographie

Introduire 10 mL de phase mobile dans une cuve à chromatographie. Saturer l'atmosphère de la cuve en vapeurs de solvant pendant environ 15 minutes.

Effectuer rapidement les dépôts des témoins et de l'échantillon « C ».

Placer la chromatoplaque dans la cuve le plus rapidement possible après avoir effectué les dépôts afin de limiter l'hydrolyse des polyphosphates en monophosphate.

Laisser migrer environ 1 heure 30.

À l'issue de la migration, placer la plaque dans l'étuve à 100 °C pendant environ 2 minutes.

Laisser refroidir la plaque.

Placer la plaque verticalement sous la hotte et pulvériser le réactif n° 1 à environ 25 cm de la plaque, de façon uniforme, en évitant de mouiller la cellulose.

Laisser la plaque à l'étuve environ 15 minutes.

Laisser refroidir la plaque.

Pulvériser le réactif n° 2 dans les mêmes conditions que le réactif n° 1.

Laisser la plaque à l'étuve environ 2 minutes.

Pulvériser à nouveau le réactif n° 2 dans les mêmes conditions que précédemment afin d'homogénéiser et d'intensifier la coloration.

Laisser la plaque à l'étuve environ 2 minutes.

1.4 - Résultats

Compléter le tableau de résultats en **annexe 1** (à rendre avec la copie).

Remarque : les valeurs de R_f ne sont pas utilisées.

Calculer le rapport distance de migration du di ou triphosphate sur la distance de migration du monophosphate.

Comparer les rapports obtenus pour l'échantillon « C » à ceux calculés pour les témoins.

Identifier les différents composés phosphorés présents dans l'échantillon « C ».

Conclure.

Laisser le chromatogramme au poste de travail en fin d'épreuve.

2 - Dosage du phosphore total par méthode spectrophotométrique (40 points)

Le dosage du phosphore total est adapté de la norme AFNOR NF V04-406 de septembre 1992 – Viandes, préparations de viande et produits à base de viande – Détermination du phosphore total, transposable aux produits de la mer.

2.1 - Principe

Après minéralisation et oxydation par voie humide par l'acide sulfurique et le peroxyde d'hydrogène, les orthophosphates sont dosés par spectrophotométrie d'absorption moléculaire à 700 nm. En présence d'une solution acide de molybdate d'ammonium (réactif sulfomolybdique), les orthophosphates forment un complexe phosphomolybdique qui est réduit par l'hydroquinone et le sulfite de sodium.

2.2 - Matériels et réactifs

- Échantillon « P » à doser (environ 5 mL).
- Solution étalon de dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4) à $2,72 \text{ g.L}^{-1}$ (environ 5 mL) : étalon « DHP ».
- Réactif sulfomolybdique en distributeur.
- Hydroquinone en distributeur.
- Sulfite de sodium en distributeur.
- 1 fiole jaugée de 10 mL.
- 1 fiole jaugée de 20 mL.
- 1 pipette jaugée de 1 mL.
- 2 pipettes jaugées de 2 mL.
- 2 pipettes graduées double traits de 2 mL.
- 1 pipette jaugée de 5 mL.
- Tubes à essais.
- Macrocuves visibles sur portoir.

2.3 - Protocole opératoire**2.3.1 - Préparation de l'échantillon « P » (déjà réalisée)**

Peser une masse m d'environ 3 g d'un broyat d'un filet de cabillaud.

Introduire cette masse dans un matras de minéralisation avec 25 mL d'acide sulfurique et 10 mL de peroxyde d'hydrogène.

Porter à ébullition pendant 1 heure.

Refroidir et ajouter 10 mL environ d'eau oxygénée.

Poursuivre la minéralisation pendant 2 heures.

Laisser refroidir puis transférer quantitativement dans une fiole jaugée de 200 mL et compléter au trait de jauge avec de l'eau distillée. Soit « P » l'échantillon obtenu.

2.3.2 - Dosage de l'échantillon « P »Dilution préalable

Diluer l'échantillon « P » au $1/5^{\text{ème}}$ dans l'eau distillée.

Effectuer la dilution en présence d'un examinateur.

Dosage

Introduire dans un tube à essai :

- 2 mL de l'échantillon « P » dilué,
- 5 mL d'eau distillée,
- 1 mL de réactif sulfomolybdique,
- 1 mL de sulfite de sodium,
- 1 mL d'hydroquinone.

Laisser 30 minutes à l'obscurité puis lire l'absorbance à 700 nm contre un témoin réactif.

2.3.3 - Étalonage du spectrophotomètre

Préparer à partir de la solution étalon « DHP » une solution fille à 1 mmol.L^{-1} de phosphore.

Réaliser une gamme d'étalonnage de 6 tubes contenant de 0 à $2 \mu\text{mol}$ de phosphore par tube.

Traiter chaque étalon comme l'échantillon dilué.

2.4 - Résultats

Indiquer sous forme d'un tableau complet le mode de préparation de la gamme d'étalonnage et des essais.

Justifier la dilution de l'étalon.

Compléter le tableau de résultats donné en **annexe 1** (à rendre avec la copie).

Exploiter les résultats expérimentaux à l'aide de l'outil informatique : tracer la courbe d'étalonnage.

Valider les mesures.

Donner les paramètres de la droite de régression.

En tenant compte de l'écart de répétabilité s_r déterminer la concentration molaire en phosphates de l'échantillon « P » en mmol.L^{-1} en suivant la démarche décrite dans l'**annexe 2**.

Calculer la teneur en phosphore total en g de P_2O_5 pour 100 g de filet de cabillaud.

Exprimer le résultat encadré en fonction de l'incertitude composée U_c ($U_c = 0,02 \text{ g P}_2\text{O}_5$ pour 100 g de poisson).

Données :

Masse de broyat $m = 3,0023 \text{ g}$

M de $\text{KH}_2\text{PO}_4 = 136,1 \text{ g.mol}^{-1}$

M de $\text{P} = 31 \text{ g.mol}^{-1}$

M de $\text{P}_2\text{O}_5 = 142 \text{ g.mol}^{-1}$

$S_r = 0,05 \text{ mmol.L}^{-1}$

3 - Dosage des protéines par la méthode de Kjeldahl (22 points)

La détermination de la quantité de phosphore ajouté se fait par différence entre le phosphore total et le phosphore naturel.

Le phosphore naturel présent dans les viandes et les produits de la mer est corrigé par le taux de protéines, par le biais d'un indice phosphate ou indice de Popen : IP.

$$IP = \frac{\text{P}_2\text{O}_5}{\text{protéines}} \times 100$$

Connaissant la valeur de l'indice de Pompen pour une espèce animale donnée, on obtient la valeur en phosphore ajouté :

$$P_2O_5 \text{ ajouté} = P_2O_5 \text{ total} - \left(\frac{\text{protéines}}{100} \right) \times IP$$

avec IP : indice de Pompen, sans unité

P_2O_5 (ajouté et total) : en g de P_2O_5 pour 100 g de poisson
protéines en g pour 100 g de poisson.

Le dosage des protéines est adapté de la norme AFNOR NF V04-407 de septembre 2002 – Viandes, produits à base de viande et produits de la pêche – Détermination de la teneur en azote total.

3.1 - Principe

Après minéralisation des matières organiques d'un échantillon de filet de cabillaud par l'acide sulfurique en présence d'un catalyseur, suivie d'une alcalinisation des produits de la réaction, l'ammoniac libéré est distillé. Le distillat est récupéré et ajusté. Une prise d'essai de ce distillat est mis en présence d'un volume connu et en excès d'acide sulfurique afin d'être dosé par une solution d'hydroxyde de sodium.

3.2 - Matériel et réactifs

- 1 burette de 20 ou 25 mL.
- 3 erlens de 250 mL.
- 2 pipettes jaugées de 10 mL.
- Échantillon « D » à doser (50 mL).
- Acide sulfurique (100 mL).
- Hydroxyde de sodium à 0,300 mol.L⁻¹ (120 mL).
- Phénolphthaléine.

3.3 - Protocole opératoire

3.3.1 - Préparation de l'échantillon « D » (déjà réalisée)

Minéraliser une masse m d'environ 2 g de filet de cabillaud.

Distiller le minéralisat et recueillir le distillat dans une fiole jaugée de 50 mL.

Compléter au trait de jauge avec de l'eau distillée. Soit « D » la solution obtenue.

3.3.2 - Dosage de l'ammoniac du distillat

Dans un erlen, introduire 10 mL de l'échantillon « D » à doser.

Ajouter 10 mL de la solution d'acide sulfurique.

Ajouter quelques gouttes de phénolphthaléine.

Verser la solution d'hydroxyde de sodium jusqu'au virage de l'indicateur.

Soit V_1 la chute de burette obtenue.

Réaliser un témoin en parallèle avec les essais.

Soit V_2 la chute de burette obtenue.

Faire relever les chutes de burette par un examinateur.

3.4 - Résultat

Compléter le tableau de résultats en **annexe 1** (à rendre avec la copie).

Dans les conditions du dosage, l'expression littérale de la concentration massique ρ en azote du distillat est donnée par l'expression suivante :

$$\rho = 0,42 \times (V_2 - V_1)$$

avec : ρ concentration massique en azote du distillat en g.L⁻¹

et $V_2 - V_1$ en mL.

Justifier cette expression littérale.

Calculer la concentration massique en azote du distillat ρ en tenant compte de l'écart-type de répétabilité.

Calculer la teneur en g de protéines pour 100 g de filet de cabillaud en suivant la démarche décrite dans l'**annexe 2**.

Exprimer le résultat encadré en fonction de l'incertitude composée ($U_c = 0,35$ g protéine/100 g de poisson).

Données :

Masse de filet de cabillaud $m = 1,8530 \text{ g}$

$M_N = 14 \text{ g.mol}^{-1}$

$M_H = 1 \text{ g.mol}^{-1}$

$S_r = 0,2 \text{ g.L}^{-1}$

Les protéines du poisson contiennent 16 % d'azote.

4 - Conclusion (2 points)

Calculer la teneur de P_2O_5 ajouté dans le filet de cabillaud.

Conclusion.

Données :

L'indice de Pompen (IP) du filet de cabillaud est de 2,45.

L'arrêté du 2/10/1997 autorise l'emploi de polyphosphates en quantité limitée à 5 g/kg dans les filets de poisson.

DANS CE CADRE

Académie : _____ Session : _____

Examen ou Concours _____ Série* : _____

Spécialité/option* : _____ Repère de l'épreuve : _____

Épreuve/sous-épreuve : _____

NOM : _____

(en majuscules, suivi s'il y a lieu, du nom d'épouse)

Prénoms : _____ N° du candidat

Né(e) le : _____

(le numéro est celui qui figure sur la convocation ou la liste d'appel)

* Uniquement s'il s'agit d'un examen.

NE RIEN ÉCRIRE

Repère : BAE5TB/3

SESSION 2008

Durée : 4 H00

Page : 6/10

Coefficient : 4

ANNEXE 1
Relevé de valeurs expérimentales
Feuille de résultats à rendre avec la copie

Poste n°

Recherches par CCM de polyphosphates ajoutés

	distances de migration	rapports
	unité :	
monophosphate		
diphosphate		
triphosphate		
échantillon C		

Dosage du phosphore total par méthode spectrophotométrique

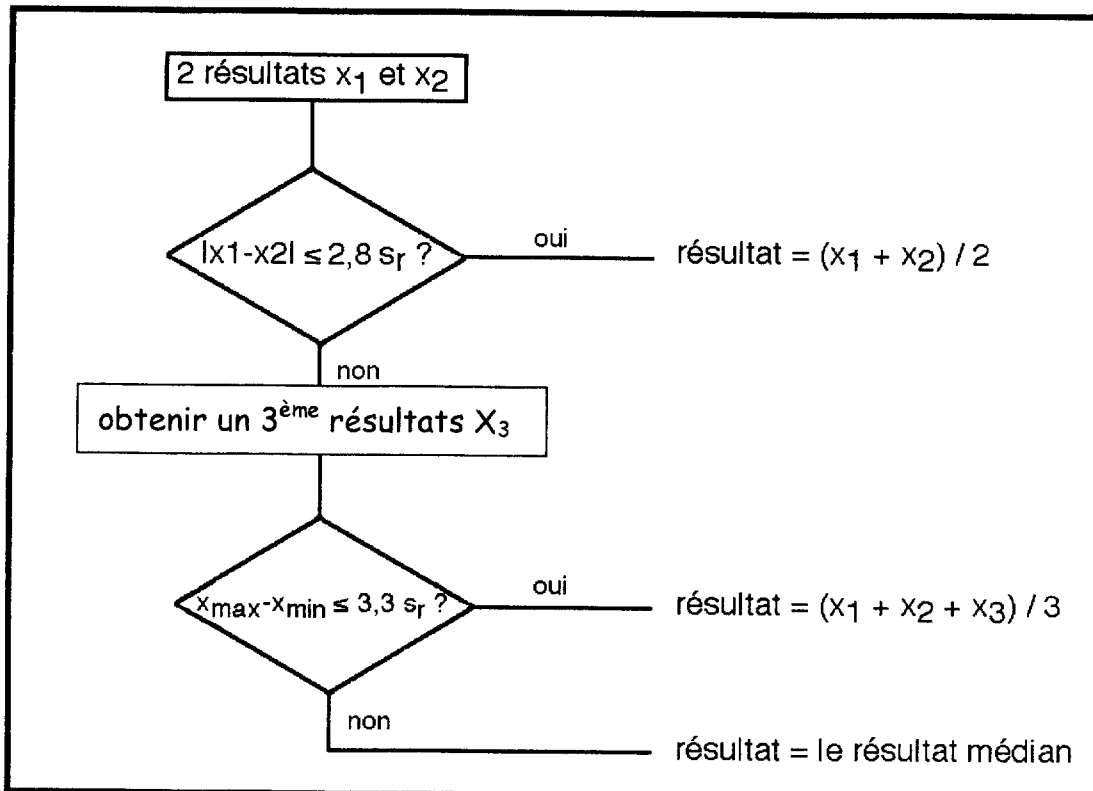
µmoles de phosphore par tube	
absorbance à 700 nm	

Dosage des protéines par la méthode de Kjeldahl

	Témoin (V ₂)		Essais
			(V ₁)
chutes de burette d'hydroxyde de sodium (mL)			

ANNEXE 2**EXPRESSION DES RÉSULTATS NUMÉRIQUES**

- Logigramme de traitement des données expérimentales



- Expression du résultat



Le nombre de chiffres significatifs pour exprimer le résultat final établi sera en adéquation avec l'expression numérique de l'écart-type de répétabilité (s_r).

Dans l'expression du résultat comporte :













- La valeur de s_r ;
- le nombre de résultats expérimentaux utilisés pour le calcul du résultat final établi ;
- le traitement mathématique à l'origine du résultat (moyenne arithmétique ou médiane) ;
- l'incertitude élargie calculée à l'aide de l'incertitude composée (u_c) et d'un facteur d'élargissement 2 qui donne un niveau de confiance d'environ 95 % ;
- le résultat final encadré : $X \pm$ incertitude élargie (unité précisée).

ANNEXE 3


















DONNÉES DE SÉCURITÉ

	Symboles des risques	Phrases des risques	limites		Concentration de travail
Diphosphate de sodium	R S	R S			
Triphosphate de sodium	R S	R S			
Solvant de migration		R11-34-36-37-67 S 7-16-24/25-26-36/37/39-45	Conc ≥ 20%	R11-34-36-37-67	100%
			15% < conc < 20%	R 11-34-67	
			10% < conc < 15%	R 11-34	
			5% < conc < 10%	R 11-36/38	
			conc ≤ 5%	R	
révélateur n° 1		R 35	Conc ≥ 10%	R 11-35	100%
			5% < conc < 10%	R 11-34	
			Conc = 5%	R 11-41	
			1% ≤ conc < 5%	R 36/3	
			conc < 1%	R	

ANNEXE 3 (suite) DONNÉES DE SÉCURITÉ

	Symboles des risques	Phrases des risques	limites			Concentration de travail
révélateur n° 2		R 41	Conc ≥10%	R 41		100%
			5% < conc < 10%	R 36		
			conc < 5%	R		
Réactif sulfomolybdique		R 35 S 26-30-36/37/39-45	Conc ≥10%	R 35		100%
			5% < conc < 10%	R 34		
			conc < 5%	R 41		
			1% < conc < 5%	R 36/38		
			Conc ≥1%	R		
Sulfite de sodiun		R 31-36/37/38 S 26-36	Conc ≥20%	R 22-40-41-43-50-68		20%
			conc < 20%	R		
Phénolphtaléine		R 11 S 7-16	Conc ≥5%	R 11		100%

ANNEXE 3 (suite)
DONNÉES DE SÉCURITÉ

	Symboles des risques	Phrases des risques	limites		Concentration de travail	
hydroquinone	 	R 22-40-41-43-50-68 S 26-36/37/39-61	Conc ≥25%	R 22-40-41-43-50-68	 	1%
			10% < conc < 25%	R 40-41-43-68		
			5% ≤ conc < 10%	R 40-36-43-68		
			1% ≤ conc < 5%	R -40-43-68		
			conc < 1%	R		
Hydroxyde de sodium		R 35 S 26-36/37/39-45	Conc ≥5%	R 35		
			2,5% < conc < 5%	R 34		
			Conc = 2,5%	R 41		
			0,5% ≤ conc < 2,5%	R 36/38		
			conc < 0,5%	R		
Acide sulfurique		R 35 S 26-30-36/37/39-45	Conc ≥ 10 %	R 35		2,45%
			5% < conc < 10 %	R 34		
			Conc = 5%	R 41		
			1% < conc < 5%	R 36/38		
			conc < 1%	R		