

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 DE PARAMÈTRES BIOCHIMIQUES SUR DES
BISCUITS DESTINÉS AUX NOURRISSONS ET
ENFANTS EN BAS ÂGE

La directive européenne 96/5/CE concernant les préparations à base de céréales et aliments pour enfants en bas âge tient compte de la fragilité des bébés et de leurs besoins nutritionnels spécifiques.

Des seuils minimaux sont recommandés pour certains nutriments, dont le fer, afin de limiter les risques de carences.

À l'inverse, des seuils maximaux sont définis pour contrôler les apports en sucre et protéines notamment.

Pour répondre à ces normes, les fabricants d'aliments pour bébés mettent en place un contrôle très strict, de la production jusqu'au produit final.

On se propose de contrôler :

- deux paramètres sur des biscuits pour enfants en bas âge, juste avant mise en sachet :
 - teneur en protéines,
 - teneur en sucre ajouté (glucose, fructose) ;
- la concentration en fer d'un ingrédient avant son utilisation dans la fabrication des biscuits.

Cahier des charges concernant les biscuits à consommer tels quels

Protéines : ne doit pas dépasser 23,5 g/100 g

Adjonction de saccharose, de glucose, de fructose ou de miel

- la quantité totale des sucres ajoutés ne doit pas dépasser 32,5 g/100 g

- la quantité totale de fructose ajouté ne doit pas dépasser 16,3 g/100 g

Enrichissement en fer : 9 mg de fer/100 g

Toutes les chutes de burettes et valeurs des absorbances seront relevées par le candidat en présence d'un examinateur.

1 - Dosage des protéines des biscuits par la méthode de Kjeldahl. (24 points)

Un dosage est effectué par une méthode en retour qui nécessite l'étalonnage préalable d'une solution.

1.1 - Étalonnage d'une solution d'hydroxyde de sodium environ 0,1 mol.L⁻¹.

1.1.1 - Réactifs.

- Acide oxalique dihydraté et RP : $(\text{COOH})_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$.
- Phénolphtaléine.
- Solution d'hydroxyde de sodium (150 mL).

1.1.2 - Mode opératoire.

Réaliser une pesée exacte et précise d'acide oxalique voisine de 100 mg.

Réaliser la pesée en présence d'un examinateur.

Après mise en solution et addition de quelques gouttes d'indicateur, verser la solution d'hydroxyde de sodium jusqu'au virage.

Réaliser deux pesées.

1.1.3 - Compte-rendu.

Compléter la feuille de résultats.

Établir la formule littérale donnant la concentration de la solution d'hydroxyde de sodium.

Réaliser l'application numérique.

Données :

Incertitude absolue = 0,5 mmol.L⁻¹.

Écart toléré entre les essais en condition de répétabilité : 1 mmol.L⁻¹.

H = 1 g.mol⁻¹ O = 16 g.mol⁻¹ C = 12 g.mol⁻¹

1.2 - Dosage des protéines.**1.2.1 - Préparation de l'échantillon.** (déjà effectuée)

La minéralisation a été réalisée sur 1,108 g de biscuit en présence de catalyseurs et d'acide sulfurique concentré et chaud.

La totalité du minéralisat alcalinisé a été distillée et recueillie dans un flacon **D** contenant exactement 20,00 mL d'une solution d'acide chlorhydrique.

Il s'agit d'effectuer la fin du dosage sur **D**.

1.2.2 - Réactifs.

- 2 flacons **D**.
- Solution d'acide chlorhydrique (40 mL).
- Solution d'hydroxyde de sodium précédemment étalonnée.
- Hélianthine.

1.2.3 - Mode opératoire.**Essai :**

Introduire dans chaque flacon **D**, quelques gouttes d'indicateur coloré.
Doser par la solution étalonnée d'hydroxyde de sodium.

Témoin :

Introduire dans une fiole d'Erlenmeyer 20,00 mL d'acide chlorhydrique.
Ajouter quelques gouttes d'indicateur coloré.
Doser par la solution étalonnée d'hydroxyde de sodium.

1.2.4 - Compte-rendu.

Compléter la feuille de résultats.

Établir l'expression littérale, puis calculer la masse de protéines dans 100 g de biscuit (on admettra que 1 g d'azote dosé provient de 6,25 g de protéines).

Commenter.

Données :

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

2 - Dosage du D-glucose et du D-fructose ajoutés par voie enzymatique en point final. (23 points)

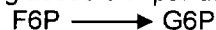
La recette étant élaborée avec un sirop de sucre inverti, on dose le D-glucose et le D-fructose dans les biscuits fins.

2.1 - Principe :

D-glucose et D-fructose sont phosphorylés sous l'effet de l'*hexokinase* en présence d'ATP :



Le fructose 6-P est isomérisé en glucose 6-P par une *phosphoglucose isomérase*.



Le glucose 6-P est oxydé en 6 phospho-D gluconate en présence d'une *glucose 6-phosphodéshydrogénase* et de NADP^+ .



L'augmentation de concentration en NADPH est suivie à 340 nm.

2.2 - Mode opératoire.**2.2.1 - Préparation de l'échantillon.** (déjà effectuée)

On pèse exactement et précisément 1,068 g de biscuit que l'on broie et mélange avec de l'eau désionisée et chaude pendant une nuit. Après filtration, l'eau de trempage a été ajustée dans une fiole de 1 L. Soit **F** le filtrat à analyser et fourni.

2.2.2 - Réactifs et matériels.

- Filtrat **F** (0,5 mL).
- **Solution 1** : tampon, ATP, Mg^{2+} (3,5 mL).
- **Suspension 2** : hexokinase, glucose 6-P déshydrogénase (0,08 mL).
- **Suspension 3** : phosphoglucose isomérase (0,08 mL).
- 3 macrocuvettes U.V.

2.2.3 - Dosage.

Réaliser le dosage sur F de la façon suivante. Doubler les essais.

Cuves	Blanc	Échantillon
Solution 1	1 mL	1 mL
Échantillon		0,1 mL
Eau distillée	2 mL	1,9 mL
Mélanger et lire l'absorbance A_1 après approximativement 3 minutes d'attente, contre une cuve contenant de l'eau distillée.		
Suspension 2	0,020 mL	0,020 mL
Mélanger et attendre la fin de la réaction (environ 20 minutes) et lire l'absorbance A_2 .		
Suspension 3	0,020 mL	0,020 mL
Mélanger et attendre la fin de la réaction (environ 20 minutes) et lire l'absorbance A_3 .		

2.3 - Compte-rendu.

Compléter la feuille de résultats.

Calculer $(A_2 - A_1)_{\text{ech}} - (A_2 - A_1)_{\text{blanc}}$. Que représente cette valeur ?

Calculer $(A_3 - A_2)_{\text{ech}} - (A_3 - A_2)_{\text{blanc}}$. Que représente cette valeur ?

Établir la formule littérale et calculer la concentration en D-glucose dans F.

Même question pour le D-fructose.

En déduire la teneur en sucres ajoutés pour 100 g de biscuit. Commenter.

Données :

En condition de répétabilité et pour des concentrations voisines de celle de l'échantillon, l'écart toléré entre les ΔA retenus pour deux essais identiques est au maximum 0,06.

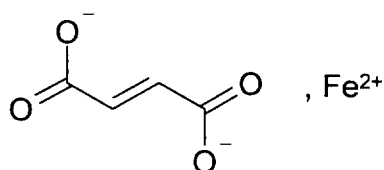
ϵ_{NADPH} à 340 nm : $6,3 \cdot 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

$M_{\text{D-glucose}}$: $180 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$.

$M_{\text{D-Fructose}}$: $180 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$.

3 - Dosage du Fer II dans une solution S par méthode colorimétrique. (33 points)

L'enrichissement des biscuits en fer est réalisé grâce à une solution S de fumarate de fer II de qualité alimentaire.



Fumarate de fer : $\text{C}_4\text{H}_2\text{FeO}_4$ $M = 169,90 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

$\text{Fe} = 56 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

3.1 - Réactifs et matériels :

- Solution étalon à exactement 60,68 mg fumarate de fer II. L^{-1} (30 mL), notée « Et Fer ».
- Tampon acétate pH 3,5 : en distributeur réglé sur 3 mL.
- Solution d'hydroquinone à 2 % : en distributeur réglé sur 1 mL.
- Solution de chlorhydrate d'ortho-phénanthroline à 1 % en distributeur réglé sur 0,5 mL.
- Solution S (20 mL).
- 7 macrocuvettes visibles.

3.2 - Mode opératoire.**3.2.1 - Étalonnage du spectrophotomètre.**

À l'aide de la solution étalon de fumarate de fer II, réaliser une gamme de cinq tubes contenant entre 0 et 80 µg de fer par tube.

Compléter chaque tube à 5,5 mL avec de l'eau distillée. Homogénéiser.

Puis ajouter dans l'ordre et en agitant entre chaque addition :

- 3 mL de tampon acétate pH 3,5.
- 1 mL de solution d'hydroquinone à 2 %.
- 0,5 mL de solution de chlorhydrate d'ortho-phénanthroline à 1 %.

Homogénéiser.

Laisser la coloration se développer au moins 30 minutes.

Lire l'absorbance à 510 nm. La coloration est stable au moins 1 heure.

3.2.2 - Essais.

Diluer la solution **S** au 1/10^{ème}, puis réaliser deux essais dans les mêmes conditions que la gamme avec 1 mL de solution **S** diluée.

3.3 - Compte-rendu.

Justifier les volumes de solution étalon introduits dans les tubes de la gamme d'étalonnage.

Compléter le tableau de colorimétrie sur la feuille de résultats.

À l'aide de l'outil informatique, tracer la droite d'étalonnage de l'appareil.

Valider les points expérimentaux.

Établir la formule littérale et calculer la concentration massique de la solution **S** en fer.

La recette prévoit l'addition de 20 mL de **S** pour 100 g de biscuits prêts à consommer. Cette solution peut-elle être utilisée ?

S'il y a lieu, justifier les précautions opératoires prises en cours et en fin de manipulation.

Données :

Dans les conditions du dosage, l'écart type de répétabilité est de 4 µg de fer.

On admettra que deux essais identiques sont acceptables si leur différence ne dépasse pas $2,8 \cdot \sigma_r$.

Si leur différence dépasse $2,8 \cdot \sigma_r$, il convient de réaliser un troisième essai, et les trois essais sont acceptables si la différence entre la plus grande valeur et la plus petite ne dépasse pas $3,3 \cdot \sigma_r$.

Nom du produit	Pictogramme	Phrase R et S	Limites
Acide oxalique, dihydraté		R 21/22 S 24/25	En solution considéré comme non dangereux
Hydroxyde sodium		R 35 S 26-36/37/39-45 Graves brûlures	L _C : 2 % (ou 0,5 mol/L) L _i : 0,5 % (ou 0,1 mol/L)
Acide chlorhydrique		R 34-37 S 26-36/37/39-45 Graves brûlures Irritant les voies respiratoires	L _C : 25 % (ou 7 mol/L) L _i : 10 % (ou 3 mol/L)
Sel de Mohr = Ammonium-fer (II) sulfate heptahydraté	Produit non dangereux		
Acide acétique		R 10-35 S 23-26-36/37/39-45 Graves brûlures Inflammable	L _C : 25 % (ou 4 mol/L) L _i : 10 % (ou 1,7 mol/L)
Acétate de sodium	Produit non dangereux		
Hydroquinone	 	R 22-40-41-43-50-68 S 26-36/37 /39-61 Effet cancérigène possible C ₃	L _{Xn} : 1 % L _N : 25 %
Chlorhydrate d'ortho-phénanthroline monohydraté	 	R 25-50/53 S 45-60-61	L _T : 3 % L _N : 25 %

ANNEXE 1 bis

**À distribuer aux candidats, en J1, une heure
après le début de l'épreuve (après avoir
ramassé la feuille n°4 de chaque candidat)**

