

EPREUVE PROFESSIONNELLE DE SYNTHÈSE

1ère partie : Etude d'opérations techniques

LES FERMENTATIONS

AMELIORATION DES QUALITES ORGANOLEPTIQUES DES VINS

L'usage d'un dictionnaire anglais-français est autorisé.

1) Lors de la vinification le raisin peut subir deux transformations :

- une fermentation alcoolique sous l'action de levures,
- une fermentation malolactique (F.M.L.) sous l'action de bactéries.

Celles-ci provoquent la transformation de l'acide malique, présent dans le fruit, en acide lactique. Leur intervention entraîne donc une perte d'acidité biologique du vin, puisqu'on passe d'un diacide à un monoacide.

On s'intéressera aux études portant sur l'optimisation de la fermentation malolactique.

2) Le vin est une denrée périssable ; il est susceptible de s'altérer sous l'action de micro-organismes divers.

On abordera, à l'aide d'un exemple, les moyens mis en œuvre dans la lutte contre les maladies d'origine microbienne.

I - OPTIMISATION DE LA CROISSANCE D'UNE SOUCHE DE BACTERIES MALOLACTIQUES : LEUCONOSTOC OENOS (28 POINTS).

L'extrait de levure constitue la principale source d'apport vitaminique d'un milieu de culture pour la plupart des micro-organismes. On se propose d'étudier l'influence de cet apport sur la croissance de *Leuconostoc oenos*.

1.1. Matériels et méthodes.

1.1.1. Souche utilisée.

A l'aide des documents I_A et I_B, dégager les principales caractéristiques morphologiques et culturales de l'espèce *Leuconostoc oenos*.

1.1.2. Préparation de l'inoculum.

La souche lyophilisée est réactivée pendant 2 à 3 heures sur le milieu M.R.S. (MAN, ROGOSA, SHARPE) modifié, dont la composition est présentée document IIa.

1.1.2.1. Définir succinctement la lyophilisation.**1.1.2.2.** Montrer que le milieu de réactivation utilisé répond aux exigences nutritionnelles et physico-chimiques de la souche.**1.1.2.3.** Proposer une méthode de stérilisation de la solution sucrée ajoutée extemporanément au milieu de base.**1.1.3.** Préparation du fermenteur et ensemencement du milieu de culture.

Le fermenteur utilisé est un fermenteur 2 litres muni des blocs de mesures et de régulations classiques. Sa stérilisation s'effectue selon le protocole suivant :

- mise en place de l'électrode de Clark,
- introduction de 1,6 L de milieu de culture,
- obturation de toutes les ouvertures, sauf une, et utilisation de filtres à l'arrivée et à la sortie d'air,
- mise en place d'une pince de Mohr au niveau du raccordement entre le tube plongeur d'arrivée d'air et le débitmètre,
- autoclavage 20 minutes à 120°C.

1.1.3.1. Justifier l'utilisation de la pince de Mohr à ce niveau.**1.1.3.2.** Dans quelles conditions physico-chimiques doit-on placer le milieu de culture avant d'entreprendre la calibration du 100 % de pO₂ de l'électrode de Clark ?**1.1.3.3.** Quel est l'ordre de grandeur du rapport à respecter entre volume de préculture à inoculer et volume de milieu de culture ?**1.1.4.** Evaluation de la biomasse.**1.1.4.1.** Plusieurs méthodes permettent de quantifier une population bactérienne.

Exposer succinctement en quoi consistent les méthodes turbidimétrique et gravimétrique.

1.1.4.2. Des essais préliminaires à la fermentation proprement dite sont réalisés afin de choisir la méthode de mesure la mieux adaptée. On détermine la valeur de la biomasse obtenue en phase stationnaire de croissance dans une série de milieux contenant des concentrations croissantes en glucose. Les résultats sont consignés document III.

Commenter l'allure de ces courbes. Que suggère une telle observation ?

Compte tenu de la concentration en glucose du milieu standard (document II_B) utilisé pour les fermentations, les deux méthodes sont-elles utilisables et dans quelles conditions ?

1.2. Résultats des fermentations.

Différentes fermentations ont été réalisées en présence de concentrations variées en extrait de levure. Les résultats sont consignés document IV.

Commenter les résultats obtenus.

II - OPTIMISATION DE LA FERMENTATION MALOLACTIQUE (F.M.L.) : ROLE DE LA MACERATION PELLICULAIRE DES VINS BLANCS (34 POINTS).

La macération pelliculaire est une pratique préfermentaire qui consiste à faire macérer les "pellicules" ("peaux" du raisin) pendant 12 à 20 heures à température ambiante dans le moût (jus) avant pressurage.

2.1. Suivi de la F.M.L. : dosage enzymatique de l'acide malique.

Avant ensemencement par *Leuconostoc oenos*, le milieu de culture standard utilisé est divisé en deux lots d'égal volume ; l'un est soumis à macération, l'autre non, et sert de témoin.

2.1.1. Analyse de la méthode (document V).

2.1.1.1. De quel type de méthode de dosage de substrat s'agit-il ?

2.1.1.2. Quel est l'intérêt de la réaction catalysée par la G.O.T. (ASAT) ?
A quelle condition doit obéir la concentration en glutamate dans le milieu réactionnel ?

2.1.1.3. Le réactif n°3 du coffret peut être contaminé par des traces de glutamate déshydrogénase. Quel inconvénient présente cette contamination pour le dosage ?

2.1.2. Résultats.

2.1.2.1. Etablir la formule littérale permettant de déterminer la concentration massique en acide malique dans le milieu de culture en fonction de la variation d'absorbance, ΔA .

Expliciter ΔA à partir des absorbances mesurées A_1 et A_2 pour le témoin et pour l'essai.

Donnée : si une dilution a été effectuée lors de la préparation de l'essai, multiplier le résultat par le facteur de dilution F .

2.1.2.2. On réalise un dosage de l'acide malique sur un prélèvement du milieu de culture effectué au temps $t = 0$.

On obtient $\Delta A = 0,104$ pour un essai sur ce milieu dilué au 1/100.

Calculer la concentration en acide malique en g.L^{-1} au temps $t = 0$.

Comparer ce résultat aux données du document II_B.

Données :

- la lecture est effectuée à 340 nm dans une cuve de 1 cm de trajet optique,

- acide malique = $134,09 \text{ g.mol}^{-1}$.

2.1.2.3. A l'aide du document VI, conclure quant à l'influence de la macération pelliculaire sur le déroulement de la fermentation malolactique.

2.2 Analyse du procédé de macération : dosage des acides gras totaux par chromatographie en phase gazeuse.
Les composants des pellicules tels que les acides aminés et les stérols n'ont qu'une faible influence sur la fermentation malolactique.

Par contre, des études récentes tendent à montrer que les acides gras, qui ne représentent pourtant qu'une faible fraction pelliculaire, y jouent un rôle notable.

Le dosage des acides gras est réalisé, avant ensemencement des bactéries, sur le milieu de culture :

- avant macération,
- après 20 heures de macération.

Ces acides sont extraits à partir du surnageant de centrifugation et méthylés.

2.2.1. Matériels et méthodes.

2.2.1.1. Les conditions d'analyse sont les suivantes :

- colonne : 50 m x 0,22 mm silice fondue WCOT
CP SIL 88 (0,2 μm)
température 190°C
gaz vecteur He 2 bars
- détecteur : FID $2 \cdot 10^{-11}$ Afs
- injecteur : CP "splitter"
volume injecté : 1 μL .

A l'aide du document VII, préciser la signification des caractéristiques de la colonne utilisée.

Sur quel principe chromatographique repose la séparation effectuée ? Justifier la réponse.

La nature de la phase stationnaire permet-elle d'expliquer les temps de rétention relatifs (T.R.R.) observés pour les acides gras en C18 ? (document VIII_A).

2.2.1.2. Quels sont les critères du choix d'un étalon interne ? Justifier l'emploi des deux étalons internes acides heptanoïque et heptadécanoïque.

2.2.1.3. Rappeler le principe de la méthode de l'étalonnage interne. En déduire la formule littérale exprimant la concentration des acides gras (en $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) dans les extraits.
Montrer l'intérêt de cette méthode.

2.2.2. Résultats.

2.2.2.1. A l'aide du document VIII_B, calculer la concentration des différents acides gras.
Expliciter le calcul sur un exemple. Rendre les documents VIII_A et VIII_B avec la copie.

- 2.2.2.2. Comparer les résultats des deux expériences en relevant les acides gras pour lesquels la différence de concentration est nette.
Quelles hypothèses peut-on faire quant à leur influence respective sur la fermentation malolactique ?

III - OPTIMISATION DES QUALITES ORGANOLEPTIQUES DU VIN : DETECTION IMMUNO-ENZYMATIQUE DES CONTAMINANTS MICROBIENS (18 POINTS).

Lorsque le nombre de levures *Brettanomyces* est supérieur à 50 cellules.mL⁻¹, la commercialisation du vin est impossible. La méthode de détection et de quantification la plus courante de ces levures est la mise en culture des vins après centrifugation, puis le comptage des colonies après deux semaines d'incubation, ce qui représente en Californie une dépense de plusieurs centaines de milliers de dollars par an. On a donc mis au point une méthode immuno-enzymatique de détection et de quantification des *Brettanomyces*. La technique utilisée est reportée dans le document IX.

3.1. Analyse du document IX.

- 3.1.1. A partir de ce document, proposer un schéma illustrant le principe de la méthode et expliquer le rôle des réactifs utilisés pour la réalisation de chaque étape.

Quelles sont les caractéristiques de cette méthode immuno-enzymatique ? Justifier les réponses.
- 3.1.2. La peroxydase sert de marqueur enzymatique révélant la réaction immunologique ; citer deux autres techniques d'immunomarquage.

Qu'est-ce qu'un conjugué ?
- 3.1.3. A partir de l'analyse de la composition des puits, préciser à quoi sont dues les absorbances mesurées sur les lignes A et C d'une part, B et D d'autre part.
- 3.1.4. Expliquer le rôle particulier des cupules A₁, A₂, B₁ et B₂.

3.2. Résultats de l'analyse des vins V₁ et V₂ (document X).

- 3.2.1. Construire sur papier millimétré la courbe d'étalonnage $ABS_A - ABS_B = f(\log N)$, à partir des étalons S1, S2, S3, S4, S5.
Que représente la différence $ABS_A - ABS_B$?
- 3.2.2. Déterminer la concentration en *Brettanomyces* dans les vins V₁ et V₂ ; ces vins sont-ils commercialisables ?

DOCUMENT IA

Genus *Leuconostoc* van Tieghem 1878, 198^{AL} emend mut. char. Hucker and Pederson 1930, 66^{AL}

ELLEN I. GARVIE

Leu.co.nos'toc. Gr. Adj. *leucus* clear, light; M.L. neut. n. *Nostoc* algal generic name; M.L. neut. n. *Leuconostoc* colorless nostoc.

Cells may be spherical but often lenticular particularly when growing on agar, cells usually occur in pairs and chains. Gram-positive, nonmotile, spores not formed. Facultative anaerobes.

Colonies are small usually less than 1.00 mm in diameter, smooth, round, grayish white. In stab cultures growth occurs along the stab with little surface growth. Broth cultures often have uniform turbidity but strains forming long chains tend to sediment. Optimum temperature 20–30°C and growth occurs between 5°C and 30°C. Chemooorganotrophs, requiring a rich medium often having complex growth factors and amino acid requirements. All species require nicotinic acid + thiamine + biotin and either pantothenic acid or a pantothenic acid derivative. No strains require cobalamin, or *p*-aminobenzoic acid.

Growth is dependent on the presence of a fermentable carbohydrate and glucose is fermented by a combination of the hexose-monophosphate and phosphoketolase pathways. However, the pathway of glucose fermentation in *Leuconostoc oenos* has not been fully confirmed. Fructose 1,6-diphosphate aldolase is absent, and an active glucose-6-phosphate dehydrogenase is present. CO₂

and D-ribulose-5-P are formed from glucose. Xylulose 5-P phosphoketolase is present and the resulting end products are ethanol and D-(–)-lactic acid. Some strains have an oxidative mechanism and acetic acid is formed in place of ethanol. Polysaccharides and alcohols (except mannitol) are usually not fermented. Malate can be utilized and converted to L-(+)-lactate.

Catalase-negative. Cytochromes are absent. Arginine is not hydrolyzed and milk is usually not acidified and curdled. Nonproteolytic. Indole is not formed. Nitrates not reduced. Nonhemolytic. Nonpathogenic to plants and animals (including humans). Properties separating the species are given in Table 12.26 and further information is given in Table 12.27.

The amino acid composition of the cross-linking peptide of the cell wall peptidoglycan is of the alanine, serine, lysine type (Table 12.28). The mol% G + C in the DNA is 38–44 (*T_m* and *Bd*) (Table 12.29). The type species is *Leuconostoc mesenteroides* (Tsenkovskii) van Tieghem 1878, 191.

DOCUMENT IB

Diagnostic characteristics of the species of the genus *Leuconostoc*^a

Characteristics	1. <i>L. mesenteroides</i> , subsp. ^b			2. <i>L. paramesenteroides</i>	3. <i>L. lactis</i>	4. <i>L. oenos</i>
	1a. <i>mesenteroides</i>	1b. <i>dextranicum</i>	1c. <i>cremoris</i>			
Acid from						
Arabinose	+	–	–	d	–	d
Cellulose	d	d	–	(d)	–	d
Fructose	+	+	–	+	+	+
Sucrose	+	+	–	+	+	–
Trehalose	+	+	–	+	–	+
Hydrolysis of esculin	d	d	–	d	–	+
Dextran formation	+	+	–	–	–	–
Growth at pH 4.8	–	–	–	d	–	+
Requirement for TJF	–	–	–	–	–	d
Growth in 10% ethanol	–	–	–	–	–	+
NAD-dependent G-6-PDH present	+	+	+	+	+	–

^a Symbols: see Table 12.2; also (d) delayed reaction; and TJF, glucopantothenate (tomato juice factor).

DOCUMENT IIA**MILIEU DE REACTIVATION DE LA SOUCHE****1) milieu de base**

- tryptone	10 g
- extrait de levure	10 g
- extrait de viande	5 g
- K ₂ HPO ₄	2 g
- acétate de sodium	5 g
- sulfate d'ammonium	2 g
- Mg SO ₄ , 7H ₂ O	0,2 g
- Mn SO ₄ , H ₂ O	0,05 g
- acide citrique	2 g
- acide malique	5 g
- eau distillée qsp	1000 mL

2) solution de sucre

- glucose	2 g
- fructose	2 g
- arabinose	2 g
- saccharose	2 g
- xylose	2 g
- eau distillée qsp	50 mL

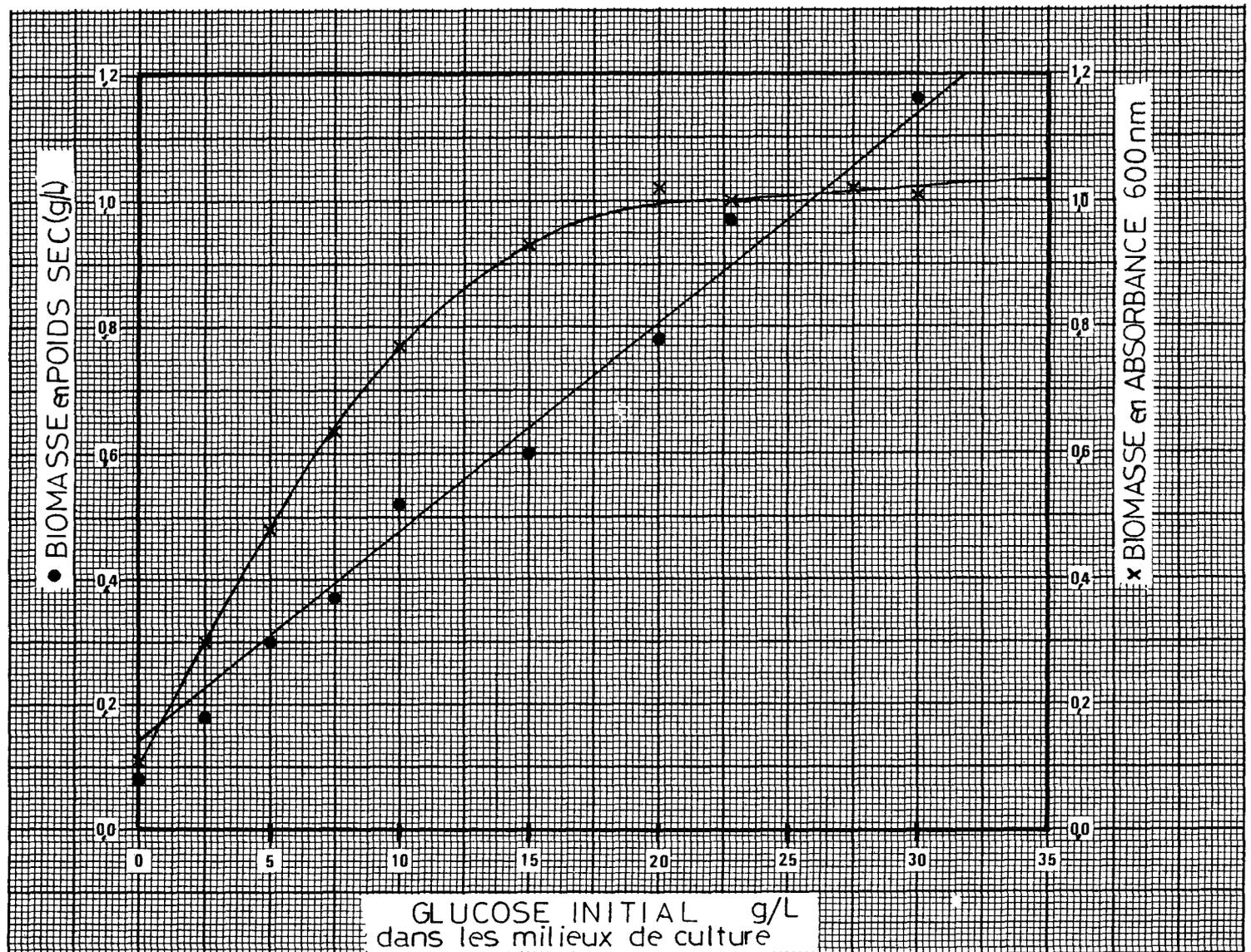
Autoclavage 20 minutes à 120°C.
pH ajusté à 5 avec NaOH 10 mol/L.

DOCUMENT IIB**MILIEU STANDARD DE PRECULTURE ET DE CULTURE**

- tryptone	20 g
- extrait de levure	10 g
- glucose	10 g
- acide malique	5 g
- acide citrique	2 g
- K ₂ HPO ₄	2 g
- Mg SO ₄ , 7H ₂ O	0,2 g
- Mn SO ₄ , H ₂ O	0,05 g
- eau distillée qsp	1000 mL

pH ajusté à 5.

DOCUMENT III



Evolution de la biomasse produite (matière sèche, absorbance à 600 nm) en fonction de la concentration initiale en glucose dans les milieux de culture.

DOCUMENT IV

Effet de la concentration en extrait de levure présent dans le milieu de culture sur la croissance de la souche *L.œnos*.

Extrait de levure g/L	0	1	5	10
$(X_{\max} - X_0)$ U.A. 600 nm	0,12	0,29	1,05	1,10
μ_{\max} h ⁻¹ (taux de croissance)	ND	ND	0,062	0,111
glucose consommé g/L	1,34	2,77	9,47	9,38

X_0 = absorbance temps 0

X_{\max} = absorbance en phase stationnaire

U.A. = unités d'absorbance

ND = non déterminé

DOCUMENT V

Acide L-malique



chimie
alimentaire

METHODE UV

Pour la détermination de l'acide L-malique dans les aliments

Réf. 139 068

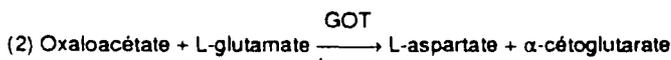
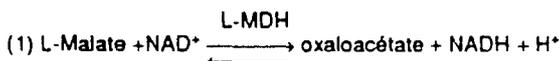
Test-Combinaison pour environ 25 déterminations.

Principe (1, 2)

En présence de nicotinamide-adenine-dinucléotide (NAD), l'acide L-malique (L-malate) est oxydé en oxaloacétate par la L-malate-déshydrogénase (L-MDH) (1).

L'équilibre de la réaction est situé du côté du malate. En éliminant l'oxaloacétate du milieu réactionnel, on oriente la réaction (1) dans le sens \rightarrow oxaloacétate.

En présence de L-glutamate, l'oxaloacétate est transformé en L-aspartate (2) par la glutamate-oxaloacétate-transaminase (GOT).



La formation de NADH, mesurée par l'augmentation de l'absorbance à la longueur d'onde de 334, 340 ou 365 nm, est proportionnelle à la quantité de L-malate présent.

Composition du coffret

1. Flacon 1 contenant env. 30 ml de solution composée de
Tampon glycyglycine — pH 10,0
Acide L-glutamique — 440 mg
Stabilisateurs.
2. Flacon 2 contenant env. 210 mg de lyophilisat- β -NAD.
3. Flacons 3 contenant 0,4 ml de glutamate-oxaloacétate-transaminase — 160 U.
4. Flacons 4 contenant 0,4 ml de L-malate-déshydrogénase — 2400 U.
5. Flacon standard solution aqueuse stabilisée d'acide L-malique.

Préparation des solutions

1. Utiliser les contenus des flacons 1, 3 et 4 sans le dilution.
2. Dissoudre le contenu du flacon 2 dans 6 ml d'eau bidistillée.
3. Le standard s'utilise tel quel.

Stabilité des solutions

Le contenu des flacons 1, 3 et 4 se conserve au moins un an à + 4 °C. La solution 2 se conserve au moins 3 semaines à + 4 °C ou 2 mois à - 20 °C¹. Le standard est stable jusqu'à la date indiquée sur le flacon.

Mode opératoire

Longueur² : 340 nm, 334 nm (Hg) ou 365 nm (Hg)

Cuve de verre³ : 1 cm d'épaisseur.

Température : 20 à 25 °C

Volume du test : 2,22 ml

Mesurer contre l'air (pas de cuve dans le trajet optique) contre l'eau ou contre le témoin⁴.

Introduire dans les cuves	Témoin	Essai
Solution 1	1,0 ml	1,0 ml
Solution 2	0,2 ml	0,2 ml
Eau bidistillée	1,0 ml	0,9 ml
Suspension 3	0,01 ml	0,01 ml
Essai*	-	0,1 ml
Mélanger**.		
Après env. 3 min., lire les absorbances des solutions (A ₁)		
Déclencher la réaction par addition de :		
Solution 4	0,01 ml	0,01 ml
Mélanger**.		
A la fin de la réaction (env. 5 à 10 min.), lire les absorbances des solutions (A ₂) immédiatement l'une après l'autre.		

* Rincer la pipette ou l'embout de pipette avec la solution échantillon avant le pipetage.

** Avec une spatule ou en agitant la cuve après l'avoir recouverte de parafilm® (marque déposée de American Can Company, Greenwich, Ct, USA).

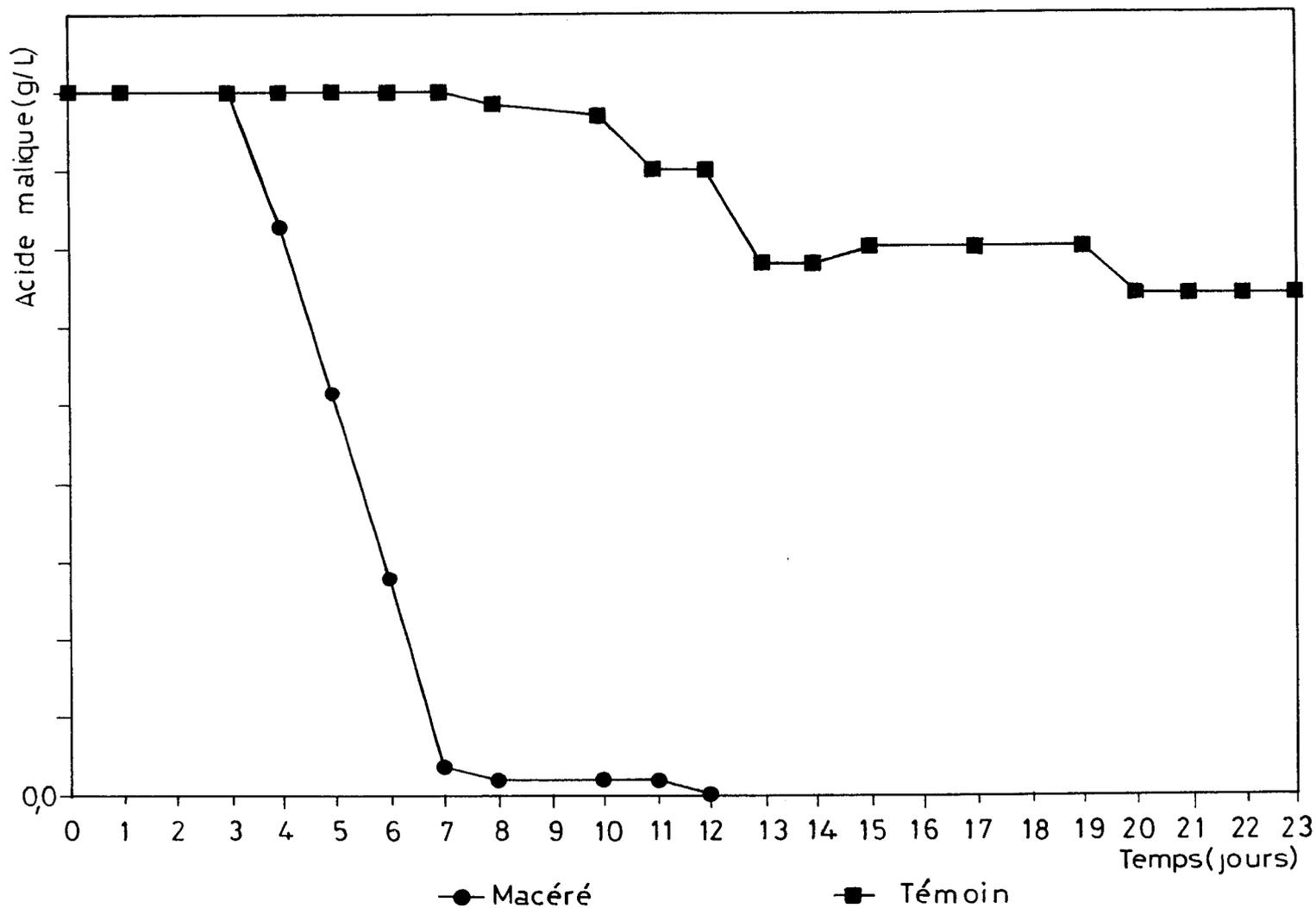
- 1) Si nécessaire utiliser du NAD Boehringer Cat. N° 127 981 : 35 mg NAD/ml d'eau bidistillée.
- 3) L'absorption maximale du NADH et NADPH est située à 340 nm. La mesure s'effectue à 340 nm avec un photomètre à spectre continu, et à 334 nm ou 365 nm avec un photomètre à spectre discontinu.
- 3) A la place des cuves de verre, on peut utiliser les cuves à usage unique du commerce.
- 4) Par exemple lors de l'utilisation d'un spectrophotomètre double faisceau.

Les différences d'absorbance mesurées doivent être d'au moins 0,1 pour obtenir des résultats précis, sinon diluer moins ou augmenter la prise d'essai.

Calcul

V	=	volume du test (ml)
v	=	volume de l'essai (ml)
M	=	poils moléculaire de la substance à doser
d	=	épaisseur de la cuve (cm)
ϵ	=	coefficient d'absorption du NADH :
		340 nm = 6,3 (l · mmol ⁻¹ · cm ⁻¹)
		Hg 334 nm = 6,18 (l · mmol ⁻¹ · cm ⁻¹)
		Hg 365 nm = 3,4 (l · mmol ⁻¹ · cm ⁻¹)

DOCUMENT VI



Effet de la macération pelliculaire sur la fermentation malolactique
(dosage de l'acide malique en fonction du temps)

Colonnes capillaires

Les colonnes capillaires sont disponibles dans deux types de tubes.

- Silice fondue
- Acier inoxydable,

La **silice fondue** est une matière très inerte qui contient moins de 1 ppm au total d'oxydes métalliques. Les colonnes de silice fondue sont intrinsèquement droites et sont extrêmement flexibles. Elles sont donc très faciles à installer.

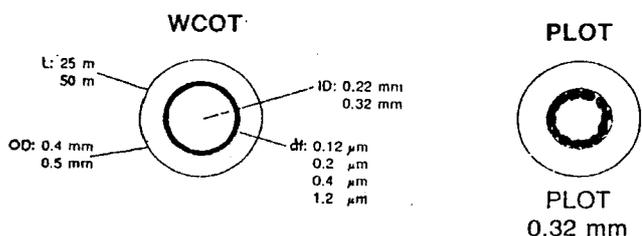
Les colonnes d'**acier inoxydable** sont flexibles et incassables, mais elles ne sont pas aussi inertes que celles de silice fondue ou de verre.

Quelques définitions

Presque tous les types de colonnes figurant dans ce catalogue sont des colonnes tubulaires ouvertes à la paroi imprégnée (WCOT). La paroi interne du tube est imprégnée de la phase liquide sous la forme d'un film très fin. On obtient ainsi des tubes ouverts ayant une perméabilité très élevée. On peut par conséquent réaliser de grandes longueurs, ce qui donne le pouvoir de résolution très haut.

Nous avons mis au point spécialement une colonne tubulaire ouverte à couche poreuse (PLOT) pour l'analyse des hydrocarbures légers en C₁ à C₁₀. La paroi interne de la colonne est revêtue d'une fine couche d'Al₂O₃.

Une autre colonne PLOT, revêtue de tamis moléculaire 5Å est disponible pour la séparation des gaz permanents.



Phases CP

Indice CP

L'indice CP a une valeur se situant entre 0 pour les phases stationnaires non polaires et 100 pour la phase stationnaire la plus polaire actuellement connue.

Un certain nombre des phases CP recommandées sont disponibles, elles ont été spécialement créées ou choisies pour la chromatographie en phase gazeuse.

Les critères les plus importants sont:

- Stabilité thermique
- Pureté
- Polarité constante d'un lot à l'autre
- Phases strictement contrôlées

CP-Sil 5

- Polydiméthyl siloxane de haute pureté
- Utilisée en remplacement de SE-30; OV-1; OV-101; SP-2100 et SF-96
- Température minima -25°C
- Température maxima:
 - 325°C en isotherme
 - 350°C en programmation de température
- Efficacité d'imprégnation minima garantie 80%
- Également disponible sous forme de phase greffée chimiquement (CB)

CP-Sil 8

- 5% phényl, 95% méthyl polysiloxane
- Utilisé en remplacement de SE-52; SE-54; OV-73
- Température minima -25°C
- Température maxima:
 - 325°C en isotherme
 - 350°C en programmation de température
- Efficacité d'imprégnation minima garantie 80%
- Également disponible sous forme de phase greffée chimiquement (CB)

CP-Sil 8 CB

- 5% phényl, 95% méthyl polysiloxane, greffé chimiquement CP-Sil 8
- Utilisé en remplacement de Durabond-5, Ultra #2, BP-5, SPB-5
- Température minima -25°C
- Température maxima:
 - 300°C en isotherme
 - 325°C en programmation de température
- Efficacité d'imprégnation minima garantie 80%

CP-Wax 51

- Polyéthylène glycol, d'une masse moléculaire de 40,000
- Identique au Carbowax 20 M, mais plus stable
- Température minima 60°C
- Température maxima:
 - 225°C en isotherme
 - 250°C en programmation de température
- Efficacité d'imprégnation minima garantie 60%

CP-Wax 52 CB

- Polyéthylène glycol, greffé chimiquement CP-Wax 51
- Utilisé en remplacement de Durabond-wax, Supelcowax-10, BP-20
- Température maxima:
 - 250°C en isotherme
 - 275°C en programmation de température
- Efficacité d'imprégnation minima garantie 80%
- Disponible uniquement sous forme de phase greffée chimiquement (CB)

CP-Sil 88

- 100% cyanopropylpolysiloxane
- Utilisé en remplacement de Silar 10 C et du SP 2340
- Température minima +55°C
- Température maxima:
 - 225°C en isotherme
 - 240°C en programmation de température
- Efficacité d'imprégnation minima garantie 60%

Concours
ou
Examen

Section
ou Spécialité :
ou Option (éventuellement)

NOM :
(en majuscules)

Prénoms :

Académie d'inscription : N° d'inscription :

Nature ou repère de l'épreuve :

Repère : GBT5
Page : 13/15

SESSION 1997
A COMPLETER ET A RENDRE AVEC LA COPIE

Durée : 4 H
Coefficient : 4

DOCUMENT VIIIA : RESULTATS DE L'ETALONNAGE

NOM	CODE	T.R.R.	FACTEUR = F
A. CAPROIQUE	METC6	0,6990 ± 0,0005	1,0609
A. HEPTANOIQUE	METC7	1	1
A. CAPRYLIQUE	METC8	1,4129 ± 0,0009	0,9224
A. CAPRIQUE	METC10	2,4428 ± 0,0036	0,8916
A. LAURIQUE	METC12	3,5249 ± 0,0063	0,8566
A. MYRISTIQUE	METC14	0,7237 ± 0,0001	0,9632
A. PENTADÉCANOIQUE	METC15	0,8013 ± 0,0002	1,0037
A. PALMITIQUE	METC16	0,8872 ± 0,0001	0,9677
A. PALMITOLEIQUE	METC16 : 1	0,9089 ± 0,0001	0,9650
A. HEPTADÉCANOIQUE	METC17	1	1
A. STÉARIQUE	METC18	1,1578 ± 0,0002	0,9556
A. OLEIQUE	METC18 : 1	1,1833 ± 0,0004	0,9656
A. LINOLEIQUE	METC18 : 2	1,2698 ± 0,0005	1,0095

ki : coefficient de réponse spécifique de la substance inconnue

kis : coefficient de réponse spécifique de l'étalon interne

F = $\frac{ki}{kis}$

T.R. substance X

T.R.R. = $\frac{Ae}{Ae \text{ UAS} \times X}$

T.R. substance servant d'étalon interne

DOCUMENT VIIIB : RESULTATS DU DOSAGE

NOM	MILIEU DE CULTURE AVANT MACERATION		MILIEU DE CULTURE APRES MACERATION	
	Ae UAS	Ai UAS	Ci mg.L ⁻¹	Ai UAS
Ac. caproïque		93677		173488
Ac. heptanoïque *	610340			
Ac. caprylique		69754	635582	65691
Ac. caprique		101730		67310
Ac. laurique		161575		52328
Ac. myristique		45358		50390
Ac. pentadécanoïque		38431		39211
Ac. palmitique		164002		229607
Ac. palmitoléique		12844		12600
Ac. heptadécanoïque *	483422		490500	
Ac. stéarique		92899		147280
Ac. oléique		57345		58523
Ac. linoléique		21340		26760

Ae = Aire du pic étalon interne en unités arbitraires de surface (UAS)

Ai = Aire du pic acide gras à doser en unités arbitraires de surface (UAS)

Ci = concentration en acide gras en mg.L⁻¹

* concentration des étalons internes :

- acide heptanoïque = 94,3 mg.L⁻¹

- acide heptadécanoïque = 101,2 mg.L⁻¹

DOCUMENT IX

Numération des Brettanomyces. Mode opératoire.

Réactifs :

S₀ tampon PBS

S₁ sonicat de suspension de Brettanomyces à N = 34.10⁰ cellules par mL

S₂ sonicat de suspension de Brettanomyces à N = 34.10¹ cellules par mL

S₃ sonicat de suspension de Brettanomyces à N = 34.10² cellules par mL

S₄ sonicat de suspension de Brettanomyces à N = 34.10⁴ cellules par mL

S₅ sonicat de suspension de Brettanomyces à N = 34.10⁶ cellules par mL

- Sérumalbumine bovine.
- Anticorps monoclonal anti-Brettanomyces obtenu par culture d'hybridomes de souris.
- Solution de lavage.
- Conjugué : anticorps de mouton anti-souris couplé à la peroxydase du raifort.
- Substrat tampon PBS.
- Chromogène.
- Solution d'acide sulfurique.
- Plaque de microtitration vierge.
- Vins à tester V1 et V2 soniqués.

Mode opératoire.

1. Distribution des étalons et des vins à doser :

- | | |
|------------------------------------|---------------------------------|
| - déposer 100 µL de S ₀ | dans les puits A1, A2 et B1, B2 |
| - " S ₁ | " A3, A4 et B3, B4 |
| - " S ₂ | " A5, A6 et B5, B6 |
| - " S ₃ | " A7, A8 et B7, B8 |
| - " S ₄ | " A9, A10 et B9, B10 |
| - " S ₅ | " A11, A12 et B11, B12 |
| - " de vin V1 | " C1, C2 et D1, D2 |
| - " de vin V2 | " C3, C4 et D3, D4 |

Laisser la sensibilisation se dérouler pendant 4 heures à température ambiante.

2. Déposer 100 µL de sérumalbumine bovine dans tous les puits.

3. Déposer 50 µL d'anticorps monoclonal à 0,5 µg.mL⁻¹ dans les puits des lignes A et C et 50 µL de tampon PBS dans les puits des lignes B et D. Laisser incuber 10 heures.

4. Lavage : laver chaque puits avec 300 µL de solution de lavage (4 fois).

5. Déposer 100 µL de conjugué. Laisser incuber 4 heures.

6. Lavage.

7. Réaction enzymatique : déposer 50 µL de substrat puis 50 µL de chromogène dans chaque puits. Laisser incuber 20 minutes à température ambiante puis ajouter 50 µL d'H₂SO₄.

8. Lecture : lire l'absorbance dans chaque puits à 414 nm.

DOCUMENT X

Résultats

ABS \ Etalons	S ₀	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅
ABS A	0,092	0,309	0,539	0,742	1,080	1,450
ABS B	0,090	0,089	0,089	0,092	0,090	0,100

ABS \ Vins	V ₁	V ₂
ABS C	0,310	0,890
ABS D	0,090	0,090

ABS A : absorbance moyenne lue dans les puits A

ABS B : absorbance moyenne lue dans les puits B

ABS C : absorbance moyenne lue dans les puits C

ABS D : absorbance moyenne lue dans les puits D