

**BTS QUALITE DANS LES INDUSTRIES ALIMENTAIRES  
ET LES BIO-INDUSTRIES**

**Epreuve : Techniques d'analyses et de contrôles**

**Modifications sujet à donner oralement aux candidats le jour de l'épreuve**

- **Sujet codé QATAC A1 du Mardi 1<sup>er</sup> juin de 14h00 à 19h00 :**

Page 2/6 Question 3.1 : lire Réaliser les examens macroscopiques et microscopiques au lieu de Réaliser le(s) examen(s) microscopique(s)

Page 2/6 Question 3.2 Proposer sur l'annexe 1 une orientation de diagnostic

BTS QUALITÉ DANS LES INDUSTRIES  
ALIMENTAIRES ET LES BIO-INDUSTRIES

**E52 – Technique d'analyse et de contrôles**

MICROBIOLOGIE

Matière d'œuvre

Premier jour

Etuves à 37°C

Etuves à 30°C

Par candidat :

**1. Contrôle de la viabilité et dénombrement du levain avant inoculation du moût.**

- 5 mL de bouillon Sabouraud ou équivalent avec  $2,5 \text{ à } 3 \cdot 10^7$  levures.  $\text{mL}^{-1}$   
(Bouillon Sabouraud avec *Saccharomyces* cultivé pendant 24 heures à 30°C) noté  $P_x$  conservée au réfrigérateur.
- un tube contenant 9 mL d'eau physiologique stérile
- un tube à hémolyse stérile
- 3 pipettes graduées stériles de 1 mL ou équivalent
- un tube à hémolyse contenant 1 mL de bleu de méthylène tamponné de Funk :

Bleu de méthylène à 0,2% en solution aqueuse	100mL
Tampon phosphate 0,2 mole. $\text{L}^{-1}$ p H 7	100mL
- une cellule de Malassez + lamelle adaptée
- une pipette Pasteur stérile
- document : fiche technique de la cellule de Malassez
- un bac d'eau de javel en paillasse latérale

**2. Dénombrement des micro- organismes du moût en fermentation.**

- 5 mL de bouillon Sabouraud ou équivalent avec  $1,5 \cdot 10^6$  levures.  $\text{mL}^{-1}$   
(Bouillon Sabouraud avec *Saccharomyces* cultivé pendant 24 heures à 30°C puis dilué) notés  $M_x$ , conservée au réfrigérateur.
- 6 tubes contenant 9 mL d'eau physiologique stérile
- 6 pipettes graduées stériles de 1 mL + système d'aspiration ou système équivalent (selon disponibilité du centre)
- 6 géloses YGC ou OGA coulées et sèches  
Gélose YGC chez Sanofi Diagnostics Pasteur : 64 104
- Billes ou étaleur
- Système de prélèvement pour 9-10 mL

**3. Identification d'un contaminant isolé d'un moût en fermentation**

- Une gélose nutritive avec isolement notées  $C_x$  d'une souche d'entérobactérie ; 3 souches différentes seront distribuées dans un même laboratoire *Proteus*, *Klebsiella*, *E.coli*.
  - un tube à hémolyse stérile
  - un tube d'eau distillée stérile  $V = 5 \text{ mL}$
  - colorants de Gram, lames, papier filtre
  - pipettes Pasteur stériles
  - 1 disque d'oxydase
  - $\text{H}_2\text{O}_2$
- } A disposition au milieu de la paillasse ou 1 kit pour 2

A distribuer après avoir ramassé l'annexe 1 :

- une galerie API 20<sup>E</sup>
- une gélose nutritive en boîte de Petri
- un tube contenant 5 mL d'eau distillée stérile
- une gélose VF en surfusion
- un étalon de 0,5 de Mac Farland à disposition
- un mode opératoire pour ensemer la galerie API 20 E
- document fournisseur Api

### Deuxième jour :

- réactifs de lecture de la galerie API 20 E
- une fiche de lecture API 20 E
- un tableau API 20 E ou programme ordinateur ou catalogue.
- une notice de lecture de la galerie Api 20E.(document fournisseur)
- un document avec la formule AFNOR de calcul de la moyenne pondérée.

**BIOCHIMIE**  
Matière d'œuvre

**1. Réactifs et matériel par candidat.**

- **Solution étalon mère de fer à 0,100 g.L<sup>-1</sup>** **15 mL**  
Solution à 0,7022 g de sel de Mohr ( $M = 392,13 \text{ g.mol}^{-1}$ ) par litre.  
Ajouter 50 mL d'acide sulfurique concentré avant d'ajuster au litre avec eau distillée afin d'augmenter la stabilité de la solution.
- **Echantillon de bière dégazée étiqueté B** **50 mL**  
Bière blonde dégazée, type Heineken Prestige 920 mL + 80 mL de solution étalon mère de fer à 0,100 g.L<sup>-1</sup>. L'échantillon de bière ainsi préparé présentera une concentration en fer voisine de 8 mg de fer par L.
- **Echantillon de bière sans alcool dégazée étiqueté BS** **5 mL**  
Bière blonde sans alcool, type Tourtel.
- **Solutions témoins de glucides à 2 g.L<sup>-1</sup>** **2 mL de chaque solution répartie en tube à hémolyse**  
Glucose, maltose, saccharose, fructose, maltotriose.

- Fiole jaugée de 50 mL 1
- Pipettes jaugées de 5 mL 2
- Pipettes graduées de 5 mL au 1/100 2
- Portoir pour pipette 1
- Bêchers de 100 ou 150 mL 2
- Bêcher de 250 mL 1
- Tubes à essais 10
- Portoir pour tubes à essais 1
- Cuves pour spectrophotométrie 10
- Portoir pour cuve de spectrophotométrie 1
- Pissette d'eau distillée 1
- Papier filtre
- Papier Joseph
- Plaques chromatographiques (gel de silice sur support aluminisé) 100 x 100 mm 1
- Cuve chromatographique pour migration 1
- Capillaires 8
- Thermoventilateur 1 pour 2 candidats
- Compte-gouttes ou Pipettes molles 3
- Parafilm
- Dessicateur (pour chromatoplaque réactivée)

**2. Réactifs et matériel collectifs**

- **Solution d'hydroquinone à 2 g.L<sup>-1</sup> (T, R : 45-20/22, S : 53-24/25-39-45)** **15 mL par candidat**  
Dissoudre à chaud, 2 g d'hydroquinone dans 1 litre de tampon acétate de pH = 4,5 à 0,1 mol.L<sup>-1</sup>  
Soit 650 mL d'acide acétique à 0,1 mol.L<sup>-1</sup> + 350 mL d'acétate de sodium à 0,1 mol.L<sup>-1</sup>.  
**Placer le réactif nécessaire à l'ensemble de la salle, sous la hotte, en flacon distributeur réglé sur 1 mL.**
- **Réactif à l'orthophénanthroline à 5 g.L<sup>-1</sup> (S : 22-24/25)** **30 mL par candidat**  
Solution à 5 g de chlorhydrate d'orthophénanthroline par litre.  
**Placer le réactif nécessaire à l'ensemble de la salle, sous la hotte, en flacon distributeur réglé sur 2 mL.**

**- Solvant de chromatographie** **20 mL par candidat**

(F, C, Xi, R : 10-11-23/24/25-35-36-36-66-67, S : 7-9-16-26-36/37/39-45-66-67)

- Méthyléthylcétone: 3 vol ;
- Acide acétique: 1 vol ;
- Méthanol: 1 vol.

**- Révélateur : Mélange extemporané d'aniline et de diphénylamine en milieu acide phosphorique**

(C, F, T, R : 11-20/21/22-23/24/25-33-34-40-48-50/53, S : 7-16-26-28-36/37-45-60-61)

- Confection du révélateur :
- Solution A : - 0,5 mL d'aniline
    - 0,5 g de diphénylamine
    - 25 mL d'éthanol à 95 %
  - Solution B : - 5 mL d'acide phosphorique pur
    - 25 mL d'éthanol à 95 %

Mélanger extemporanément les solutions A et B. Mettre à disposition sous la hotte dans un récipient permettant l'immersion des chromatoplaques (boîte de pétri carrée, 120 mm \* 120 mm par exemple).

Prévoir un poste de révélation sous la hotte avec une « rampe » de séchage vertical des chromatoplaques ~~en carton~~. Une pince brucelle pour manipuler les chromatogrammes.

- |   |             |
|---|-------------|
| - Spectrophotomètres ( $\lambda = 490 \text{ nm}$ ) + Notices d'utilisation | 2 par salle |
| - Bidon de récupération des déchets liquides                                | 1           |
| - Etuve. Point de consigne + 120°C  | 1           |
| - Ballon de récupération spécifique pour les solvants                       | 1           |
| - Réfractomètres+ Notices d'utilisation                                     | 2 par salle |

**BTS QUALITÉ DANS LES INDUSTRIES ET  
LES BIO-INDUSTRIES**

**Session 2004**

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

**Durée : 6 heures**

**Coefficient : 3**

# BTS Qualité dans les industries alimentaires et les bio- industries

Session 2004

## U 52 : Techniques d'analyse et de contrôle

Durée : 6 heures

Coefficient : 3

Premier jour : 5 heures

### LA BIÈRE

La plupart des bières sont préparées à partir d'orge. Lors du maltage, les grains d'orge sont mis à germer, il y a synthèse d'enzymes. L'orge malté est ensuite brassé dans de l'eau à 67°C pendant plusieurs heures. Les enzymes synthétisées lors du maltage catalysent l'hydrolyse de l'amidon et de protéines. La partie aqueuse, appelée moût, est séparée des restes des grains et additionnée de houblon. Le moût est alors stérilisé puisensemencé avec une souche de *Saccharomyces*, qui effectue la fermentation alcoolique. Après fermentation puis maturation la bière est filtrée, pasteurisée et conditionnée.

### MICROBIOLOGIE (30 points)

#### 1. Contrôle de la viabilité et dénombrement du levain avant inoculation du moût

Pour la fermentation alcoolique, le volume d'inoculum de la préculture doit être compris entre 5 et 10% du volume total du moût et le nombre de levures viables doit être, en début de fermentation, de l'ordre de  $1,5 \cdot 10^6$  Cellules. mL<sup>-1</sup>.

Le contrôle de la viabilité et le dénombrement sont réalisés à partir d'une préculture P<sub>x</sub> de *Saccharomyces* en cellule de Malassez.

1.1 Effectuer la dilution 10<sup>-1</sup> de la préculture P<sub>x</sub>.

1.2 Dans un tube à hémolyse stérile, introduire 0,5 mL de la dilution précédente et 0,5 mL de bleu de méthylène tamponné de Funk.

Monter la préparation en cellule de Malassez.

Montrer à un examinateur cette mise en cellule.

1.3 Dénombrement du levain

Effectuer la numération : la numération d'un rectangle sera montrée à un examinateur.

Déterminer le pourcentage de viabilité ainsi que le nombre de levures viables par mL de préculture.

Expliciter le calcul et en déduire le volume de préculture à introduire pour 1 litre de moût.

#### Remarques :

Le bleu de méthylène tamponné de Funk colore en bleu foncé les cellules mortes. Les cellules vivantes sont peu ou pas colorées.

Un bourgeon est considéré comme une cellule si son diamètre est supérieur ou égal à la moitié du diamètre de la cellule dont il est issu.

Le pourcentage de viabilité de la préculture doit être supérieur ou égal à 80.

## 2. Dénombrement des micro-organismes du moût en fermentation

Un moût M a été inoculé avec la préculture précédente. Le nombre de cellules viables du moût attendu est de  $1,5 \cdot 10^6$  Cellules. mL<sup>-1</sup>.

- 2.1 - Vérifier la concentration des levures dans le moût M en réalisant une numération en surface sur gélose sélective YGC, ou gélose équivalente.
  - Tester trois dilutions successives. Effectuer deux essais par dilution.
  - Montrer la réalisation d'une dilution à un examinateur.
- 2.2 Justifier par écrit les dilutions testées. Préciser le temps et la température d'incubation choisis.

## 3. Identification d'un contaminant isolé d'un moût en fermentation

La souche de *Saccharomyces* utilisée étant généralement recyclée plusieurs fois, une contamination de la souche est possible.

Lors d'une précédente fermentation un contaminant bactérien C a été isolé.

Une colonie de ce contaminant a été ensemencée sur gélose nutritive notée "Cx"

- 3.1 Réaliser le (s) examen(s) microscopique(s).
  - Montrer un champ microscopique caractéristique à un examinateur.
- 3.2 Réaliser le ou les tests enzymatiques nécessaire(s) à l'orientation.
  - Proposer sur l'annexe une orientation de diagnostic.
  - Cette annexe est à rendre 30 minutes avant la fin l'épreuve.
- 3.3 Poursuivre l'identification jusqu'au stade de l'espèce en ensemencant les milieux et la galerie distribués.
  - Cette distribution se fera après la remise de l'annexe.

## BIOCHIMIE (30 points)

Les analyses biochimiques qualitatives et quantitatives de plusieurs constituants de la bière permettent d'apprécier sa qualité.

### 1. Dosage du fer dans la bière

Lorsque la bière présente une mousse grisâtre et une mauvaise stabilité colloïdale, on suspecte une pollution par le fer au cours de la fabrication. La bière ne doit pas contenir plus de 0,1 mg de fer par litre.

Le dosage du fer (II) est réalisé par la méthode colorimétrique à l'orthophénanthroline.

#### 1.1 Réactifs.

- Solution étalon mère de fer à  $0,100 \text{ g.L}^{-1}$  ;
- Echantillon de bière dégazée étiqueté B ;
- Solution d'hydroquinone (T, R : 45-20/22, S : 53-24/25-39-45);
- Réactif à l'orthophénanthroline (S : 22-24/25).

#### 1.2 Réalisation de la gamme d'étalonnage et des dosages.

##### 1.2.1. Gamme d'étalonnage

A partir de la solution étalon mère de fer à  $0,100 \text{ g.L}^{-1}$ , préparer par dilution une solution étalon fille de fer à  $10,0 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Avec cette solution fille, réaliser une gamme d'étalonnage contenant de 0 à 50  $\mu\text{g}$  de fer par tube.

##### 1.2.2. Dosages sur la bière dégazée (2 essais)

Les essais seront réalisés sur des prises d'essais de 5 mL de la bière B. Pour éliminer l'absorbance due à la couleur de la bière, il est nécessaire de réaliser, dans les mêmes conditions, le « témoin bière ».

##### 1.2.3. Mode opératoire de la colorimétrie

Dans chaque tube, introduire :

- X mL de la solution contenant le fer ;
  - Eau distillée qsp 5 mL ;
  - 1 mL de solution d'hydroquinone. Agiter et laisser reposer 10 minutes ;
  - 2 mL de réactif à l'orthophénanthroline. Agiter et laisser reposer 20 minutes.
- Lire toutes les absorbances à 490 nm contre le témoin réactif de la gamme.

#### 1.3 Compte rendu et résultats

##### 1.3.1 Expliquer la préparation de la solution fille

##### 1.3.2 Rassembler dans un tableau les indications relatives à la préparation des tubes de gamme, des essais et de leurs témoins.

##### 1.3.3 Compléter la feuille de relevé des valeurs expérimentales (annexe 2).

##### 1.3.4 Exploitation des résultats.

Donner l'équation de la droite de régression et le coefficient de corrélation.

##### 1.3.5 Déterminer la concentration massique en fer dans la bière B analysée, en $\text{mg.L}^{-1}$ . Conclure sachant que le CV de la méthode est de 3 %.

## 2. Identification des glucides et estimation de la teneur en glucides dans la bière.

La bière « sans alcool » est une bière dans laquelle le processus de fermentation est réalisé par des levures issues du génie génétique et produisant peu d'alcool. La nature des glucides et la teneur en glucides de ces bières sont donc différentes des bières traditionnelles. L'analyse comparative des glucides de ces deux types de bière sera réalisée par chromatographie sur couche mince. L'estimation de la quantité de glucides dans les deux types de bière sera réalisée par réfractométrie.

### 2.1. Matériel et réactifs

- Plaque recouverte d'une couche mince de gel de silice (10 cm x 10 cm)
- Cuve à chromatographie
- Solvant de chromatographie :  
(F, C, Xi, R : 10-11-23/24/25-35-36-36-66-67, S : 7-9-16-26-36/37/39-45-66-67)
  - Méthyléthylcétone : 3 vol ;
  - Acide acétique : 1 vol ;
  - Méthanol : 1 vol.
- Solutions témoins de glucides à 2 g.L<sup>-1</sup> : glucose, maltose, saccharose, fructose, maltotriose.
- Révélateur : mélange extemporané d'aniline et de diphénylamine en milieu éthanol et acide phosphorique fourni prêt à l'emploi  
(C, F, T, R : 11-20/21/22-23/24/25-33-34-40-48-50/53, S : 7-16-26-28-36/37-45-60-61)
- Réfractomètre
- Échantillons de bières à analyser préalablement dégazées : « traditionnelle » étiquetée B et « sans alcool » étiquetée BS

### 2.2. Mode opératoire pour l'identification des glucides

Introduire le solvant dans la cuve et la laisser se saturer en vapeurs de solvant pendant 15 minutes (manipuler sous hotte).

Réactiver la chromatoplaque par passage à l'étuve à 120°C pendant 5 minutes.

A l'aide de capillaires ou de cônes, réaliser 1 dépôt de chaque solution, en séchant.

Placer la plaque dans la cuve.

A l'issue de la migration noter le front de solvant. Puis, sécher rapidement la plaque.

Révéler à l'aide du matériel à disposition.

Mettre à l'étuve à 120°C (3 minutes).

### 2.3 Mode opératoire pour l'estimation de la teneur en glucides

Après avoir vérifié le zéro de l'appareil avec de l'eau distillée, réaliser la détermination rapide de la teneur en glucides (Brix) de la bière « traditionnelle », notée B et de la bière « sans alcool », notée BS (1 essai par bière). Montrer les mesures à l'examineur.

La notice de l'appareil est à disposition à côté du réfractomètre.

### 2.4. Compte rendu et résultats

2.4.1. Compléter la feuille de relevé des valeurs expérimentales sur l'annexe 2.

2.4.2. Analyser le chromatogramme obtenu et compléter l'annexe 2.

2.4.3. Comparer la composition en glucides des deux bières analysées. Conclure.

***Le chromatogramme sera laissé au poste de travail.***

2.4.4. Comparer les teneurs en glucides des deux bières analysées. Conclure.

Nom et Prénom du candidat :

N° de poste :

## BTS Qualité dans les industries alimentaires et les bio- industries

Session 2004

U 52 : Techniques d'analyse et de contrôle

### **Annexe 1**

**A compléter et à rendre avec la copie**

Numéro de la souche :

- Observation macroscopique :

- Observation microscopique :

- Résultat du ou des test (s) :

- Orientation proposée :

# BTS Qualité dans les industries alimentaires et les bio- industries

Session 2004

U 52 : Techniques d'analyse et de contrôle

## Biochimie

### Annexe 2

**A compléter et à rendre avec la copie**

#### 1. Dosage de fer dans la bière

	Etalons	Témoins	Essais
N° des tubes			
Masse de fer par tube en $\mu\text{g}$			
Absorbance ( $\lambda = 490 \text{ nm}$ )			

#### 2. Identification des glucides et estimation de la teneur en glucides dans la bière

##### 2.1. Identification des glucides de la bière

	Glucose	Maltose	Saccharose	Fructose	Maltotriose	B	BS
Rf							
Couleur des spots							

##### 2.2. Estimation de la teneur en glucides dans la bière

	B	BS
Brix		

# BTS Qualité dans les industries alimentaires et les bio- industries

Session 2004

U 52 : Techniques d'analyse et de contrôle

Durée : 6 heures

Coefficient : 3

Deuxième jour : 1 heure

## LA BIÈRE

### MICROBIOLOGIE

#### **1. Dénombrement des micro- organismes du moût en fermentation.**

Déterminer le nombre de micro-organismes par mL de moût. Exprimer le résultat en se référant aux données de l'annexe 1.

Discuter le résultat obtenu.

#### **2. Identification d'un contaminant isolé d'un moût en fermentation**

Procéder à l'identification du contaminant.

\* Rappel : le nombre de levures viables, en début de fermentation, doit être de l'ordre de  $1,5 \cdot 10^6$  cellules.mL<sup>-1</sup>

**ANNEXE 1**  
**EXTRAIT DE LA NORME NF ISO 7218/A1 DE DÉCEMBRE 2001**

**Mode de calcul : Cas général (comptage des colonies en totalité ou des colonies caractéristiques).**

Pour qu'un résultat soit valable, on estime en général qu'il est nécessaire de compter les colonies sur au moins 1 boîte contenant au minimum 15 colonies [colonies en totalité, colonies caractéristiques ou colonies répondant aux critères d'identification ou de confirmation (9.3.5.3)].

Calculer le nombre N de microorganismes présents dans l'échantillon pour essai, en tant que moyenne pondérée à partir de deux dilutions successives, à l'aide de l'équation suivante :

$$N = \frac{\sum C}{V \times [n_1 + (0,1 \times n_2)] \times d}$$

où

$\sum C$  est la somme des colonies comptées sur toutes les boîtes retenues de deux dilutions successives dont au moins une contient au minimum 15 colonies ;

V est le volume de l'inoculum appliqué à chaque boîte, en millilitres ;

$n_1$  est le nombre des boîtes retenues à la première dilution ;

$n_2$  est le nombre des boîtes retenues à la deuxième dilution ;

d est le taux de dilution correspondant à la première dilution retenue [d = 1 dans le cas où l'échantillon pour essai (produits liquides) ensemencé directement est retenu].

Arrondir le résultat calculé à deux chiffres significatifs. Pour cela, si le troisième chiffre est inférieur à 5 le chiffre précédent n'est pas modifié ; si le troisième chiffre est supérieur ou égal à 5 le chiffre précédent est augmenté d'une unité.

Retenir comme résultat un nombre compris de préférence entre 1,0 et 9,9 multiplié par la puissance appropriée de 10, ou un nombre entier avec 2 chiffres significatifs.

Exprimer le résultat comme suite :

- nombre N de microorganismes par millilitre (produits liquides) ou par gramme (autres produits).

**Cas de deux boîtes (échantillon pour essai ou suspension mère ou première dilution) contenant moins de 15 colonies.**

Si les deux boîtes, au niveau de l'échantillon pour essai (produits liquides) ou de la suspension mère (autres produits) ou de la première dilution ensemencée ou retenue, contiennent moins de 15 colonies (colonies en totalité, colonies caractéristiques ou colonies répondant aux critères d'identification ou de confirmation), calculer le nombre estimé  $N_E$  de microorganismes présents dans l'échantillon pour essai en tant que moyenne arithmétique des colonies comptées sur les deux boîtes à l'aide de l'équation suivante :

$$N_E = \frac{\sum C}{V \times n \times d}$$

où

$\sum C$  est la somme des colonies comptées sur les 2 boîtes ;

V est le volume de l'inoculum appliqué à chaque boîte, en millilitres.

n : le nombre de boîtes retenues.

d : le taux de dilution correspondant à la première dilution retenue.

Code : QATAC 42

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

## MATIERE D'ŒUVRE BIOCHIMIE

### REACTIFS : DOSAGE DES NITRITES

- **SOLUTION ETALON = Solution de nitrite à 2 mg/L** **30 mL/él**

Peser exactement 300 mg de nitrite de sodium.  
Compléter à 1 litre.  
Ajouter 1 mL de chloroforme.  
Agiter énergétiquement le chloroforme avec la solution.  
Diluer 100 fois la solution avec de l'eau distillée.

**FILTRAT DE JAMBON = filtrat Jn** **15 mL/él**

Peser 0,3000 g de  $\text{NaNO}_2$  qsp 100 mL  
Diluer au 1/2000  
Soit  $C_x = 3 * 46 * 1000 / 69 * 2000 = 1 \text{ mg /L de NO}_2$

**On peut aussi diluer la solution étalon au 1/2**

- **Réactif phénol-sulfanilique :** **15 mL/él**

Acide chlorhydrique ( $d=1,19$ )	130 mL
Acide sulfanilique	2,5 g
Phénol cristallisé	3,75 g
Chlorure d'ammonium	62,5 g
Eau distillée	312,5 mL

Dissoudre par agitation, en s'aidant d'un B.M.,  
l'acide sulfanilique et le phénol dans l'eau et l'acide chlorhydrique.  
Ajouter le chlorure d'ammonium.  
Après dissolution et refroidissement compléter à 500 mL. flacon pipettor

- **Ammoniaque  $d = 0,925$  sous une hotte en flacon dispenseur réglé sur 1 mL** **15 mL/él**  
en flacon pipettor

### REACTIFS : DOSAGE DE L'ACIDE ASCORBIQUE

- **Solution de 2,6 dichlorophénol-indophénol à 0,5 g/L** **100 mL/él**  
**noter DCPIP en flacon brun**

Dissoudre par petites fractions 1g de 2,6 DCPIP dans l'eau distillée chaude  
Compléter à 2 L puis filtrer.  
A conserver en flacon brun . A étalonner au moment de l'emploi

- **Solution étalon de vitamine C = solution d'ac. ascorbique à 0,5 g/L** **15 mL/él**  
dans l'acide métaphosphorique à 20 g/L

- filtrat de jambon noté « Jac »
- solution d'ac.ascorbique à 1 g/L dans l'acide métaphosphorique

15 mL/él

**solution d'acide métaphosphorique**  
**noter ac. métaphosphorique**  
**(en prévoir pour la préparation des solutions « Jac » et étalon)**

100 mL/él

- Broyer au mortier l'acide métaphosphorique vitreux et en peser 40 g.
- Les laver rapidement en les recouvrant d'eau distillée et en agitant.
- Rejeter cette eau de lavage.
- Dissoudre l'acide ainsi lavé dans de l'eau distillée en agitant.
- Compléter à 200 mL et conserver au réfrigérateur 8 jours maximum.

Diluer cette solution au 1/10 juste avant l'emploi pour obtenir une solution à 20 g/L

### **MATERIEL PAR ELEVE**

#### **Dosage des nitrites**

Pipettes jaugées de 2,5 mL  
2 Pipettes graduées de 5, 10 mL  
8 tubes à essais  
8 macrocuves  
pissette d'eau distillée  
propipettes  
lunettes  
papier filtre  
papier joseph  
parafilm  
3 petits béciers ou pots de yaourt / poubelle ou récipient secondaire

#### **Dosage de l'ac. ascorbique**

1 pipette jaugée de 25 mL  
Une burette de 25 mL  
2 Pipettes jaugées de 5 mL  
Eprouvette de 25 mL ou 50 ou 100 mL  
Fiole de 50 mL  
4 erlens de 250 mL  
1 bécier de 250 mL (chauffage de l'eau)

1 spectro /8 élèves

1 agitateur / 2 él (éventuellement)

Bidons déchets toxique, acides, bases

## MATIERE D'OEUVRE : IMMUNOLOGIE

### Produits

- |  |   |                                  |
|--|---|----------------------------------|
| - Agarose à 1% en tampon PBS supplémentaires en surfusion au bain-marie. | 10 mL/élève (présentés en 2 tubes de 5 mL)+ 2 tubes supplémentaires |                                  |
| - 1 tube d'eau physiologique   | 10 mL/élève   |                                  |
| - Sérum humain   | 30 ou 50 µL/élève minimum   | tubes notés : E.                 |
| - Sérum humain   | 30 µL/élève   | tubes notés : extrait de porc.   |
| - H <sub>2</sub> O   | 30 µL/élève   | tubes notés : extrait de poulet. |
| - H <sub>2</sub> O   | 30 µL/élève   | tubes notés : extrait de dinde.  |
| <br>   |   |                                  |
| - Sérum anti-humain  | 30 µL /élève  | tubes notés : anti-porc.         |
| - Sérum anti-humain  | 30 µL/élève   | tubes notés : anti-poulet.       |
| - H <sub>2</sub> O   | 30 µL/élève   | tubes notés : anti-dinde.        |
| - H <sub>2</sub> O   | 30 µL/élève   | tubes notés : anti-bœuf.         |

**Remarque :** *Ajouter un colorant aux tubes contenant H<sub>2</sub>O pour « mimer » un extrait ou un sérum*

### Matériel par élève

- 2 petites boîtes de Pétri (diamètre 5 cm).
- 1 Emporte-pièce (cloche de Durham ou pipette 10 mL) ( $\varnothing$  inférieur à 6 mm, 4 ou 5 serait mieux).
- 1 Pipette automatique (5-50 ou 10-100) + cônes jaunes.
- Gants.

### Matériel commun

- 1 ou 2 boîtes à gâteaux (chambre humide).
- 1 sac à autoclave.
- bain thermostaté à 56°C
- table à niveau

**1er Jour :**

**Dénombrement de la flore aérobie mésophile :**

Étuve à 30°C

Par élève :

Sac contenant le broyat de jambon cuit note "Bx"

Préparation du broyat :

90mL de tryptone –sel contaminé avec une suspension d'*E.coli*(contamination finale  $10^4$ /mL)

10g de jambon cuit

fermer hermétiquement

broyer au Stomacher

(donner le sachet ou pour plus de facilité, donner le broyat en flacon stérile ou erlen)

Tubes de 16 mL de PCA en surfusion : 6

Tubes de 4 mL de PCA en surfusion : 6

Pipettes pailles ou pipettes à usage unique de 1 mL : 8

Boîte de Pétri vides stériles : 6

Tubes de diluant de 9 mL stérile tryptone-sel : 4

Agitateur mécanique

NB

1-il est prudent de faire un test avec le jambon seul au préalable, afin de modifier la contamination du tryptone-sel si nécessaire

2-en cas d'échec du test , remplacer le tryptone sel par du diluant neutralisant

**Recherche et identification de germes responsables de surissement**

Par élève :

Tube de liquide exudat noté "Lx" : 0.5mL de bouillon cœur-cerveau ~~glycérolé au 2/3~~ avec un mélange *Lactobacillus/Pseudomonas* non pigmenté : proportions en fonction des tests préliminaires suivant les souches à disposition, de façon à obtenir le bacille Gram-prédominant ( à titre indicatif : 3/4-1/4)

Matériel courant de laboratoire

Réactifs Gram

1géluse TS présentée en boîte de Petri sèche

1géluse MRS présentée en boîte de Petri sèche

1 souche notée "S<sub>x</sub>" *Pseudomonas* non pigmenté présentée sur gélose nutritive inclinée

Réactif oxydase extemporané } A disposition au milieu de la pailleasse  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> }

1tube d'eau physiologique stérile de 2 mL

1galerie Api20NE + accessoires

1 notice d'ensemencement de la galerie Api 20 NE

1Vf régénéré en surfusion à 51°C

1 boîte GTS

Fiche technique du milieu MRS fournisseur.

**2<sup>ème</sup> Jour :**

Réactifs de lecture de la galerie + document formule de la norme  $\frac{\sum C}{v(n_1+0,1n_2)}$

Notice de lecture

Fiche Api 20NE

Outil d'identification : logiciel, index....

Fonds noirs

Réactifs Gram

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Réactif oxydase } A disposition au milieu de la pailleasse

**BTS QUALITÉ DANS LES INDUSTRIES ALIMENTAIRES ET  
LES BIO-INDUSTRIES**

**Session 2004**

**E5 – TECHNIQUES D'ANALYSES ET DE PRODUCTIONS**

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

**Durée : 6 heures**

**Coefficient : 3**

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

Session 2004

## E5 – TECHNIQUES D'ANALYSES ET DE PRODUCTIONS

### U52 – TECHNIQUES D'ANALYSES ET DE CONTROLES

Durée : 6 heures

Coefficient : 3

#### CONTRÔLE DE LA QUALITE DES PRODUITS DE CHARCUTERIE

**L'élaboration des produits de charcuterie fait intervenir des viandes d'origine diverse, des additifs comme les nitrates et les nitrites, de l'acide ascorbique....**

Des contrôles biochimiques, immunologiques et microbiologiques permettent de vérifier le respect des bonnes pratiques de fabrication d'un jambon.

#### PREMIER JOUR : 4 h 30

##### 1. CONTRÔLES BIOCHIMIQUES (20 POINTS)

Les nitrites sont introduits dans les produits de charcuterie, sous forme de sels nitrités (E250) en association avec la salaison. L'emploi de l'acide ascorbique (E 300) ainsi que des sels alcalins de cet acide (E301 et E 302) sont admis comme adjuvant de salaison.

Les normes européennes pour la charcuterie stipulent :

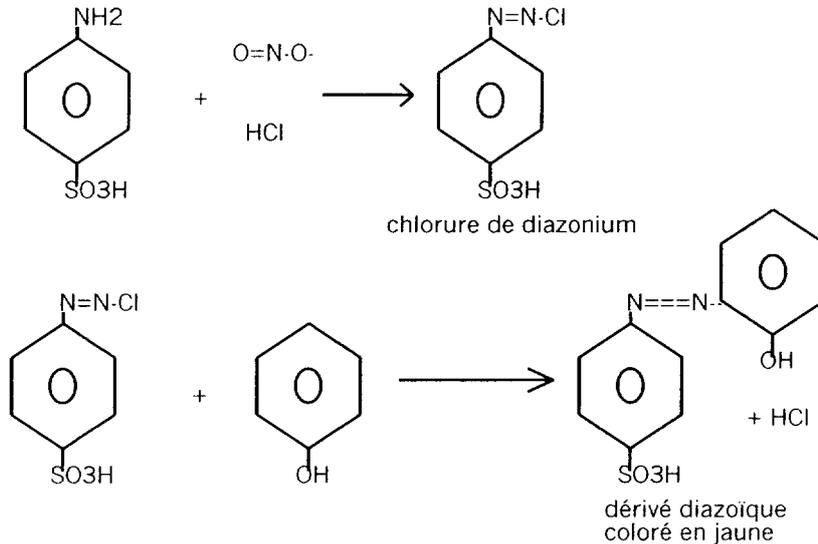
- taux de nitrites < 150 mg de nitrite de sodium par kg de jambon
- acide ascorbique < 300 mg/kg de jambon

##### 1.1. Dosage des nitrites

L'extraction des ions nitrites du jambon a été réalisée selon le protocole suivant :

- peser exactement 25 g de jambon haché dans un ballon de 100 mL ;
- ajouter 5 mL d'une solution de borax saturée, 50 mL d'eau distillée ;
- chauffer au bain-marie bouillant, à reflux, sous agitation 15 minutes ;
- laisser refroidir ;
- transvaser le contenu du ballon dans une fiole jaugée de 200 mL ;
- défécation : ajouter 2 mL de solution d'hexacyanoferrate de potassium et 2 mL d'éthanoate de zinc puis 50 mL d'eau distillée ;
- agiter fortement ;
- laisser reposer 30 minutes ;
- compléter au trait de jauge avec de l'eau distillée ;
- filtrer, la solution obtenue est appelée « Jn ».

Le dosage des nitrites sur le filtrat «Jn» s'effectue par diazotation de l'acide sulfanilique, suivi d'une réaction avec le phénol. Le produit final est un composé diazoïque de couleur jaune photométable à 435 nm. Le schéma réactionnel est indiqué ci-dessous :



### 1.1.1 Réactifs

Réactif phénol-sulfanilique

Ammoniaque

Solution étalon de nitrite de sodium à 3 mg/L

Filtrat de jambon «Jn » fourni déjà dilué au 1/10.

### 1.1.2 Étalonnage du spectrophotomètre

A partir de la solution étalon de nitrite de sodium à 3 mg/L, préparer une gamme de 0 à 10 µg de nitrites par tube. Les tubes de la gamme seront traités comme les essais (voir tableau de résultats = annexe 1).

Données : NO<sub>2</sub> = 46 g/mol ; Na NO<sub>2</sub> = 69 g/mol

### 1.1.3. Dosage des nitrites sur le filtrat de jambon « Jn ».

Réaliser deux essais comme indiqué ci-dessous :

N° tubes	Essai 1	Essai 2
Filtrat de jambon« Jn » au 1/10 (mL)	2	5
Eau distillée (mL)	3	0
Réactif phénol-sulfanilique (mL)	1	1
Agiter et attendre 10 minutes		
Ammoniaque (mL) sous hotte	1	1
Agiter attendre 10 minutes. Lire l'absorbance à 435 nm.		

#### I.1.4 Résultats :

Compléter la feuille de résultats fournie en annexe 1. Conclure.

### 1.2 Dosage de l'acide ascorbique

Ce dosage est effectué sur un deuxième filtrat noté « Jac » obtenu par filtration de 200 g d'un broyat de jambon dans 50 mL exactement d'acide métaphosphorique.

Le principe du dosage est basé sur les propriétés réductrices de l'acide ascorbique. L'oxydant utilisé est le 2,6 dichlorophénol-indophénol (DCPIP) ; 1 mole de DCPIP oxyde 1 mole d'acide ascorbique.

#### 1.2.1 Réactifs

Solution de 2,6 dichlorophénol-indophénol à C voisine de  $1,50 \text{ mmol L}^{-1}$

Solution étalon d'acide ascorbique à exactement  $0,5 \text{ g/L}$

Eau distillée bouillie et refroidie

Filtrat de jambon « Jac »

#### 1.2.2. Étalonnage de la solution de 2,6 dichlorophénol-indophénol

Dans un erlenmeyer, introduire :

- E = 5 mL de solution étalon d'acide ascorbique
- 15 mL d'eau distillée bouillie et refroidie

Verser la solution de 2,6 dichlorophénol-indophénol jusqu'à l'apparition d'une couleur rose pâle persistant pendant 30 secondes.

**Faire deux essais.**

#### 1.2.3 Dosage de l'acide ascorbique dans le filtrat « Jac »

Préparer 50 mL de filtrat dilué au 1/2 dans l'acide métaphosphorique.

Dans un erlenmeyer, introduire :

- E = 5 mL de filtrat dilué
- 15 mL d'eau distillée bouillie et refroidie

Verser la solution de 2,6 dichlorophénol-indophénol jusqu'à l'apparition d'une coloration rose pâle persistant 30 secondes.

**Faire deux essais.**

#### 1.2.4 Résultats

Compléter la feuille de résultats en annexe 2. Conclure.

## 2. CONTRÔLES IMMUNOLOGIQUES (14 points)

La technique d'Ouchterlony est utilisée afin d'identifier dans les produits de charcuterie :

- l'origine des espèces animales (porc, bœuf, mouton, cheval, volaille...).
- les protéines étrangères à la viande (soja, œufs, caséines, protéines de lactosérum, gluten...)

Le premier objectif est de vérifier la spécificité de l'immun-sérum anti-porc.

Le second objectif est de tester un extrait de jambon de porc pour vérifier sa composition en viande. Pour cela, on dispose d'immuns sérums anti-porc, anti-poulet, anti-dinde et anti-bœuf. La spécificité des immuns-sérums anti-poulet, anti-dinde et anti-bœuf est avérée.

### 2.1 Réactifs et matériel

- 2 tubes de 5 mL d'agarose à 1% en tampon PBS, maintenu en surfusion au bain-marie à 55°C.
- Immuns sérums :- anti-porc, anti-poulet, anti-dinde, anti-bœuf.
- Extrait de jambon à tester (dilué en eau physiologique) noté E.
- Extrait de viande de porc.
- Extrait de viande de poulet.
- Extrait de viande de dinde.
- 2 boîtes de Pétri (diamètre 5,5 cm).
- Emporte-pièce : cloche de Durham ou équivalent.
- 1 tube d'eau physiologique

### 2.2 Mode opératoire

#### 2.2.1 Préparation des boîtes

Se référer à l'annexe 3 : contrôles immunologiques.

#### 2.2.2 Remplissage des puits

- Une boîte est utilisée pour tester la spécificité de l'immun sérum anti-porc dont on dépose 20µL dans le puits central = Boîte A.
- L'autre boîte est utilisée pour tester l'extrait de jambon (E) dont on dépose 20µL dans le puits central = Boîte B.
- Définir les réactifs à introduire dans les puits 1 à 4 de chaque boîte afin d'atteindre les objectifs respectifs. Sur l'annexe 3, présenter les plans de dépôts en annotant les schémas des boîtes.
- Introduire 20 µ L de réactif par puits

### 2.2.3 Incubation

Placer les boîtes en chambre humide à température ambiante pendant 24 à 48 heures.

## 3.CONTRÔLES MICROBIOLOGIQUES (26 points)

Du fait de sa richesse en protéines, la viande offre de bonnes conditions à la prolifération de germes. D'autre part, les manipulations préalables à l'obtention du produit de charcuterie constituent une source de contamination non négligeable.

Les contrôles microbiologiques sont nécessaires pour vérifier la qualité sanitaire et commerciale du produit. Les critères microbiologiques concernant le jambon cuit sont indiqués ci-après :

Flore aérobie mésophile	10 <sup>4</sup> /g
Coliformes	10/g
Coliformes fécaux	absence dans 1 g
<i>Staphylococcus aureus</i>	absence dans 1 g
Anaérobies sulfito-réducteurs	absence dans 1 g
<i>Salmonella</i>	absence dans 1 g

### 3.1.Dénombrement de la flore aérobie mésophile

Il s'effectue sur une suspension mère de jambon préparée en pesant 10 g de jambon, introduits dans un sachet stérile auquel on ajoute 90 mL d'eau peptonée ; Le broyage est effectué dans un appareil homogénéisateur type Stomacher et est présenté en erlenmeyer, ou flacon stérile, et noté "Bx".

#### 3.1.1.Matériel

- Flacon ou erlen stérile contenant le broyat = B x.
- 6 Tubes de 16 mL de PCA en surfusion : les demander à l'examineur.
- 6 Tubes de 4 mL de PCA en surfusion : les demander à l'examineur.
- 5 Pipettes pailles ou pipettes à usage unique de 1 mL.
- 6 Boîtes de Pétri vides stériles.
- 4 Tubes de diluant de 9 mL stérile : tryptone-sel .
- 1 Agitateur mécanique.

#### 3.1.2.Protocole

- A partir du broyat "Bx" fourni procéder à un dénombrement dans la masse en double couche en milieu PCA.
- Ensemencer 3 dilutions successives en double exemplaire.
- Les dilutions à tester sont à déterminer
- Montrer une des dilutions à un examinateur.

Données : le nombre de germes est évalué à environ 10<sup>5</sup> /g de jambon

- Justifier le choix des dilutions
- Préciser les conditions d'incubation
- Discuter l'intérêt de cette recherche

### 3.2 Recherche et identification de germes responsables de surissement.

Les streptocoques, les microcoques, les *Pseudomonas*, et les lactobacilles sont responsables de l'altération du jambon, en particulier lorsqu'il est emballé sous vide. Un prélèvement du liquide exsudé, dans le paquet contenant le jambon étudié au 3.1 est proposé pour étude. Il est présenté en tube noté "Lx".

#### 3.2.1. Recherche de germes responsables de surissement.

- Procéder à l'examen microscopique du produit noté "Lx".
- Faire le compte rendu de vos observations.
- Montrer un champ caractéristique à un examinateur.
- Isoler sur gélose trypticase-soja et sur gélose Man Rogosa Sharp.
- Justifier le choix de ces milieux.

#### 3.2.2 Identification de germes responsables de surissement.

Une souche isolée du liquide prélevé est présentée sur gélose nutritive inclinée notée « Sx » .

- Réaliser le ou les examens microscopiques adéquats.
- Réaliser le ou les tests enzymatiques utiles à l'orientation du germe.
- Procéder à l'identification du germe. Justifier la composition de la galerie d'identification choisie.
- L'ensemencement de la galerie d'identification sera réalisé après remise du compte rendu 30 minutes avant la fin des épreuves.
- Ensemencer la galerie fournie par le centre.

## ANNEXE 1

À rendre avec la copie

## FEUILLE DE RESULTATS : CONTRÔLES BIOCHIMIQUES

DOSAGE DES NITRITES

## 1. Étalonnage du spectrophotomètre

Calculer la concentration en nitrites de la solution étalon.

## 2. Établissement de la gamme d'étalonnage et des essais

Compléter le tableau

Tubes	témoin	1	2	3	4	5	E1	E2
Solution étalon en mL								
Filtrat de jambon « Jn » en mL							2	5
Eau distillée en mL							3	0
Réactif phénol-sulfanilique en mL							1	1
<b>Agiter, attendre 10 minutes</b>								
Ammoniaque en mL							1	1
<b>Agiter, attendre 10 minutes et lire l'absorbance à 435 nm</b>								
Quantité en µg de nitrites par tube								
Absorbance à 435 nm								

Nom et Prénom du candidat :

N° de poste :

**ANNEXE 1 (suite)**  
**À rendre avec la copie**

**Calcul de la concentration en nitrite**

Donner la droite de régression et le coefficient de corrélation.

Calculer la concentration en nitrite dans le filtrat "Jn" (CV = 3%).  
formule littérale :

--

Calculs

<b>Concentration en NO<sub>2</sub> en mg.L<sup>-1</sup></b>	<b>Essai 1</b>	<b>Essai 2</b>
<b>% d'imprécision</b>		
<b>Validation</b> $(C1 - C2) / (C1 + C2) < 2CV$		
<b>Concentration retenue en mg.L<sup>-1</sup></b>		
<b>Masse en nitrite dans le jambon = formule littérale</b>		
<b>Teneur en nitrite en mg. kg<sup>-1</sup> jambon = valeur</b>		

Code : QATAC

Nom et Prénom du candidat :

Page 8/11

N° de poste :

Nom et Prénom du candidat :

N° de poste :

ANNEXE 2  
À rendre avec la copie

**FEUILLE DE RESULTATS : CONTRÔLES BIOCHIMIQUES**

**DOSAGE DE L'ACIDE ASCORBIQUE**

**1. Étalonnage du DCPIP**

Calcul de la concentration molaire du DCPIP en mmol/L

Formule littérale

Données : M ac.ascorbique = 176 g/mol

Calculs : (CV = 1%)

	Essai 1	Essai 2
Concentration du DCPIP en mmol.L <sup>-1</sup>		
% d'imprécision		
Validation		
(C1-C2)/(C1+C2) < 2CV		
Concentration retenue en mmol.L <sup>-1</sup>		

Nom et Prénom du candidat :

N° de poste :

**ANNEXE 2 (suite)**  
**À rendre avec la copie**

**Calcul de la concentration en acide ascorbique**

Calcul de la concentration de l'acide ascorbique en mg/L dans le filtrat de jambon "Jac"

Formule littérale

--

M ac. ascorbique = 176 g/mol

**Calculs (CV = 1%)**

	<b>Essai 1</b>	<b>Essai 2</b>
<b>Concentration en acide ascorbique en mg.L<sup>-1</sup></b>		
<b>% d'imprécision</b>		
<b>Validation</b> $(C1-C2)/(C1+C2) < 2CV$		
<b>Concentration retenue en mg.L<sup>-1</sup></b>		
<b>Masse en acide ascorbique dans le jambon : formule littérale</b>		
<b>Teneur en acide ascorbique en mg. kg<sup>-1</sup> jambon : valeur</b>		

Code : QATAC

Nom et Prénom du candidat :

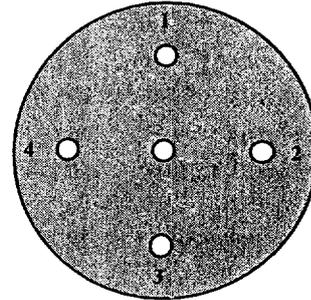
Page 10/11

N° de poste :

### ANNEXE 3 A rendre avec la copie

#### PROTOCOLE ET FEUILLE DE RESULTATS : CONTRÔLES IMMUNOLOGIQUES

- Poser les boîtes de Pétri sur un support horizontal.
- Répartir l'agarose dans les deux boîtes de Pétri ; laisser prendre en masse à température ambiante. Mettre 15 min au réfrigérateur.
- En suivant le schéma ci-contre, creuser délicatement dans chaque boîte, 5 puits à l'emporte-pièce.
- Les puits doivent avoir une forme cylindrique parfaite.

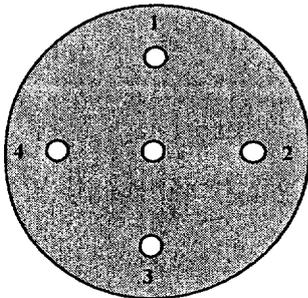


1. Préciser la composition et le rôle du témoin de la boîte A :

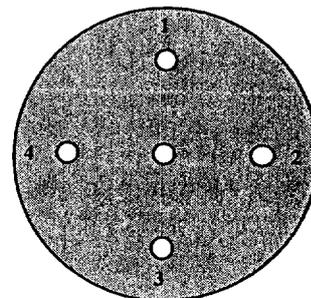
2. Faire un schéma du plan de dépôt

boîte A : test : spécificité de l'immunsérum anti-porc

Boîte B : test : extrait de jambon



- 1 :
- 2 :
- 3 :
- 4 :



- 1 :
- 2 :
- 3 :
- 4 :

3. Proposer un autre plan de dépôt pour la boîte B.

**BTS QUALITÉ LES INDUSTRIES ALIMENTAIRES ET LES  
BIO-INDUSTRIES**

**Session 2004**

**LES TECHNIQUES D'ANALYSE ET DE PRODUCTION**

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

**CONTRÔLE DE LA QUALITE DES PRODUITS DE CHARCUTERIE**

Deuxième jour : 1h30

**1. CONTRÔLES IMMUNOLOGIQUES.**

Reporter sur l'annexe 4 un schéma d'observation des boîtes.

Analyser les résultats et conclure sur l'annexe 4.

**2. CONTRÔLES MICROBIOLOGIQUES.**

2.1 Dénombrement de la flore aérobic mésophile.

Effectuer la lecture des boîtes de dénombrement.

Présenter les résultats sous forme de tableaux.

Exprimer le résultat du dénombrement des germes aérobies mésophiles, en se référant aux données de l'annexe 5.

Conclure.

2.2 Recherche et identification de germes responsables de surissement.

2.2.1 Recherche de germes responsables de surissement .

Effectuer les lectures des isoléments.

Discuter les résultats obtenus.

2.2.2 Identification de germes responsables de surissement.

Procéder à la lecture de la galerie d'identification.

Identifier le germe.

2.2.3 Conclure et commenter l'ensemble des résultats.

Données :

Critères microbiologiques concernant le jambon cuit	
Flore aérobie mésophile	$10^4$ /g
Coliformes	10/g
Coliformes fécaux	absence dans 1 g
<i>Staphylococcus aureus</i>	absence dans 1 g
Anaérobies sulfito-réducteurs	absence dans 1 g
<i>Salmonella</i>	absence dans 1 g

Nom et prénom du candidat :

N° de poste :

## DEUXIEME JOUR

### ANNEXE 4 : CONTRÔLES IMMUNOLOGIQUES

Schéma : Test spécificité de l'immunsérum anti-porc

Analyse

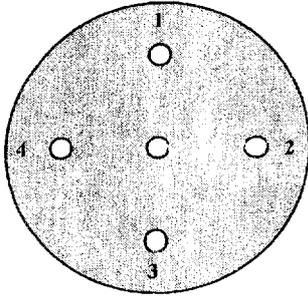
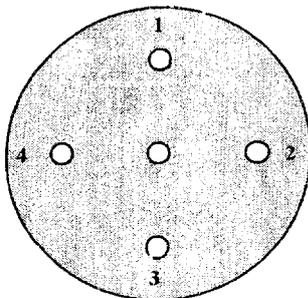


Schéma : test extrait de jambon

Analyse



Conclusion :

**ANNEXE 5**  
**EXTRAIT DE LA NORME NF ISO 7218/A1 DE DÉCEMBRE 2001**

**Mode de calcul : Cas général (comptage des colonies en totalité ou des colonies caractéristiques).**

Pour qu'un résultat soit valable, on estime en général qu'il est nécessaire de compter les colonies sur au moins 1 boîte contenant au minimum 15 colonies [colonies en totalité, colonies caractéristiques ou colonies répondant aux critères d'identification ou de confirmation (9.3.5.3)].

Calculer le nombre  $N$  de microorganismes présents dans l'échantillon pour essai, en tant que moyenne pondérée à partir de deux dilutions successives, à l'aide de l'équation suivante :

$$N = \frac{\sum C}{V \times [n_1 + (0,1 \times n_2)] \times d}$$

où

$\sum C$  est la somme des colonies comptées sur toutes les boîtes retenues de deux dilutions successives dont au moins une contient au minimum 15 colonies ;

$V$  est le volume de l'inoculum appliqué à chaque boîte, en millilitres ;

$n_1$  est le nombre des boîtes retenues à la première dilution ;

$n_2$  est le nombre des boîtes retenues à la deuxième dilution ;

$d$  est le taux de dilution correspondant à la première dilution retenue [ $d = 1$  dans le cas où l'échantillon pour essai (produits liquides)ensemencé directement est retenu].

Arrondir le résultat calculé à deux chiffres significatifs. pour cela, si le troisième chiffre est inférieur à 5 le chiffre précédent n'est pas modifié ; si le troisième chiffre est supérieur ou égal à 5 le chiffre précédent est augmenté d'une unité.

Retenir comme résultat un nombre compris de préférence entre 1,0 et 9,9 multiplié par la puissance appropriée de 10, ou un nombre entier avec 2 chiffres significatifs.

Exprimer le résultat comme suite :

- nombre  $N$  de microorganismes par millilitre (produits liquides) ou par gramme (autres produits).

**Cas de deux boîtes (échantillon pour essai ou suspension mère ou première dilution) contenant moins de 15 colonies.**

Si les deux boîtes, au niveau de l'échantillon pour essai (produits liquides) ou de la suspension mère (autres produits) ou de la première dilutionensemencée ou retenue, contiennent moins de 15 colonies (colonies en totalité, colonies caractéristiques ou colonies répondant aux critères d'identification ou de confirmation), calculer le nombre estimé  $N_E$  de microorganismes présents dans l'échantillon pour essai en tant que moyenne arithmétique des colonies comptées sur les deux boîtes à l'aide de l'équation suivante :

$$N_E = \frac{\sum C}{V \times n \times d}$$

où

$\sum C$  est la somme des colonies comptées sur les 2 boîtes ;

$V$  est le volume de l'inoculum appliqué à chaque boîte, en millilitres.

$n$  : le nombre de boîtes retenues.

$d$  : le taux de dilution correspondant à la première dilution retenue.

# BTS QUALITE DANS LES INDUSTRIES ALIMENTAIRES ET LES BIO-INDUSTRIES

Epreuve : Techniques d'analyses et de contrôles

**Modifications sujet à donner oralement aux candidats le jour de l'épreuve**

- Sujet codé QATAC C1 du jeudi 3 juin de 14h00 à 18h30 :

Page 1/6 1.1 Matériel à disposition : lire 10 tubes ou flacons de gélose au désoxycholate à 1‰ en surfusion au lieu de 10 tubes ou flacons de gélose DCL en surfusion

Page 2/6 1.4 Dénombrement en milieu solide dans la masse en simple couche : lire  
**Ensemencer deux boites de gélose au désoxycholate à 1‰ au lieu de** Ensemencer deux boites de milieu DCL

Page 4/6 Introduire ensuite précisément

- **Sous hotte ventilée** 3 mL de nitrobenzène bien mélanger

# BTS QUALITE DANS LES INDUSTRIES ALIMENTAIRES ET LES BIO-INDUSTRIES

Epreuve : Techniques d'analyses et de contrôles

**Modifications sujet à donner oralement aux candidats le jour de l'épreuve**

- **Sujet codé QATAC C2 du vendredi 4 juin de 14h00 à 15h00 :**

Page 2/3 Lire **Identification des colonies présentes sur M1** au lieu de Contrôles immunologiques des colonies présentes sur M1

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

Session 2004

## E5 – TECHNIQUES D'ANALYSES ET DE PRODUCTION U52 – TECHNIQUES D'ANALYSES ET DE CONTRÔLES

### MATIERE D'OEUVRE BIOCHIMIE

- Solution commune aux deux dosages. 100 mL de "solution J" 5,5 mg/L de  $\text{NaNO}_2$  et à 2,2 g/L de  $\text{NaCl}$ , par candidat.

### DOSAGE DE LA TENEUR EN CHLORURE

#### Solutions

- Acide nitrique à 0,1 mol/L = 25 mL/candidat en distributeur (5 mL)
- Nitrobenzène sous hotte = 15 mL/candidat en distributeur (3 mL)  
L'usage du nitrobenzène peut être évité en préconisant le chauffage du milieu réactionnel pour faciliter l'agglomération du précipité
- Nitrate d'argent ( $\text{AgNO}_3$ ) à 0,1 mol/L : sécher du nitrate d'argent pendant 2 heures à  $150^\circ\text{C}$  et le laisser refroidir dans un dessiccateur. Dissoudre 16,989 g de nitrate d'argent dans 1000 mL. 150 mL/ candidat
- Thiocyanate de potassium ( $\text{KSCN}$ ), solution titrée à 0,1 mol/L : 9,7 g dans 1000 mL. Étalonner avec la solution de nitrate d'argent à 0,1 mol/L et l'indicateur = 50 mL/candidat
- Solution saturée de chromate de  $\text{K}^+$  10 mL/candidat
- (Indicateur) Sulfate double d'ammonium et de fer (III)  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3, 24\text{H}_2\text{O}$  à 50 g/L 5 mL/ candidat
- Chlorure de Na anhydre : 0,5 g/candidat

#### Matériels

- 4 erlenmeyer de 250 mL
- Éprouvette de 100 mL
- 2 Pipettes jaugées 20 mL
- Burette de 25  $\text{cm}^3$
- 2 Sabots à peser
- 2 Pipettes de 5 mL graduées
- 1 balance de précision 0,0001g
- semi microburette (10 mL)

- dessiccateur
- 1 spatule
- 3 béchers « poubelle »
- bec bunsen (en cas de chauffage en remplacement de l'usage du nitrobenzène)
- allumettes (en cas de chauffage en remplacement de l'usage du nitrobenzène)

### Matériel collectif

- bidon récupération produits toxiques

## DOSAGE DE LA TENEUR EN IONS NITRITE

### Solutions

- Nitrite de sodium : solution  
10 mL/ candidat à 1g/L de nitrite de sodium noté "solution étalon de  $\text{Na NO}_2$  (ou nitrite de sodium) : M"
- Réactif R des ions nitrites : 5 g d'acide sulfanilique + 140 mL d'acide éthanoïque pur + 800 mL d'eau distillée puis 80 mg de N-1-naphtyl éthylène diamine puis compléter à 1L avec de l'eau distillée. **Réactif légèrement rosé. A présenter en flacon dispenseur.**
- Chauffer, laisser refroidir et filtrer.  
Il est préférable de préparer le réactif le jour même de l'utilisation.  
100 mL/candidat

### Matériels

- 1 fiole jaugée de 100 mL
- 2 Pipettes jaugées de 1 mL
- 1 Pipette jaugée de 10 mL ou flacon dispenseur réglé sur 10 mL
- 8 tubes à essais
- 8 cuves spectrophotométriques
- Spectrophotomètre visible
- 1 micro pipette P1000 à volume réglable et cônes bleus.
- papier filtre
- papier Joseph
- parafilm
- poire d'aspiration
- 2 bechers « poubelle »

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

Session 2004

## E5 – TECHNIQUES D'ANALYSES ET DE PRODUCTION U52 – TECHNIQUES D'ANALYSES ET DE CONTRÔLES

Matière d'œuvre jour 1

### Biochimie

### Microbiologie

Produits par candidat :

- 1 tube de BN avec  $10^4$  E coli/mL = "Bx" : 5 mL
- 5 tubes contenant exactement 9 mL de tryptone-sel
- 15 tubes de BLBVB avec cloche
- 10 flacons ou tubes de gélose ~~DCL~~ lactosée ou désoxycholate à 0,1 % en surfusion (V = 14 mL)
- 1 tube de BN avec E coli + Staphylococcus aureus noté "Mx"
- 1 boîte de GN
- 1 boîte de Baird-Parker notée  $m_1$
- 1 boîte de VRBL notée  $m_2$

### Matériel

- Pipette stérile 1 mL ou équivalent : 7
- Lames, lamelles : colorants de Gram
- 10 boîtes pétri

Ne pas fournir de documents concernant la gélose DCL, les milieux BLBVB.

# **BTS QUALITÉ DANS LES INDUSTRIES ALIMENTAIRES ET LES BIO-INDUSTRIES**

**Session 2004**

## **E5 – TECHNIQUES D'ANALYSES ET DE PRODUCTION U52 – TECHNIQUES D'ANALYSES ET DE CONTROLES**

**Matière d'œuvre jour 2**

### **Microbiologie**

- Norme AFNOR calcul de la moyenne pondérée
- Colorants de Gram, lames
- Table Mac Grady. Table de 3 avec limite de confiance + explication de son utilisation
- Staphyslide test + document : Protocole + interprétation
- Document avec composition + lecture + interprétation des milieux : Baird Parker et VRBL.
- Documents fournisseurs "anonymés" note  $m_1$ ,  $m_2$ ,  
ne pas préciser que  $m_1$  = Baird Parker  
 $m_2$  = VRBL
- Pas de documents internes à chaque centre.

**BTS QUALITÉ DANS LES INDUSTRIES ALIMENTAIRES ET  
LES BIO-INDUSTRIES**

**Session 2004**

**E5 – TECHNIQUES D'ANALYSES ET DE PRODUCTION**

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

**Durée : 6 heures**

**Coefficient : 3**

# **BTS QUALITÉ DANS LES INDUSTRIES ALIMENTAIRES ET LES BIO-INDUSTRIES**

**Session 2004**

## **E5 – TECHNIQUES D'ANALYSES ET DE PRODUCTION U52 – TECHNIQUES D'ANALYSES ET DE CONTRÔLES**

**Durée : 6 heures**

**Coefficient : 3**

### **Analyses de produits à base de viande** *Premier jour : 4h30*

#### **Microbiologie (30 points)**

Le laboratoire d'analyses microbiologiques d'une salaison souhaite mettre en place de nouvelles méthodes de suivi de ces produits et procède donc à une série de tests pour sélectionner les techniques les plus efficaces et maîtriser la réalisation de ces analyses.

#### **1. Comparaison de méthodes de dénombrement**

Le laboratoire désire tester et comparer 2 techniques de dénombrement de coliformes totaux dans les viandes : la première en milieu solide et la deuxième en milieu liquide. L'échantillon a déjà été préparé : 10g de viande ont été pesés, déposés dans un sac stérile, 90 mL de tryptone-sel leur ont été rajoutés. L'ensemble a été broyé. Vous disposez d'une fraction de ce broyat afin de tester les deux méthodes de dénombrement.

##### **1.1 Matériel à disposition**

- Un tube contenant le broyat de viande : "Bx"
- 5 tubes de 9 mL de tryptone-sel
- 15 tubes de milieu BLBVB
- 10 tubes ou flacons de gélose DCL en surfusion
- Pipettes stériles de 1 mL ou équivalent.

##### **1.2 Réalisation des dilutions**

Réaliser 5 dilutions décimales du broyat de viande.  
Montrer à un examinateur la réalisation d'une dilution.

### 1.3 Dénombrement en milieu liquide

Ensemencer 3 tubes de milieu BLBVB pour chacune des dilutions réalisées. (Volume d'inoculum = 1 mL)

Incuber à 30°C durant 24h.

### 1.4 Dénombrement en milieu solide dans la masse en simple couche

Ensemencer 2 boîtes de milieu DCL pour le broyat Bx pur et les dilutions jusqu'à  $10^{-4}$  inclus.

Incuber à 30°C durant 24 h.

## 2. Tests de milieux d'isolement

Le laboratoire désire tester différents milieux sélectifs afin de réaliser des isolements à partir des produits alimentaires qu'il souhaite analyser.

Un mélange bactérien vous est proposé : "Mx"

### 2.1 Examens microscopiques

Réaliser un état frais et une coloration de Gram du mélange.

Montrer les examens microscopiques à un examinateur.

### 2.2 Isolement

Réaliser un isolement du mélange sur gélose nutritive et sur 2 milieux sélectifs : M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>.

## Biochimie : (30 points)

La détection et le dosage des nitrites dans les aliments et en particulier dans les produits de charcuterie se justifie par le fait qu'ils conduisent à des nitrosamines cancérigènes.

En France, la législation limite la teneur en nitrite dans les produits de charcuterie à 150 mg/kg exprimés en NaNO<sub>2</sub>.

La teneur en sel habituellement observée pour ce type de charcuterie est de 1,8 %.

Les chlorures et les nitrites sont dosés dans un échantillon J issu d'un jambon cuit.

## 1. Préparation de l'échantillon J fourni

### 1.1 Principe

Les chlorures et les ions nitrites NO<sub>2</sub><sup>-</sup> sont extraits d'un jambon après hachage et passage à l'eau bouillante.

Ensuite, une défécation est effectuée à l'aide d'hexocyanoferrate de potassium et d'éthanoate de zinc.

## 1.2 Protocole

Mise en solution des chlorures et des ions nitrite du jambon.

25 g de jambon haché ont été pesés précisément dans un ballon de 100 mL. Après ajout de 5 mL de solution de borax saturée et 50 mL d'eau distillée (température >70°C), le mélange a été chauffé au bain-marie bouillant.

Après refroidissement, le contenu du ballon a été transvasé dans une fiole jaugée de 200 mL

Puis, 2 mL d'hexocyanoferrate de potassium, 2 mL d'éthanoate de zinc et 50 mL d'eau distillée, ont été ajoutés.

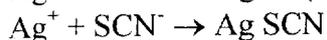
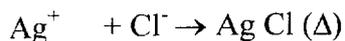
Après agitation et repos, la fiole jaugée a été complétée au trait de jauge avec de l'eau distillée.

Le mélange a été filtré et la solution obtenue est appelée J.

## 2. Dosages

### 2.1 Dosage des chlorures

Les équations mises en œuvre dans ce dosage sont les suivantes :



#### 2.1.1 Étalonnage d'une solution de nitrate d'argent

Dans un Erlenmeyer, introduire :

- une masse m, voisine de 0,1 g de chlorure de sodium pur et anhydre
- 100 mL d'eau distillée
- 2 mL de solution saturée de chromate de potassium.

Verser la solution de nitrate d'argent jusqu'au virage de l'indicateur au rouge orangé.

Noter le volume de solution de nitrate d'argent nécessaire.

Réaliser 2 essais.

Données : Na : 23g.mol<sup>-1</sup>. Cl : 35,5 g.mol<sup>-1</sup>

#### 2.1.2 Dosage des chlorures dans l'échantillon

Introduire dans un erlenmeyer :

- 20 mL de J
- 5 mL d'acide nitrique
- 1 mL de l'indicateur (sulfate double d'ammonium et de fer).

Introduire ensuite précisément :

- 20 mL de la solution de nitrate d'argent à environ  $0,1 \text{ mol. L}^{-1}$ .
- 3 mL de nitrobenzène et bien mélanger.

Agiter vigoureusement afin de coaguler le précipité.

Titre l'excès de nitrate d'argent avec la solution de thiocyanate de potassium à  $0,1 \text{ mol. L}^{-1}$  jusqu'à coloration rose persistante.

Noter le volume de solution de thiocyanate de potassium nécessaire.

Réaliser deux essais.

## 2.2 Dosage des ions nitrites

### 2.2.1 Fabrication d'une gamme étalon

A partir d'une solution M à 1g de nitrite de sodium par litre, préparer 5 solutions filles de volume final 1 mL.

Solution fille	[NaNO <sub>2</sub> ] en mg/L
1	2
2	4
3	6
4	8
5	10

Préparer un tube avec 1 mL d'eau distillée pour le blanc.

### 2.2.2 Dosage

Préparer 2 essais avec 1 mL de la solution J.

Ajouter 10 mL de réactif R dans tous les tubes.

Après homogénéisation, transférer en cuve et mesurer l'absorbance à 526 nm après 10 minutes.

Compléter le tableau de l'annexe 2.

## 3. Résultats

Compléter les feuilles de résultats en annexes 1 et 2.

Répondre aux questions figurant sur ces annexes.

Nom et Prénom du candidat :

N° de poste :

**ANNEXE 1**  
**À rendre avec la copie**

**Feuilles de résultats contrôles biochimiques**

**1. Dosage des chlorures**

1.1 Étalonnage de la solution de nitrate d'argent.

- Masses de chlorure de sodium
- Volumes de solution de nitrate d'argent
- Calculer la concentration de la solution de nitrate d'argent (CV = 0,5 %) :

1.2 Dosage des chlorures dans l'échantillon

- Volumes de solution de thiocyanate de potassium
- Calculer la concentration en chlorures dans la solution J, en mol.L<sup>-1</sup> (CV = 1 %) :
- Calculer la teneur en chlorure de l'échantillon, exprimée en % de chlorure de sodium dans le jambon et conclure :

**ANNEXE 2**  
**À rendre avec la copie**  
**Feuille de résultats : contrôles biochimiques**

**2. Dosage des nitrites**

2.1 Préparation de la gamme étalon et des essais, résultats.

2.1.1 Compléter le tableau ci-dessous.

2.1.2 Donner la concentration de la solution étalon utilisée.

2.1.3 Justifier les volumes choisis de la solution étalon.

Tubes							E <sub>1</sub>	E <sub>2</sub>
Solution étalon en mL								
Solution J en mL							1	1
Eau distillée en mL								
Réactif R en mL	10	10	10	10	10	10	10	10
Mélanger, transférer en cuve et mesurer l'absorbance à 526 nm après 10 minutes								
Concentration en Na NO <sub>2</sub> en mg.L <sup>-1</sup>								
Absorbance à 526 nm								

## 2.2 Exploitation des résultats

2.2.1 Donner la droite de régression et le coefficient de corrélation.

2.2.2 Déterminer la concentration en nitrite de sodium dans la solution J (CV= 3%).

2.2.3 Calculer le taux de nitrite dans le jambon testé en mg de nitrite de sodium par kg de jambon et conclure.

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

Session 2004

## E5 – TECHNIQUES D'ANALYSES ET DE PRODUCTION U52 – TECHNIQUES D'ANALYSES ET DE CONTROLES

Durée : 6 heures

Coefficient : 3

### Analyses de produits à base de viande *Deuxième jour : 1h30*

Rappel du premier jour : L'échantillon a déjà été préparé : 10g de viande ont été pesés, déposés dans un sac stérile, 90 mL de tryptone-sel leur ont été rajoutés. L'ensemble a été broyé. Vous disposez d'une fraction de ce broyat afin de tester les deux méthodes de dénombrement.

#### 1. Comparaison de méthodes de dénombrement

##### 1.1 Dénombrement en milieu liquide

A l'aide de la table de Mac Grady, estimer la concentration en coliformes totaux dans la viande.

Encadrer le résultat à l'aide des limites de confiance à 95 % de fiabilité.

##### 1.2 Dénombrement en milieu solide

Dénombrer les colonies et déterminer le nombre d'UFC de coliforme par g de viande.

Exprimer le résultat en se référant aux données de l'annexe 1.

##### 1.3 Conclusion

Comparer les résultats des 2 méthodes.

#### 2. Tests de milieux d'isolement

Le mélange proposé le premier jour était en fait un mélange de *Staphylococcus* et d'*Escherichia coli*.

## 2.1 Lecture de l'isolement sur GN

Vérifier la pousse des 2 souches bactériennes.

## 2.2 Analyse du milieu M1

### 2.2.1 Analyse du milieu M1

Ce milieu est normalement sélectif des *Staphylococcus*.

A l'aide des documents fournis, des examens macroscopique et microscopique, vérifier cette donnée et conclure sur la sélectivité du milieu M1.

### 2.2.2 Contrôle immunologique des colonies présentes sur M1.

Le milieu M1 peut apporter des renseignements sur l'espèce de *Staphylococcus* ayant été isolé.

En justifiant votre réponse, indiquez l'espèce de *Staphylococcus* présumée présente sur M1. Vérifiez cette présomption par un test immunologique rapide (résultat en moins de 30 secondes) fourni par le centre. Montrer la réalisation à un examinateur. Conclure.

## 2.3 Analyse du milieu M2

Analyser votre isolement à l'aide des documents fournis et conclure sur la sélectivité du milieu M<sub>2</sub>.

**Mode de calcul : Cas général (comptage des colonies en totalité ou des colonies caractéristiques).**

Pour qu'un résultat soit valable, on estime en général qu'il est nécessaire de compter les colonies sur au moins 1 boîte contenant au minimum 15 colonies [colonies en totalité, colonies caractéristiques ou colonies répondant aux critères d'identification ou de confirmation.

Calculer le nombre N de microorganismes présents dans l'échantillon pour essai, en tant que moyenne pondérée partir de deux dilutions successives, à l'aide de l'équation suivante :

$$N = \frac{\sum C}{V \times [n_1 + (0,1 \times n_2)] \times d}$$

où

$\sum C$  est la somme des colonies comptées sur toutes les boîtes retenues de deux dilutions successives dont au moins une contient au minimum 15 colonies ;

V est le volume de l'inoculum appliqué à chaque boîte, en millilitres ;

$n_1$  est le nombre des boîtes retenues à la première dilution ;

$n_2$  est le nombre des boîtes retenues à la deuxième dilution ;

d est le taux de dilution correspondant à la première dilution retenue [d = 1 dans le cas où l'échantillon pour essai (produits liquides) ensemencé directement est retenu].

Arrondir le résultat calculé à deux chiffres significatifs. Pour cela, si le troisième chiffre est inférieur à 5 le chiffre précédent n'est pas modifié ; si le troisième chiffre est supérieur ou égal à 5 le chiffre précédent est augmenté d'une unité.

Retenir comme résultat un nombre compris de préférence entre 1,0 et 9,9 multiplié par la puissance appropriée de 10, ou un nombre entier avec 2 chiffres significatifs.

Exprimer le résultat comme suite :

- nombre N de microorganismes par millilitre (produits liquides) ou par gramme (autres produits).

**Cas de deux boîtes (échantillon pour essai ou suspension mère ou première dilution) contenant moins de 15 colonies.**

Si les deux boîtes, au niveau de l'échantillon pour essai (produits liquides) ou de la suspension mère (autres produits) ou de la première dilution ensemencée ou retenue, contiennent moins de 15 colonies (colonies en totalité, colonies caractéristiques ou colonies répondant aux critères d'identification ou de confirmation), calculer le nombre estimé  $N_E$  de microorganismes présents dans l'échantillon pour essai en tant que moyenne arithmétique des colonies comptées sur les deux boîtes à l'aide de l'équation suivante :

$$N_E = \frac{\sum C}{V \times n \times d}$$

où

$\sum C$  est la somme des colonies comptées sur les 2 boîtes ;

V est le volume de l'inoculum appliqué à chaque boîte, en millilitres.

n : nombre de boîtes retenues

d = taux de dilution correspondant à la première dilution retenue.