

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

U52 – TECHNIQUES D'ANALYSE ET DE CONTRÔLE

Durée : 6 heures	Coefficient : 3
------------------	-----------------

PREMIER JOUR

Durée : 4 heures 30

Document à rendre avec la copie : Feuille de résultats, page 10/10

Ce sujet comporte 10 pages, numérotées de 1 à 10
Assurez-vous qu'il est complet dès qu'il vous est remis.

CONTRÔLES SUR UN MIEL

PREMIER JOUR : 4 h 30

CONTRÔLES BIOCHIMIQUES DE LA QUALITÉ D'UN MIEL (30 points)

Le miel que l'on se propose d'analyser est un miel polyfloral, dit : " toutes fleurs ", destiné à la consommation.

1. DÉTERMINATION DE LA TENEUR EN EAU PAR RÉFRACTOMÉTRIE

La diminution de la teneur en eau du miel correspond à une étape de maturation qui a lieu dans la ruche avant l'operculation des alvéoles.

Les miels doivent, à part quelques exceptions (miel de bruyère, miels destinés à l'industrie), respecter la norme suivante : teneur en eau $\leq 21\%$; au-delà, il y a risque de fermentation rapide par des levures.

Plus précisément, pour les miels polyfloraux :

le miel est dit « d'excellente qualité » si sa teneur en eau est inférieure à 18 % ;

il est de « bonne qualité » pour une teneur en eau comprise entre 18 % et 18,5 % ;

de 18,5 à 19%, il est de « qualité moyenne » ;

de 19 à 21%, la qualité est « médiocre » ;

enfin, au dessus de 21 %, c'est un produit de mauvaise qualité qui d'après la législation, ne peut être commercialisé que sous les dénominations « miel de pâtisserie » ou « miel d'industrie ».

1. 1. Principe

L'indice de réfraction du miel parfaitement liquéfié est fonction de sa teneur en eau.

1.2. Mode opératoire

1.2.1. Contrôle de l'étalonnage du réfractomètre par mesure de l'indice de réfraction n_D de l'eau désionisée (à réaliser en présence d'un examinateur).

Déposer une goutte d'eau désionisée sur le prisme du réfractomètre. Fermer l'appareil. Lire l'indice de réfraction et noter la température. Se reporter à la table 1 de l'annexe 1 et vérifier si le résultat est conforme à la valeur attendue.

1.2.2. Préparation de l'échantillon

L'échantillon fourni a été préparé de la manière suivante : le miel a été placé à l'étuve à 50 ± 2 °C en récipient fermé pendant un temps suffisant pour assurer la disparition des cristaux de sucre. Puis il a été homogénéisé et refroidi.

1.2.3. Mesure de l'indice de réfraction du miel (2 essais)

À l'aide d'une baguette de verre, déposer rapidement une goutte de miel sur le prisme du réfractomètre. Fermer l'appareil. Lire l'indice de réfraction et noter la température.

1. 3. Résultats

Se reporter à la table 2 de l'annexe 1 pour obtenir la teneur en eau du miel analysé, exprimée en pourcentage pondéral. Effectuer si nécessaire une correction de température, selon les indications données en annexe 1.

Conclure.

Compléter la feuille de résultats de l'annexe 3.

2. DÉTERMINATION DE L'ACIDITÉ LIBRE PAR POTENTIOMÉTRIE

Une autre caractéristique de composition exigée, en vue de la commercialisation d'un miel, est la teneur en acides libres ; celle-ci doit être inférieure à 40 mmol d'ions H^+ .kg⁻¹ ; une valeur plus élevée pourrait correspondre à une acidité modifiée artificiellement et notamment indiquer un résidu d'acide oxalique ou formique venant d'un traitement anti-varroa (acarien parasite de l'abeille).

2. 1. Principe

On entend par acidité libre, l'acidité titrable par l'hydroxyde de sodium jusqu'au pH du point équivalent. Elle est obtenue en traçant la courbe de titration du miel par une solution titrée d'hydroxyde de sodium et en déterminant à partir de cette courbe le volume équivalent de solution titrante.

2. 2. Mode opératoire

2.2.1. Préparation de l'échantillon

Peser, au centigramme près, une masse m voisine de 5 g de miel ; dissoudre dans quelques mL d'eau désionisée puis transférer quantitativement dans une fiole jaugée de 50 mL et compléter à 50 mL avec de l'eau désionisée.

2.2.2. Dosage (1 essai)

Réaliser un montage potentiométrique avec une sonde pHmétrique et étalonner le dispositif en utilisant la procédure fournie.

Dans un bécher de contenance appropriée, introduire :

- E = 25 mL de la dilution obtenue précédemment,
- un barreau aimanté.

Noter le pH.

Placer le bécher sur un agitateur magnétique et régler celui-ci de façon à obtenir une agitation modérée qui sera maintenue pendant toute la durée du dosage. Verser la solution d'hydroxyde de sodium contenue dans une semi-microburette de 10 mL, par fractions de 0,2 mL réduites à 0,1 mL dès que les variations de pH deviendront plus importantes. Noter le pH immédiatement après chaque addition d'hydroxyde de sodium.

2. 3. Résultats

Compléter la feuille de résultats de l'annexe 3.

Construire la courbe de titration $\text{pH} = f(V_{\text{NaOH}})$. Joindre le graphe à la copie.

Déterminer graphiquement le point d'équivalence ; noter ses coordonnées (pH , V_{NaOH}).

Calculer la teneur du miel en acides libres, exprimée en mmol/kg^{-1} . Conclure.

Donnée :

Concentration de la solution d'hydroxyde de sodium : voisine de $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$.

La valeur exacte sera communiquée au cours de l'épreuve.

3. DOSAGE ENZYMATIQUE DU GLYCÉROL

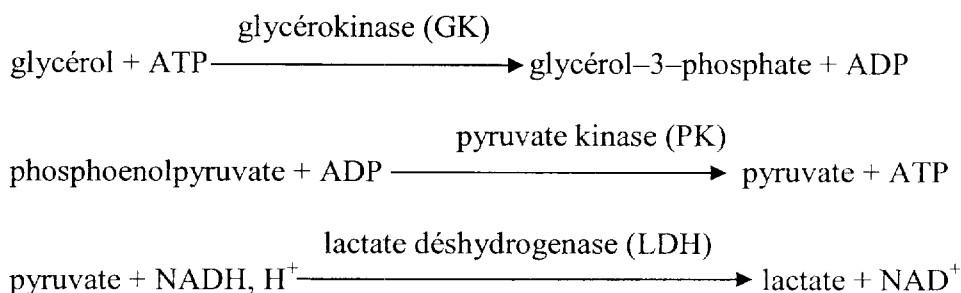
Le dosage du glycérol par méthode enzymatique constitue un procédé efficace et rapide pour mettre en évidence la fermentation d'un miel. En effet, le glycérol est naturellement présent en faible quantité dans les miels, mais il s'en forme en quantité appréciable au cours du processus de fermentation du miel ; la corrélation est parfaite entre le taux de glycérol dans le miel et l'importance de la fermentation subie par celui-ci.

Si le taux mesuré dépasse 100 mg.kg^{-1} la fermentation est certaine mais imperceptible à la gustation et ceci jusqu'à 200 mg.kg^{-1} .

A partir de 200 mg.kg^{-1} , des anomalies sensorielles et gustatives deviennent perceptibles.

Au-delà de 300 mg.kg^{-1} , ces anomalies sont évidentes et le miel n'est alors plus commercialisable.

3. 1. Principe de la méthode



3. 2. Mode opératoire

3.2.1 Préparation de la solution « S »

La solution « S » **fournie a été obtenue** de la manière suivante :

Une masse $m = 4,896 \text{ g}$ de miel a été pesée et additionnée de quelques mL d'eau désionisée. Après homogénéisation, la solution obtenue a été transférée quantitativement dans une fiole jaugée de 10 mL que l'on a ajusté avec de l'eau désionisée.

3.2.2. Dosage du glycérol de la solution « S » et du contrôle « C »

Se reporter à l'annexe 2 (réactifs et mode opératoire).

Effectuer un essai sur la solution « S » et un essai sur le contrôle « C ».

La concentration en glycérol du contrôle C sera communiquée au cours de l'épreuve.

3.3. Résultats

Calculer les variations d'absorbance : $\Delta A = A_1 - A_2$ pour chaque cuve.

Calculer la variation d'absorbance nette de chaque essai : $\Delta A_E = \Delta A_{\text{essai}} - \Delta A_{\text{témoin}}$.

Établir la relation littérale donnant la concentration molaire du glycérol dans les solutions S et C.

Faire les applications numériques de façon à obtenir les concentrations molaires puis massiques du glycérol dans chacune de ces 2 solutions.

Interpréter le résultat obtenu pour la solution contrôle.

Calculer la teneur en glycérol, exprimée en mg.kg^{-1} , du miel analysé. Conclure.

Compléter la feuille de résultats de l'annexe 3.

Données :

ϵ_{NADH} à 340 nm = 6 300 $\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$

M glycérol = 92,10 g.mol^{-1}

CV de la méthode = 2,5%.

ASPECTS MICROBIOLOGIQUES DU MIEL (30 points)

Les micro-organismes présents dans le miel sont essentiellement des levures et des bactéries sporulantes. Les formes végétatives de ces bactéries sont absentes. Le miel présente en effet des propriétés antimicrobiennes qui empêchent la croissance de nombreux micro-organismes. On se propose de mesurer l'activité bactériostatique d'un miel « toutes fleurs » du commerce.

1. ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ BACTÉRIOSTATIQUE D'UN MIEL

L'activité antibactérienne du miel peut être caractérisée par une note de 0 à 5 en fonction de la dilution nécessaire pour obtenir l'inhibition de la croissance d'une culture de *Bacillus subtilis* (souche Pasteur).

1.1 Vérification de la pureté de la souche test de *Bacillus subtilis*

Isoler la souche sur une gélose normale ordinaire. Incuber 24h à 37°C.

1.2 Mise en culture de la souche test sur un milieu contenant différentes dilutions du miel

1.2.1. Matériel et réactifs

6 Tubes à essai (témoin de croissance et n°1 à n°5) contenant différents volumes (voir tableau ci-après) d'un milieu de culture de composition :

Peptone 10 g

Agar 25 g

Eau distillée qsp 1L

Solution de miel (solution à 50% (masse/volume) en eau physiologique)

Culture de *Bacillus subtilis* en suspension en eau physiologique

Bain thermostaté à 50°C

6 boîtes de Pétri stériles

Pipettes stériles de 10 mL

Pipettes Pasteur stériles

1.2.2. Mode opératoire

Maintenir à une température voisine de 50°C les tubes contenant le milieu de culture d'une part et le miel de l'autre.

A l'aide d'une pipette, prélever la solution de miel et la mélanger au milieu dans les proportions suivantes :

Tubes n°	1	2	3	4	5	Témoin de croissance
Milieu de culture (mL)	7,5	9	10,5	12	13,5	13,5
Solution de miel (mL)	7,5	6	4,5	3	1,5	1,5
Proportion du miel dans le milieu de culture final (%)	25	20	15	10	5	5

Agiter au vortex et couler chaque mélange en boîte de Pétri stérile.

Après refroidissement, étaler à la surface de chaque boîte 4 gouttes de suspension bactérienne.

Incuber 24 h à 35°C.

2. NUMÉRATION DES LEVURES PRÉSENTES DANS LE MIEL

Les levures que l'on peut trouver dans le miel sont des levures osmophiles, capables de se multiplier dans des solutions très concentrées en sucre. Elles peuvent être responsables d'une fermentation du miel, processus naturel, exploité par l'homme pour obtenir une boisson alcoolisée, l'hydromel. Ce processus débute lorsque la teneur en eau du miel est trop élevée. La production d'hydromel reste un débouché intéressant pour les apiculteurs dont les miels ont commencé une fermentation.

On souhaite dénombrer les levures dans le miel.

2.1. Matériel et réactifs

- 2 mL d'une dilution au 1/10 du miel à analyser
- deux tubes de 9 mL de diluant stérile (eau peptonée à 0,1% + saccharose à 20%)
- 6 géloses à l'extrait de malt contenant 50% de saccharose
- 2 pipettes graduées de 1 mL
- 1 P100 ou 1 pipette graduée de 1 mL (pour distribuer 0,1 mL)

2.2. Préparation des échantillons

Une dilution au 1/10 du miel a été préparée en introduisant de façon aseptique 25 g de miel dans 225 ml du diluant.
Préparer les dilutions 10^{-1} et 10^{-2} de cette solution de miel en eau peptonée avec saccharose.

2.3. Ensemencement

Ensemencer 0,1 mL de la solution de miel initiale ou 0,1 mL de chacune de ses dilutions à la surface de géloses d'extrait de malt contenant 50 % (m/m) de saccharose.
Prévoir deux essais par dilution.
Incuber 48 heures à 25°C.

3. ASPECTS MACROSCOPIQUE ET MICROSCOPIQUE DES LEVURES PRÉSENTES DANS LE MIEL

Les levures présentes dans le miel ont été isolées sur un milieu Sabouraud – chloramphénicol.

Réaliser l'examen macroscopique de la culture.
Réaliser un examen microscopique (état frais).
Présenter les résultats de vos observations dans un compte-rendu.

ANNEXE 1

TABLE 1

correspondance entre l'indice de réfraction de l'eau et la température

°C	n_D	°C	n_D	°C	n_D
15	1,33339	22	1,33280	29	1,33206
16	1,33331	23	1,33271	30	1,33194
17	1,33324	24	1,33261	31	1,33182
18	1,33316	25	1,33250	32	1,33170
19	1,33307	26	1,33240	33	1,33157
20	1,33299	27	1,33229	34	1,33144
21	1,33290	28	1,33217	35	1,33131

TABLE 2

INDICE de réfraction à 20 °C.	POURCENTAGE réel d'eau.	INDICE de réfraction à 20 °C.	POURCENTAGE réel d'eau.
1,5041.....	13,0	1,4910.....	18,2
1,5035.....	13,2	1,4905.....	18,4
1,5030.....	13,4	1,4900.....	18,6
1,5025.....	13,6		
1,5020.....	13,8	1,4895.....	18,8
1,5015.....	14,0	1,4890.....	19,0
1,5010.....	14,2	1,4885.....	19,2
1,5005.....	14,4	1,4880.....	19,4
1,5000.....	14,6	1,4876.....	19,6
		1,4871.....	19,8
1,4995.....	14,8	1,4866.....	20,0
1,4990.....	15,0	1,4862.....	20,2
1,4985.....	15,2	1,4858.....	20,4
1,4980.....	15,4	1,4853.....	20,6
1,4975.....	15,6	1,4849.....	20,8
1,4970.....	15,8	1,4844.....	21,0
1,4965.....	16,0	1,4828.....	21,5
1,4960.....	16,2	1,4815.....	22,0
1,4955.....	16,4	1,4802.....	22,5
1,4950.....	16,6	1,4789.....	23,0
1,4945.....	16,8	1,4777.....	23,5
1,4940.....	17,0	1,4764.....	24,0
1,4935.....	17,2	1,4752.....	24,5
1,4930.....	17,4	1,4739.....	25,0
1,4925.....	17,6	1,4726.....	25,5
1,4920.....	17,8	1,4714.....	26,0
1,4915.....	18,0	1,4702.....	26,5

Correction de température

Si la mesure a été effectuée à une température différente de 20°C, l'indice de réfraction lu doit être corrigé de façon à obtenir l'indice à 20°C.

Le terme correctif est de 0,00023 par °C ; la correction est additive si la mesure a été faite à une température inférieure à 20°C, soustractive dans le cas contraire.

ANNEXE 2

DOSAGE ENZYMATIQUE DU GLYCÉROL (d'après Boehringer)

RÉACTIFS :

Solution 1 : tampon glycine pH 7,4 ; NADH ; ATP ; phosphoénolpyruvate ; sulfate de magnésium ; stabilisateurs

Suspension 2 : pyruvate kinase ; lactate déshydrogénase

Suspension 3 : glycérokinase

MODE OPÉRATOIRE :

Conditions de mesure :

Longueur d'onde : 340 nm

Trajet optique : 1 cm

Température : 20-25 °C

Lire contre l'air ou l'eau désionisée

Réalisation du test :

Introduire dans les cuves :	Témoin	Essai
Solution 1	1,000 mL	1,000 mL
Echantillon à analyser		0,100 mL
Eau désionisée	2,000 mL	1,900 mL
Suspension 2	0,010 mL	0,010 mL
Mélanger. Attendre 5 à 7 minutes et lire l'absorbance A_1 . Déclencher la réaction principale par addition de :		
Suspension 3	0,010 mL	0,010 mL
Mélanger. Attendre 10 minutes et lire l'absorbance A_2 .		

N° de poste :

ANNEXE 3

Feuille de résultats BIOCHIMIE (à compléter et à joindre à la copie)

1. Détermination de la teneur en eau d'un miel

	n_D	température
Eau désionisée		
Miel essai 1		
Miel essai 2		

2. Détermination de l'acidité libre

Tableau de résultats :

V_{NaOH} (mL)	
pH	

V_{NaOH} (mL)	
pH	

Point d'équivalence : pH = V_{NaOH} (mL) =

3. Dosage du glycérol

Absorbance à 340 nm	Témoin	Solution « S »	Contrôle « C »
A_1			
A_2			

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

U52 – TECHNIQUES D'ANALYSE ET DE CONTRÔLE

Durée : 6 heures	Coefficient : 3
------------------	-----------------

DEUXIEME JOUR

Durée : 1 heure 30

Ce sujet comporte 3 pages, numérotées de 1/3 à 3/3
Assurez-vous qu'il est complet dès qu'il vous est remis.

CONTRÔLES SUR UN MIEL

DEUXIÈME JOUR : 1h30

ASPECTS MICROBIOLOGIQUES DU MIEL

1. ÉVALUATION DE L'ACTIVITE BACTÉRIOSTATIQUE DU MIEL

1.1 Contrôle de pureté de la souche de *Bacillus subtilis*

Réaliser les observations macroscopique et microscopique de l'isolement réalisé sur gélose normale ordinaire.

Conclure.

1.2 Influence de la concentration en miel sur la croissance du *Bacillus subtilis*

Observer le développement bactérien de *Bacillus subtilis* sur les différentes boîtes après incubation 24 h à 35°C. L'inhibition peut être totale (pas de culture) ou partielle (le développement bactérien peut couvrir un quart, un demi ou trois quarts de la boîte).

Noter vos résultats dans un tableau.

Expression des résultats

Noter l'activité anti-bactérienne de 0 à 5 suivant la convention ci-dessous :

Inhibition avec 5 % de miel dans le milieu.....5

Pas d'inhibition avec 5 % mais inhibition avec 10 %.....4

Pas d'inhibition avec 10 % mais inhibition avec 15 %.....3

Pas d'inhibition avec 15 % mais inhibition avec 20 %.....2

Pas d'inhibition avec 20 % mais inhibition avec 25 %.....1

Pas d'inhibition même avec 25 %..... 0

On peut atteindre une précision de 0,25 entre ces notes lorsque l'inhibition n'est pas totale et que le développement bactérien couvre un quart, un demi ou trois quarts de la surface gélosée dans une boîte.

2. NUMÉRATION DES LEVURES DU MIEL

Compter les colonies sur les différentes boîtes et rendre les résultats sous forme de tableau.

Choisir, si possible, les boîtes qui contiennent de 10 à 300 colonies.

Calculer le nombre de levures par gramme de miel selon la formule recommandée par la norme AFNOR :

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

ΣC est la somme des colonies comptées sur toutes les boîtes retenues de deux dilutions successives dont au moins une contient au minimum 15 colonies et au maximum 300 ;
 n_1 est le nombre de boîtes retenues à la première dilution ;
 n_2 est le nombre de boîtes retenues à la deuxième dilution ;
 d est la dilution correspondant à la première dilution retenue ;
 V est le volume de l'inoculum appliqué à chaque boîte, en mL.

Arrondir le résultat calculé à deux chiffres significatifs.

Retenir comme résultat un nombre compris de préférence entre 1,0 et 9,9 multiplié par la puissance appropriée de 10.

BTS QUALITÉ DANS LES INDUSTRIES ALIMENTAIRES ET LES BIO-INDUSTRIES

Session 2006

Travaux pratiques : contrôles de qualité dans les industries fromagères
Évaluation BIOCHIMIE

Critère évalué	Observations	Barème	Note
1- Etalonnage soude Dornic (9 points)	Technique Résultat des essais	3 si $\leq 1 \%$ 2 si $\leq 2 \%$ 1 si $\leq 3 \%$	3+3
	Calculs Etablissement formule littérale Application numérique correcte Concordance Expression du résultat	0,5 0,5 + 0,5 0,5 1	3
2- Activité acidifiante du ferment (7 points)	Technique T0 » non notable (V trop faible) T4 »	4,5 si $\leq 3 \%$ 3 si $\leq 5 \%$ 0,5 si $\leq 7 \%$	4,5
	Calculs Calcul quantité de ferment Calcul C acide lactique + expression Calcul Q acide lactique + expression Calcul Q acide lactique en 4 H + expression Calcul activité acidifiante + expression Expression des résultats	0,5 0,5 0,5 1	2,5
3- Dosage calcium (14 points)	Technique Alignement gamme : si point aberrant : on le retire pour obtenir 0,9998 et on retire 1 point	4 si $r \geq 0,9996$ 2 si $r \geq 0,9993$ 1 si $r \geq 0,9990$	4
	Résultat des essais	2 si $\leq 4 \%$ 1 si $\leq 6 \%$ 0,5 si $\leq 8 \%$	2+2
	Calculs Gamme en tube : tableau Gamme en cuve : tableau Régression linéaire	0,5 0,5 1	2
	Calcul Q calcium dans les essais Calcul C calcium dans Lm Concordance Calcul C calcium lait + expression Teneur calcium du lait + expression Conclusion Expression des résultats	0,5 0,5 0,5 0,5 0,5 0,5 1	4
TOTAL BIOCHIMIE			30

BTS QUALITÉ DANS LES INDUSTRIES ALIMENTAIRES ET LES BIO-INDUSTRIES

Session 2006

U52 – Techniques d'analyse et de contrôle

MATIÈRE D'ŒUVRE BIOCHIMIE

Contrôles de miels et autres produits de la ruche

• Matériel « courant », par élève :

- 1 pissette à eau distillée
- 1 support pour pipettes en verre et 1 support pour pipettes automatique
- 3 bechers ou pots à yaourts et un petit becher à bec verseur
- morceaux de parafilm et de papier d'essuyage
- 3 pipettes compte-gouttes
- 1 propipette

Pour le 1. : Teneur en eau d'un miel

• Produits : (par candidat)

Miel :toutes fleurs liquide (au besoin :avant de le répartir, placer le miel, dans un récipient fermé, à l'étuve à 50 ± 2 °C, pendant un temps suffisant pour assurer la disparition des cristaux de sucre, homogénéiser par agitation et laisser refroidir)	quelques mL dans un petit flacon fermé
Eau distillée	idem

• Matériel : 1 poste commun par salle ou pour 8 à 10 candidats

Réfractomètre , si possible muni d'un thermomètre, avec procédure d'utilisation	1
Thermomètre (le cas échéant) / mesure de température d'environ 20 °C	1
Pipettes compte-gouttes à usage unique	2 x nombre de candidats
Pissette d'eau distillée	1
Morceaux de papier d'essuyage	4 x nombre de candidats
Poubelle /solides	1
Poubelle / liquides	1

Pour le 2. : Acidité libre d'un miel

• Produits : (par candidat)

Miel *	≈ 10 ml
Solution de NaOH à ~0,05 mol/L, notée : « solution d'hydroxyde de sodium ~ 0,05 mol.L ⁻¹ ». Concentration à communiquer aux candidats au début de l'épreuve.	≈ 20 ml

* remarque : possibilité de fournir, au lieu du miel lui-même, une solution d'acide oxalique de concentration ~ 0,002 à 0,003 mol/L, dont l'acidité correspondrait à celle attendue (soit 40 à 60 mmol/Kg) pour la dilution de miel à préparer (cf. 2.2.), ceci afin de faciliter la notation des résultats : dans ce cas on les candidats n'auraient plus à préparer la dilution de miel (modification possible du sujet au niveau du paragraphe 2.2.) : à voir....

• Matériel :

Poste pHmétrie : pHmètre, électrode(s) pour mesure de pH, support d'électrode(s), agitateur magnétique, barreau aimanté + procédure d'utilisation + tampons pour étalonnage du pHmètre	1 par (ou pour 2 ou 3) candidat(s)
Balance + pipettes compte-gouttes + poubelle	1 pour 4 à 6 candidats
Semi-microburette de 10 mL + support	1 par candidat
Becher de 100 mL	1 par candidat
Godet pour pesée de ~ 5 g de miel	1 par candidat
Fiole jaugée de 50 mL	1 par candidat
Pipette jaugée de 25 mL	1 par candidat
Papier millimétré	1 feuille/candidat

Pour le 3. : Dosage du glycérol

• Produits :

- **Réactifs** à préparer à partir de **coffrets pour dosage du glycérol par méthode enzymatique UV** (par exemple : Boehringer réf. 148 270) ; 1 coffret pour 6 ou 7 candidats, et prévoir réserve ?)

- solution 1, notée : « **solution 1** » : 4 à 5 mL par candidat
- suspension 2, notée « **suspension 2** » : 1 flacon pour 6 ou 7 candidats (poste commun ou faire circuler)
- suspension 3, notée : « **suspension 3** » : idem suspension 2

- Solutions à doser :

- **solution « S »** : environ 0,5 mL par candidat ; $\rho_{\text{glycérol}} \sim 0,12 \text{ à } 0,15 \text{ g/L}$: possibilité de la préparer à partir du standard du coffret, en principe à $\sim 0,4 \text{ g/L}$: 1 mL du standard + 2 mL d'eau distillée)
- **solution « C »** : environ 0,5 mL par candidat ; $\rho_{\text{glycérol}} \sim 0,2 \text{ g/L}$, préparée par dilution au $\frac{1}{2}$ du standard du coffret. Concentration à communiquer aux candidats au début de l'épreuve.

Matériel :

Spectrophotomètre UV ($\lambda = 340 \text{ nm}$)	1 par salle
Cuves de spectrophotométrie sur portoir	3 par candidat
Pipette graduée de 2 mL	1 par candidat
P1000 + 2 cônes	1 par candidat
P100 + 2 cônes	1 par candidat
P20 + 2 cônes	1 par candidat

BTS QUALITÉ DANS LES INDUSTRIES ALIMENTAIRES ET LES BIO-INDUSTRIES

Session 2006

U52 – TECHNIQUES D'ANALYSE ET DE CONTRÔLE

PROPOSITION DE BARÈME DE MICROBIOLOGIE : 30 points

1. Évaluation de l'activité bactériostatique d'un miel

1.1 Vérification de la pureté de la souche test

Jour 2

Noter l'isolement / 3 pts

Noter le Gram / 3 pts

Noter le compte-rendu / 2 pts

1.2 Mise en culture de la souche sur un milieu contenant différentes dilutions du miel

Jour 2

Noter l'homogénéité de l'inoculum sur la boîte « témoin de croissance » / 4 pts

Noter la progressivité de l'inhibition avec l'augmentation de concentration en miel / 2,5 pts

Noter le compte-rendu

- tableau / 1 pt

- expression des résultats / 1,5 pt

2. Numération des levures présentes dans le miel

Jour 1

Préparation des échantillons

Noter la réalisation d'une dilution / 2 pts

Jour 2

Noter l'aspect des boîtes / 4 pts

Noter le compte-rendu

- tableau / 1 pt

- calcul / 2 pts

3. Aspects macroscopique et microscopique des levures présentes dans le miel

Jour 1

Noter l'état frais (technique) / 2 pts

Noter le compte-rendu / 2 pts

BTS QUALITÉ DANS LES INDUSTRIES ALIMENTAIRES ET LES BIO-INDUSTRIES

Session 2006

U52 – Techniques d'analyse et de contrôle

MATIÈRE D'ŒUVRE DE MICROBIOLOGIE

PREMIER JOUR

1. Mesure de l'activité bactériostatique du miel

Milieux

1 gélose normale ordinaire par élève

Préparer le milieu de culture suivant :

Peptone	10 g
Agar	25 g
Eau distillée	qsp 1L

Et le répartir en tubes à essai.

Pour chaque élève, prévoir :

- 1 tube contenant 15 mL de milieu noté tube 0
- 1 tube contenant 13,5 mL de milieu noté tube 5
- 1 tube contenant 12 mL de milieu noté tube 4
- 1 tube contenant 10,5 mL de milieu noté tube 3
- 1 tube contenant 9 mL de milieu noté tube 2
- 1 tube contenant 7,5 mL de milieu noté tube 1

Les géloses seront maintenues en surfusion dans un bain thermostaté à 50°C.

Préparer une solution de miel « toutes fleurs » du commerce à 50 pour 100 (masse/volume) dans du sérum physiologique à 7 grammes de NaCl par litre d'eau distillée stérilisé pendant 15 minutes à 120°C. Prévoir 50 mL par élève dans un flacon noté solution de miel à 50 % à préchauffer à 50°C.

Souche

Préparer une suspension de *Bacillus subtilis* (bouillon de 24 heures ou suspension en sérum physiologique : on s'assurera que la suspension est suffisamment dense pour donner une culture en nappe (colonies confluentes) en 24 heures à 35°C sur le milieu cité plus haut) : prévoir 5 mL par élève.

Matériel à prévoir dans la salle à chaque poste

- Bain thermostaté à 50°C (idéalement un par élève ou un pour deux)
- 6 boîtes de Pétri stériles
- 1 pipette stérile de 10 mL
- Pipettes Pasteur stériles
- Étaleur stérile ou billes en verre stériles

Autres

- Etuve à 35°C
- Etuve à 37°C
- Vortex

2. Numération des levures

On travaillera sur un miel « toutes fleurs » du commerce. Le plus simple est de prévoir un miel pasteurisé (on rajoutera alors du *Saccharomyces cerevisiae* dans l'eau peptonée utilisée pour diluer le miel de sorte à pouvoir compter une cinquantaine de colonies sur la boîte de dilution 10^{-1}). Les résultats attendus avec un miel non pasteurisé sont imprévisibles (il faudrait faire des tests pour chaque miel).

Milieux

Diluant = eau peptonée à 0,1%

Par élève prévoir :

- 2 mL d'une dilution au 1/10 du miel réalisée en pesant 25 g de miel dans 225 mL d'eau peptonée contenant des levures *Saccharomyces cerevisiae* ($5 \cdot 10^3$ levures par mL) : noté « dilution 1/10 du miel ».
- deux tubes de 9 mL de diluant stérile

Gélose Sabouraud : 6 boîtes par élève notées « gélose d'extrait de malt – 50 % saccharose »

Matériel par poste

- 2 pipettes graduées de 1 mL
- 1 P100 ou 1 pipette graduée de 1 mL (pour distribuer 0,1 mL)
- Étaleur stérile ou billes de verre stériles

Autre

- Étuve à 25°C

3. Observations des levures

Réaliser un isolement de *Saccharomyces cerevisiae* sur gélose Sabourand-chloramphénicol : 1 boîte par élève.

Colorants habituels et matériel pour examens microscopiques.

DEUXIEME JOUR

- Colorants habituels et matériel pour examens microscopiques
- Fonds noirs

BTS QUALITÉ DANS LES INDUSTRIES ALIMENTAIRES ET LES BIO-INDUSTRIES

Session 2006

U52 - Techniques d'analyse et de contrôle

MATIÈRES D'ŒUVRES

J 1	J 2	MILIEUX ET REACTIFS	par candidat	observations	
X		tubes de 9 mL de tryptone-sel stériles	6		
X		tubes de gélose glucosée à 1% au lait écrémé stérile ou 1 flacon de 120 mL	6	en surfusion	
X		grandes boîtes de Pétri stériles	6		
X		pipettes graduées de 1 mL stériles	7		
X		réceptient avec de la glace	1	ou 1/binôme	
X		Vortex		1/binôme	si possible
X		étuve réglée à 30°C		1/laboratoire	
X		tube de 8 mL de gélose Mueller- Hinton (plutôt que 5 mL)	1	en surfusion	
X		grande boîte de Pétri stérile	1		
X		disques de papier filtre stériles	3	évoir 1 réserve	
X		feuilles de papier filtre découpées aux dimensions de la boîte de Pétri	2		
X		feuille de papier d'aluminium	1		
X		pipette graduée stérile de 1 mL	1		
X		étuve réglée à 55°C	1/ 2 laboratoires		
X		colorants pour le Gram + alcool			
X		GTS en grande boîte de Pétri	1		
X		gélose VF	1	en surfusion	
X		galerie API 20 NE	1		

BTS QUALITÉ DANS LES INDUSTRIES ALIMENTAIRES ET LES BIO-INDUSTRIES

Session 2006

U52 - Techniques d'analyse et de contrôle

Matière d'œuvre

J 1	J 2	SOUCHES ET ECHANTILLONS	par candidat	observations
X		tube contenant 5 mL de lait cru	1	noté "LC" et numéroté
X		tube de 2 mL de culture de <i>Bacillus stearothermophilus</i> variété <i>cadidolactis</i>	1	
X		tube de 2 mL de lait stérile + 0,5 µg/mL de pénicilline	1	noté "T +"
X		tube de 2 mL de lait stérile	1	noté "T -"
X		1 souche de <i>Pseudomonas fluorescens</i> et/ou de <i>Pseudomonas putida</i> sur GTS en boîte	1	notée "GTS" + et numéroté
	X	1 souche de moisissure sur gélose Sabouraud inclinée : <i>Aspergillus</i> ou <i>Mucor</i>	1	notée M + n°

BTS QUALITÉ DANS LES INDUSTRIES ALIMENTAIRES LES BIO-INDUSTRIES

Session 2006

U52 - Techniques d'analyse et de contrôle

Flacon de soude à 1/9 mol/L noté "NaOH Dornic"	100	mL
Pilulier d'hydrogénophthalate de potassium	1	
Phénolphtaléine en flacon compte goutte		
Lait UHT écrémé	150	mL
<u>Préparation de l'erien "t=0"</u> :	1	
Mettre 70 mL de lait UHT dans un erlen stérile. Conserver au froid jusqu'à utilisation.		
<u>Préparation de l'erien "t=4h"</u> :	1	
Soit :Mettre 70 mL de lait UHT dans un erlen stérile. Ajouter 1,5 mL de levain Yalacta et incubé à 45°C pendant 6H puis conserver au froid jusqu'à utilisation Rg : Levain YALACTA (acheté en pharmacie) coûte à reconstituer avec 100 mL de lait UHT écrémé à revivifier au moins 1H avant la préparation de l'erien "t=4h" Soit : Il serait préférable de préparer un lait additionné d'acide lactique afin d'obtenir des résultats évaluable (A voir en réunion d'harmonisation des TP)	1,5	mL

Erlenmeyers stériles	2	
Capsule de pesée	2	
Erlenmeyers de 100 mL	4	
Semi microburette + portoir	1	
Bac à glace + glace	1	
Pipettes graduées de 10 mL ou pipettes à lait	2	

Dosage du calcium dans le lait

Candidat

Kit dosage du calcium Ca-Kit: Référence 61 041 Biomérieux Sa 1 kit contient 80 mL de Ré et 80 mL de R3 : permet le dosage pour 8 candidat		
Réactif R2 en distributeur de 1 mL	10	mL
Réactif R3 en distributeur de 1 mL	10	mL
Flacon de solution de calcium à 0,100 g/L noté "ca"	5	mL
Flacon de solution de calcium à 0,05 g/L noté "Lm"	2	mL

Tubes Eppendorf sur portoir	4	
Semi microcuvettes visible + portoir	8	
Pipette automatique P1000 + cônes	1	
Pipette automatique P20 + cônes	1	

Spectro photomètre/visible

Barème partie 1.1 dénombrement de la flore a aérobie du lait cru

[illegible]

Barème p partie 1.2 Recherche d'antibiotique

[illegible]

Barème partie partie 2.1 : orientation de la souche

[illegible]

Barème parties 2.2 identification de la souche

[illegible]

Barème partie 3 : identification de la moisissure

[illegible]

BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR

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

U52 – TECHNIQUES D'ANALYSE ET DE CONTRÔLE

Durée : 6 heures

Coefficient 3

PREMIER JOUR

Durée : 4 heures 45

Document à rendre avec la copie : Feuille de résultats, page 6/8

Dès que le sujet vous est remis, assurez-vous qu'il est complet.
Le sujet comporte 8 pages numérotées de 1 à 8.

CONTRÔLE D'UN JUS D'ORANGE

PREMIER JOUR (4h45)

Un jus d'orange a été extrait sur le lieu de récolte des fruits puis concentré afin de limiter les coûts de transport. Une fois sur le lieu de conditionnement, il est reconstitué avec de l'eau.

Des contrôles biochimiques sont réalisés lors de la reconstitution : analyse des nitrites présents dans l'eau utilisée, contrôle de la quantité d'eau ajoutée par mesure du degré Brix et dosage de la vitamine C dans le jus. Deux accidents microbiologiques de fabrication sont également analysés.

1. CONTRÔLES BIOCHIMIQUES LORS DE LA RECONSTITUTION (30 points)

1.1. Contrôle de la qualité de l'eau : dosage des nitrites

Les nitrites proviennent de la transformation de la matière organique azotée sous l'action de bactéries. Ils peuvent être toxiques. D'après la législation française, la concentration en nitrites d'une eau destinée à la consommation humaine ne doit pas dépasser $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$.

1.1.1. Réactifs

solution de nitrite de sodium de concentration $0,3 \text{ g.L}^{-1}$
eau X à analyser

1.1.2. Préparation de la solution étalon

À l'aide de la solution de nitrite de sodium de concentration $0,3 \text{ g.L}^{-1}$, préparer par dilution 100 mL d'une solution étalon contenant 2 mg.L^{-1} de nitrites (NO_2^-).

Données : $M(\text{NaNO}_2) = 69 \text{ g.mol}^{-1}$ $M(\text{NO}_2^-) = 46 \text{ g.mol}^{-1}$

1.1.3. Réalisation de la gamme d'étalonnage et des essais

Dans une série de 9 cuves, préparer la gamme d'étalonnage et les essais selon le tableau de colorimétrie ci-dessous :

N° cuve	0	1	2	3	4	5	6	X1	X2
Volume (mL) de solution étalon à 2 mg de nitrites /L	0	0,25	0,5	1	1,5	2	2,5		
Eau X, à analyser (mL)								2,5	2,5
eau désionisée (mL) qsp 2,5 mL									
Réactif phénol-sulfanilique (PS) (mL)	<<— 0,5 mL —>>								
Ammoniaque (mL)	<<— 0,5 mL —>>								
Masse de nitrites (μg)									

Lire l'absorbance à 435 nm après une attente de 10 min.

1.1.4. Résultats

Compléter le tableau de la feuille de résultats biochimie (Annexe 1).

À l'aide d'une régression linéaire, déterminer la concentration massique en nitrites de l'eau X à analyser.

Conclure sur sa potabilité.

Donnée : CV de la méthode = 2%

1.2. Contrôle de la quantité d'eau ajoutée par mesure du degré Brix.

1.2.1. Teneur en matière sèche réfractométrique et contrôle de la quantité d'eau ajoutée.

La teneur en matière sèche réfractométrique (ou extrait sec réfractométrique) est la concentration en saccharose d'une solution aqueuse ayant le même indice de réfraction que le produit analysé dans des conditions déterminées de préparation et de température. Cette concentration est exprimée en pourcentage en masse ou en degré Brix.

La mesure du degré Brix est extrêmement utile pour l'entreprise car elle permet de contrôler la quantité d'eau ajoutée lors de la reconstitution du jus.

1.2.2 Matériel et réactifs

Réfractomètre (il a été préalablement étalonné).

Jus d'orange (10 mL).

1.2.3 Manipulation et résultats

Effectuer 3 mesures du degré Brix du jus d'orange (à 0,25 % près).

Compléter la feuille de résultats biochimie (annexe 1).

Retenir comme résultat la moyenne arithmétique des valeurs obtenues.

Après reconstitution, le degré Brix du jus d'orange doit être compris dans une fourchette de valeurs qui sera donnée par un examinateur.

Conclure sur la qualité de la reconstitution.

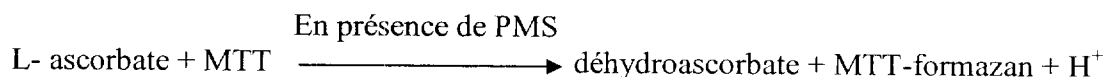
1.3 Dosage de la vitamine C

Le fabricant veut s'assurer que le produit n'a pas perdu trop de vitamine C (L-ascorbate) lors de la concentration, du transport et de la reconstitution du jus d'orange.

1.3.1. Principe

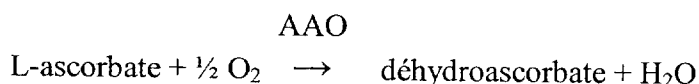
La vitamine C du jus d'orange est dosée par méthode enzymatique.

Les réactions mises en jeu sont les suivantes :



On détermine la quantité de MTT-formazan formée en mesurant l'absorbance à 578 nm en fin de réaction.

Pour le blanc, la fraction de L-ascorbate est oxydée par l'ascorbate oxydase (AAO) en présence de dioxygène :



Le déhydroascorbate ne réagit pas avec le MTT.

1.3.2. Réactifs

Solution 1 : tampon citrate, MTT
 Tube 2 : spatules AAO
 Solution 3 : PMS (transporteur d'électrons)

1.3.3. Mode opératoire

1.3.3.1. Préparation de la solution à doser

Diluer le jus d'orange au 1/10.

1.3.3.2. Protocole du dosage

Introduire dans des cuves :	Blanc	Essai (à doubler)
Solution 1	1,000 mL	1,000 mL
Eau désionisée	1,500 mL	1,500 mL
Jus d'orange dilué au 1/10	0,100 mL	0,100 mL
Tube 2 (spatules AAO)	1 spatule	—
Mélanger (bien remuer la spatule pour le blanc et la laisser en place) et incuber 6 min à 37° C. Après avoir à nouveau mélangé (et retiré la spatule pour le blanc), lire l'absorbance A_1 . Déclencher la réaction par addition de :		
Solution 3	0,100 mL	0,100 mL
Mélanger et incuber 15 min à 37°C à l'obscurité. Lire l'absorbance A_2 immédiatement après avoir sorti la cuve de l'obscurité.		

1.3.3.4 Résultats

Compléter le tableau de la feuille de résultats biochimie (Annexe 1).
 La variation d'absorbance de chaque échantillon est déterminée de la façon suivante : $\Delta A = (A_2 - A_1)_{\text{essai}} - (A_2 - A_1)_{\text{blanc}}$.

Déterminer les concentrations molaire et massique de vitamine C dans le jus d'orange.

Conclure sachant que le jus après concentration-reconstitution doit encore contenir de 200 à 300 mg de vitamine C par litre.

Données :

ϵ du MTT – formazan à 578 nm = 16 900 L.mol⁻¹. cm⁻¹

$M_{\text{vitamine C}} = 176,13 \text{ g.mol}^{-1}$

CV de la méthode = 4 %

2. ANALYSE DE DEUX ACCIDENTS MICROBIOLOGIQUES DE FABRICATION (30 points)

Du fait de son pH acide, le jus d'orange est naturellement préservé du développement de nombreuses bactéries, exception faite des micro-organismes acidophiles. Les accidents de fabrication sont donc en général dûs à des contaminations fongiques. On se propose d'analyser deux types d'accidents microbiologiques.

2.1. Contamination par des levures

Après conditionnement, certaines bouteilles plastiques gonflent du fait du développement de levures produisant du gaz.

2.1.1. Dénombrement des levures

Un échantillon (noté Ld) issu d'une bouteille gonflée est analysé.

Dans un tube à hémolyse stérile, introduire 0,5 mL de cet échantillon et 0,5 mL de bleu de méthylène.

Monter la préparation en cellule de Malassez décrite en annexe 2).

Réaliser la numération et déterminer la concentration en levures de cet échantillon.

Vérifier ce résultat par un dénombrement dans la masse d'une gélose Sabouraud.

Ensemencer en double les 3 dilutions appropriées par la technique de la simple couche. Le choix des dilutions est à justifier sur la copie.

2.1.2. Identification des levures

Un isolement (noté Li) sur gélose Sabouraud a été réalisé à partir d'une bouteille gonflée.

Identifier cette levure grâce à une galerie miniaturisée Api 20CAux et un isolement sur milieu RAT.

2.2. Contamination par des moisissures

L'entreprise est confrontée de temps en temps à la contamination de ses chaînes de fabrication par des moisissures. Afin de rechercher un désinfectant efficace permettant d'éliminer ces champignons, l'identification du genre de la moisissure incriminée doit être réalisée.

La souche fongique est présentée en boîte de pétri.

Effectuer un examen microscopique (technique du scotch) et à l'aide du document fourni en annexe 3, identifier le genre de la moisissure. Réaliser un schéma légendé.

ANNEXE 1

Feuille de résultats Biochimie À rendre avec la copie

1. Dosage des nitrites

N° cuve	0	1	2	3	4	5	6	X1	X2
Volume de solution étalon à 2mg de nitrites/L (mL)	0	0,25	0,5	1	1,5	2	2,5		
Eau X, à analyser (mL)								2,5	2,5
eau désionisée qsp 2,5 mL (mL)									
Réactif phénol-sulfanilique (PS) (mL)	<<— 0,5 mL —>>								
Ammoniaque (mL)	<<— 0,5 mL —>>								
Masse de nitrites (µg)									
Absorbance à 435 nm									

Régression linéaire :

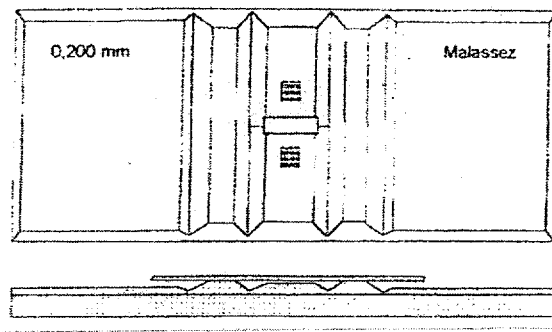
2. Mesure du degré Brix du jus

°B₁ = °B₂ = °B₃ =
 °B_{moy} =

3. Dosage de la vitamine C

	Blanc	Essai 1	Essai 2
A1			
A2			

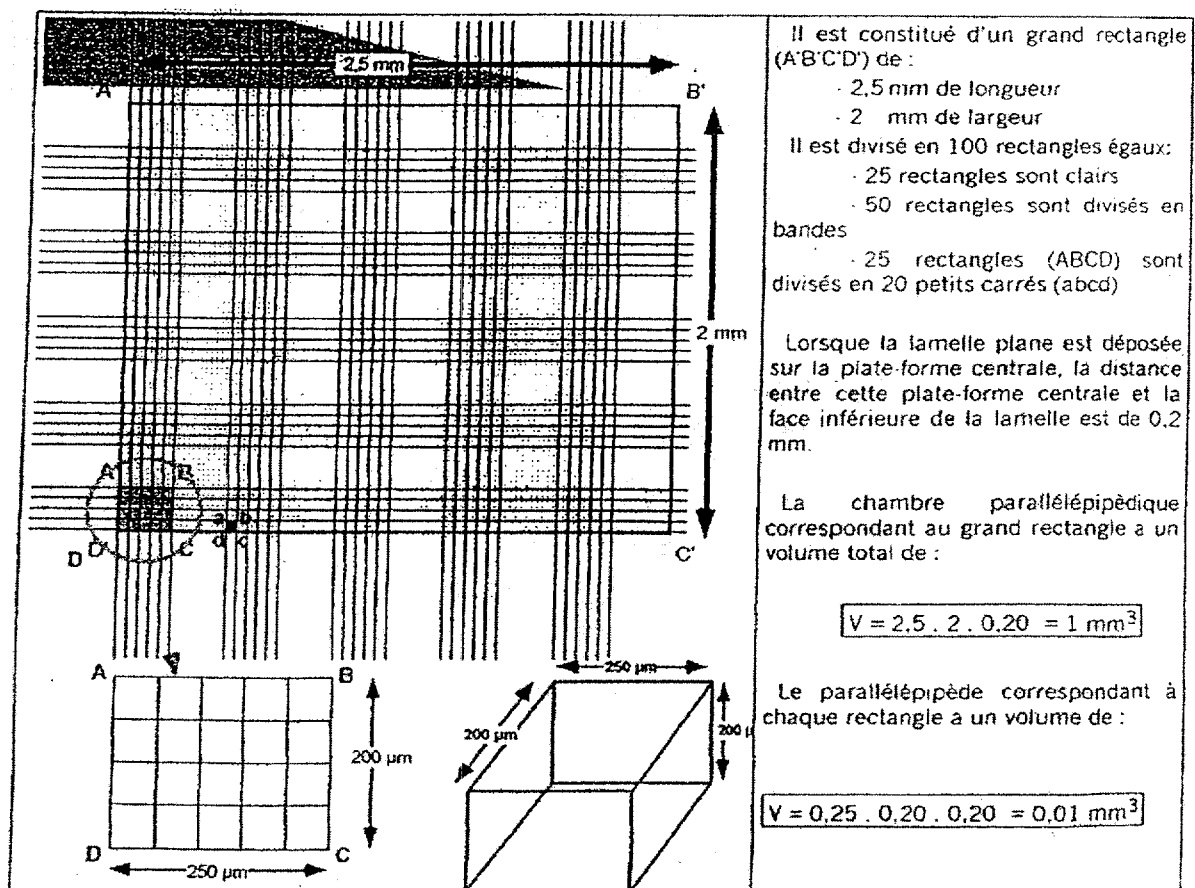
Hématimètre de Malassez



C'est une épaisse lame de verre, creusée de rigoles qui délimitent des plates-formes :

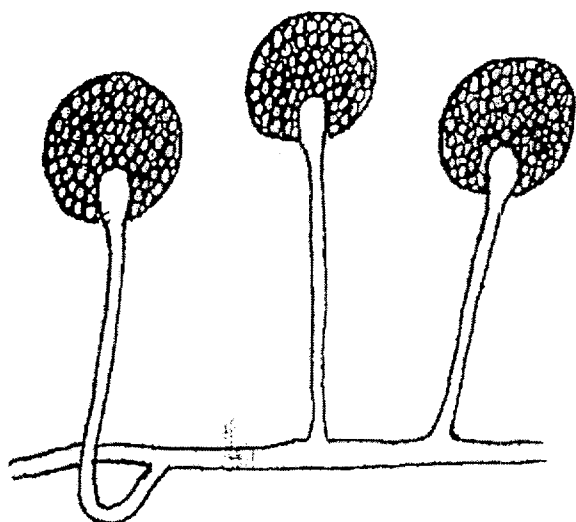
- Deux plates-formes latérales élevées qui supporteront une lamelle épaisse et plane
- Une plate-forme centrale légèrement abaissée, sur laquelle est gravé un quadrillage (ou deux quadrillages)

Le quadrillage de l'hématimètre de Malassez est conçu de la façon suivante :

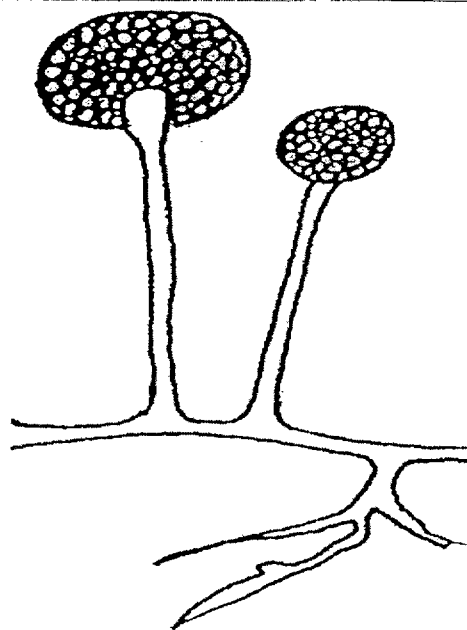


ANNEXE 3

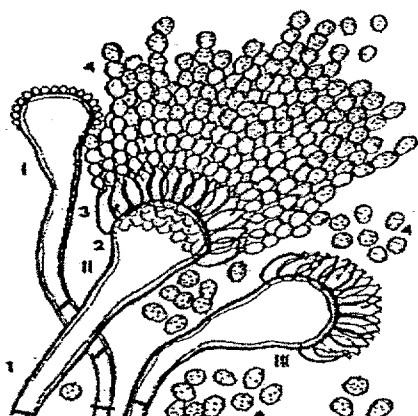
Schémas d'organes de fructification de moisissures



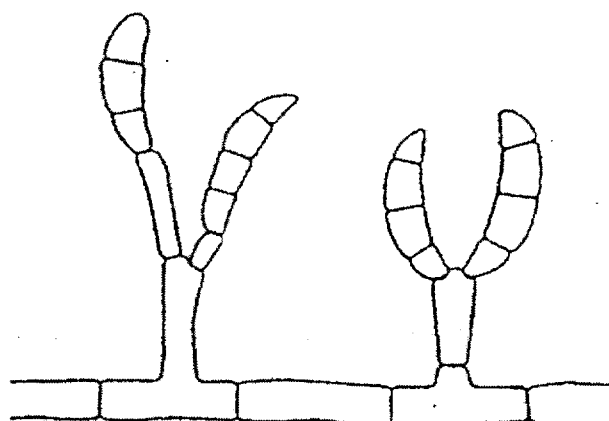
Mucor



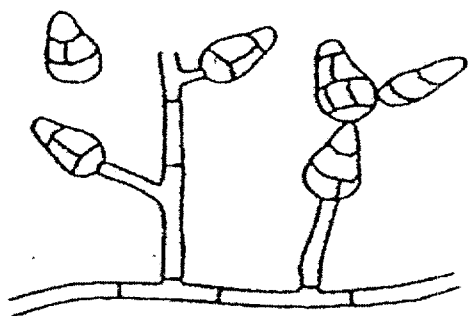
Rhizopus



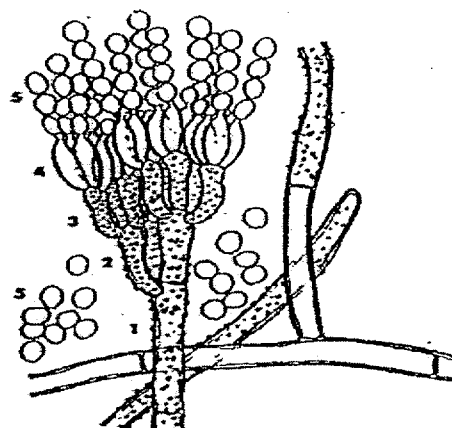
Aspergillus



Fusarium



Alternaria



Penicillium

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

U52 – TECHNIQUES D'ANALYSE ET DE CONTRÔLE

Durée : 6 heures	Coefficient : 3
------------------	-----------------

PREMIER JOUR

Durée : 4 heure 30

Document à rendre avec la copie : feuilles de résultats, pages 8/9 et 9/9

Ce sujet comporte 9 pages, numérotées de 1 à 9.
Assurez-vous qu'il est complet dès qu'il vous est remis.

CONTRÔLES DE QUALITÉ DANS LES INDUSTRIES FROMAGÈRES

PREMIER JOUR (4 h 30)

En fabrication fromagère, la qualité des produits dépend :

- des matières premières (lait et ferments lactiques utilisés),
- des processus de fabrication.

PARTIE MICROBIOLOGIE

1. CONTRÔLES DES MATIÈRES PREMIÈRES

Il s'agit de contrôler à la réception certaines caractéristiques d'un lait entier cru afin de vérifier sa conformité aux critères suivants :

flore totale : $< 10^5$ microorganismes aérobies mésophiles mL⁻¹
antibiotique : absence

1.1. Dénombrement de la flore aérobie mésophile

La technique utilisée est un dénombrement dans la masse en gélose glucosée à 1% au lait écrémé.

1.1.1. Matériel à disposition

- 1 tube de 5 mL de lait cru noté "LC" (à conserver dans la glace)
- 6 tubes de 9 mL de tryptone-sel stérile
- 6 tubes ou un flacon de gélose glucosée à 1% au lait écrémé en surfusion
(à demander à l'examineur)
- 6 grandes boîtes de Pétri stériles
- 7 pipettes de 1 mL stériles

1.1.2. Réalisation des dilutions

Réaliser les dilutions successives et montrer à un examinateur la réalisation d'une dilution.
Choisir trois dilutions pour le dénombrement.

1.1.3. Dénombrement en milieu solide dans la masse en simple couche

Ensemencer les dilutions choisies ; faire 2 essais par dilution.
Incuber à 30°C pendant 24 h.

1.2 Recherche d'antibiotique par la méthode des disques sur milieu gélosé

La présence d'antibiotique dans le lait lors du traitement d'une mammite chez la vache est une cause très fréquente d'inhibition de la fermentation du lait par le levain lactique.

1.2.1. Matériel

- 1 tube de 2 mL de culture jeune de *Bacillus stearothermophilus* variété *cadidolactis*
- 1 tube de 2 mL de lait témoin positif (lait stérile + 0,5 µg/mL de pénicilline), noté « T+ »
- 1 tube de 2 mL de lait témoin négatif (lait stérile sans pénicilline), noté « T- »
- 1 tube de 8 mL de gélose Mueller-Hinton en surfusion (à demander à l'examineur)
- 1 grande boîte de Pétri stérile
- 1 pipette de 1 mL stérile
- 3 disques de papier filtre stériles
- 2 feuilles de papier filtre
- 1 feuille de papier d'aluminium

1.2.2. Ensemencement de la souche sensible

Introduire 1 mL de la culture de *Bacillus stearothermophilus* dans 8 mL de gélose Mueller-Hinton en surfusion.
Homogénéiser et couler dans une boîte de Pétri stérile.

1.2.3. Dépôt des disques

Plonger un disque de papier filtre dans chacun des laits suivants :
témoin négatif,
témoin positif,
lait cru à tester.

Bien égoutter le disque contre la paroi du tube.
Déposer chaque disque sur la gélose Mueller-Hinton ensemencée.
Incuber en chambre humide à 55°C pendant 24h.

2. CONTRÔLES EN COURS DE FABRICATION

Lors des contrôles en cours de fabrication des fromages, l'apparition d'un goût de savon dans la pâte a conduit à la recherche d'un contaminant bactérien lipolytique.

La feuille de résultats microbiologie (annexe 1) doit être remplie à chaque étape et rendue avant l'heure indiquée.

Ce contaminant a été repiqué sur une gélose trypticase-soja notée « GTS ».

A partir de cette souche, réaliser une coloration de Gram. Montrer à un examinateur le résultat obtenu.

Réaliser devant un examinateur le test enzymatique utile à l'orientation de la souche.

Proposer par écrit une orientation justifiée du contaminant bactérien à identifier.

Indiquer par écrit le(s) milieu(x) et la galerie miniaturisée nécessaires à l'identification du contaminant bactérien. Rendre la feuille de résultats. Les milieux seront distribués par les examinateurs.

Ensemencer les milieux fournis par le centre.

Incuber les milieux ensemencés 24 h à 30°C.

PARTIE BIOCHIMIE

Certaines caractéristiques des matières premières utilisées en industrie fromagère sont vérifiées.

1. CONTRÔLE DE L'ACTIVITÉ ACIDIFIANTE DU FERMENT LACTIQUE

La réussite des fabrications fromagères dépend de la qualité du lait et de celle des ferments lactiques utilisés.

Le ferment lactique est choisi par l'industriel en particulier pour son activité acidifiante. Cette activité est exprimée en unité (U). Sa détermination nécessite l'utilisation de la soude Dornic.

Donnée : une unité (U) est la quantité de ferment en grammes nécessaire pour produire 150 mmoles d'acide lactique en 4 h dans du lait.

1.1. Étalonnage de la soude Dornic

1.1.1. Mode opératoire

Peser une masse d'environ 0,120 g d'hydrogénophthalate de potassium.
Procéder à la semi-microburette, au dosage de la soude Dornic « NaOH Dornic », en présence de phénolphtaléine ; sa concentration est d'environ 1/9 mol.L⁻¹.
Réaliser deux essais.

1.1.2. Résultats

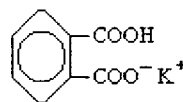
Compléter la feuille de résultats biochimie (annexe 2).
Calculer la concentration de la soude Dornic.

Données :

hydrogénophthalate de potassium :

$M_{\text{hydrogénophthalate de potassium}} = 204,22 \text{ g.mol}^{-1}$

CV de la méthode = 0,5%



1.2. Détermination de l'activité spécifique acidifiante du ferment lactique

1.2.1. Détermination de la quantité d'acide lactique apparu

1.2.1.1 Mode opératoire

On dispose :

- d'une fiole d'Erlenmeyer noté « t = 0 » contenant 70 mL de lait écrémé stérile dont 5 mL de la préculture du ferment correspondant au temps t = 0 (à conserver dans la glace),
- d'une fiole d'Erlenmeyer noté « t = 4h » contenant 70 mL de lait écrémé stérile dont 5 mL de la préculture du ferment correspondant au temps t = 4 h (à conserver dans la glace).

Pour chaque fiole d'Erlenmeyer « t = 0 » et « t = 4 h » :

- prélever 10 mL de lait (si le lait est caillé, bien vortexer pour pouvoir prélever correctement les 10 mL) ;
- ajouter 10 gouttes de phénolphthaléine ;
- verser la soude Dornic jusqu'à l'obtention d'une coloration rose persistant pendant une dizaine de secondes.

1.2.1.2. Résultats

Compléter la feuille de résultats biochimie (annexe 2).

Calculer la quantité d'acide lactique produit en 4h.

Donnée : acide lactique : $\text{CH}_3\text{-CHOH-COOH}$

1.2.2. Détermination de la quantité de ferment présent dans les fioles d'Erlenmeyer

Dans une manipulation préalable, l'absorbance d'une dilution au 1/20 de la préculture de ferment introduite dans les fioles d'Erlenmeyer a été mesurée à 600 nm.

On a trouvé : $A \text{ à } 600 \text{ nm} = 0,35$

Donnée : 1 unité d'absorbance à 600 nm correspond à $0,7 \text{ g.L}^{-1}$

Calculer la quantité de ferment présent dans les fioles d'Erlenmeyer.

1.2.3. Détermination de l'activité acidifiante du ferment

Calculer l'activité acidifiante du ferment exprimée en U.

Donnée : CV de la méthode = 1,5 %

2. DOSAGE DU CALCIUM DU LAIT

La teneur en calcium du lait est un critère déterminant la coagulation du lait.

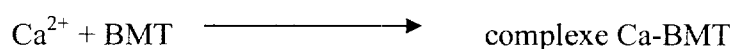
Cette teneur est de 1,05 à 1,40 g.kg⁻¹ de lait.

La masse volumique du lait écrémé utilisé est de 1,0369 kg.L⁻¹.

2.1. Principe

Le Ca-Kit permet le dosage colorimétrique du calcium.

L'ion calcium réagit en milieu alcalin avec l'indicateur bleu de méthylthymol (BMT) :



L'intensité de la coloration du complexe Ca-BMT mesurée à 612 nm est proportionnelle à la quantité de calcium présent dans l'échantillon.

L'hydroxy-8-quinoléine élimine l'interférence du magnésium.

2.2 Réactifs et matériel

2.2.1. Réactifs

Réactif 2 : bleu de méthylthymol à 0,092 mmol/L (en distributeur)
 hydroxy-8-quinoléine à 11 mmol/L

Réactif 3 : réactif pH 11 (en distributeur)

Le dosage est réalisé sur un minéralisat de lait qui a été obtenu selon le mode opératoire suivant : une prise d'essai E de 1 mL de lait a été minéralisée en milieu sulfo-nitrique. La totalité du minéralisat obtenu a été transférée dans une fiole jaugée U de 20 mL. La fiole jaugée est ajustée avec de l'eau désionisée. On obtient le minéralisat de lait « Lm ».

2.2.2. Matériel

4 tubes Eppendorf
8 semi-microcuvettes visibles
pipette automatique P1000
pipette automatique P20
1 flacon de solution de calcium à 0,100 g/L notée « Ca »
1 flacon de minéralisat de lait noté « Lm »

2.3. Mode opératoire

2.3.1. Préparation des solutions étalons de calcium.

Préparer en tubes Eppendorf, sous un volume de 1 mL, 5 solutions étalons de calcium de concentration de 0,02 à 0,10 g.L⁻¹. Le diluant utilisé est l'eau désionisée.

20 µL de chaque solution ainsi préparée dans des semi-microcuvettes selon le protocole en page suivante.

2.3.2. Réaction colorée (gamme d'étalonnage et essais)

Introduire en semi microcuvettes 20 µL de chaque solution étalon de 0,02 à 0,10 g.L⁻¹ ou 20 µL de minéralisé de lait « Lm » (deux essais).

Réaliser un blanc réactif (tube 6) avec 20 µL d'eau désionisée.

Ajouter 1 mL de réactif R2 puis 1 mL de réactif R3.

Mélanger et mesurer l'absorbance à 612 nm après 1 minute.

2.4. Résultats

Compléter le tableau de préparation des solutions étalons (Annexe 2).

Calculer la masse de calcium dans chaque cuve de la gamme d'étalonnage (en µg).

Effectuer la régression linéaire à la calculatrice et en donner les paramètres caractéristiques.

Calculer la quantité de calcium dans chaque essai.

Déterminer la concentration massique en calcium dans le minéralisé de lait « Lm ».

Déterminer la concentration massique en calcium dans le lait étudié puis la teneur en calcium de ce lait exprimée en g.kg⁻¹ de lait.

Conclure.

Donnée : CV de la méthode = 2%

Annexe 1

FEUILLE DE RÉSULTATS : MICROBIOLOGIE

A compléter et à rendre avec la copie

N° de poste du candidat :

À remplir avant :

Étude du contaminant bactérien

Observation microscopique :

Résultat du test enzymatique :

Orientation proposée (justifiée) :

Milieu(x) et galerie miniaturisée demandés :

Annexe 2

FEUILLE DE RÉSULTATS : BIOCHIMIE

A compléter et à rendre avec la copie

1. Activité acidifiante du ferment

1.1 Étalonnage de la soude Dornic :

	Masse pesée (g)	Veq (mL)
Essai 1		
Essai 2		

1.2 Détermination de l'activité acidifiante du ferment

	« t = 0 »	« t = 4 h »
volume de soude versé (mL)	$V_0 =$	$V_4 =$

2. Dosage du calcium du lait

➤ Préparation des solutions étalons :

Tube	1	2	3	4	5
volume de solution à $0,100 \text{ g.L}^{-1}$ (mL) de calcium					
volume d'eau désionisée (mL)					
concentration en calcium (g.L^{-1})	0,02	0,04	0,06	0,08	0,10

➤ Résultats de la colorimétrie :

Cuve	0	1	2	3	4	5	E1	E2
masse de calcium dans la cuve (μg)								
A à 612nm								

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

U52 – TECHNIQUES D'ANALYSE ET DE CONTRÔLE

Durée : 6 heures	Coefficient : 3
------------------	-----------------

DEUXIÈME JOUR

Durée : 1 heure 15

Ce sujet comporte 2 pages, numérotées de 1 à 2.
Assurez-vous qu'il est complet dès qu'il vous est remis.

CONTRÔLE D'UN JUS D'ORANGE

DEUXIÈME JOUR (1H15)

1. Dénombrement des levures

Numérer les colonies obtenues sur gélose Sabouraud.

Calculer la concentration en levures du jus d'orange en suivant les recommandations de la formule AFNOR citée ci-dessous :

$$N = \frac{\Sigma C}{V(n_1 + 0,1 n_2) d}$$

ΣC est la somme des colonies comptées sur toutes les boîtes retenues de deux dilutions successives dont au moins une contient au minimum 15 colonies et au maximum 300 ;

n_1 est le nombre de boîtes retenues à la première dilution ;

n_2 est le nombre de boîtes retenues à la deuxième dilution ;

d est la dilution correspondant à la première dilution retenue ;

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

Arrondir le résultat calculé à deux chiffres significatifs.

Retenir comme résultat un nombre compris de préférence entre 1,0 et 9,9 multiplié par la puissance appropriée de 10.

Comparer les résultats obtenus par numération en milieu solide avec ceux obtenus par comptage direct en hématimètre. Les résultats de votre comptage en hématimètre vous seront rappelés par un examinateur.

2. Identification des levures

Réaliser un état frais d'après l'isolement sur milieu RAT afin de détecter la présence éventuelle de pseudomycélium.

Lire la galerie Api et identifier la souche de levures.

BTS QUALITÉ DANS LES INDUSTRIES ALIMENTAIRES ET LES BIO-INDUSTRIES

Session 2006

U52 – TECHNIQUES D'ANALYSE ET DE CONTRÔLE

Contrôle d'un jus d'orange

MATIÈRE D'OEUVRE

Biochimie

1) Nitrites

Par élève :

10 mL de nitrite de sodium à 0,3g/L
20 mL de nitrite de sodium à 1mg/L noté « eau X »
20 mL de réactif phénol-sulfanilique
9 macrocuvettes + portoir
1 P5000 + cônes ou pipette graduée 5mL
1 P1000 + cônes
1 pipette plastique (ajustement dilution)
1 fiole 100 mL

Par laboratoire :

Ammoniaque (en distributeur 0,5 mL sous hotte) : 10 mL par élève
Spectrophotomètres

2) Brix

Par élève :

10 mL de jus d'orange non enrichi en vitamine C (mesurer son °B et donner aux élèves une fourchette de valeurs à +/- 0,5%)

Par laboratoire :

1 réfractomètre avec notice + réserve de pipettes plastique + papier Joseph + poubelle

3) Vitamine C

Par élève :

Les élèves utilisent le jus d'orange de 2)
3 cuvettes + portoir
1 P100 + cônes
1 P1000 + cônes
1 pipette jaugée 10 mL
1 fiole 100 mL
1 pipette graduée de 2 mL écoulement total
Parafilm.

Par laboratoire :

1 kit enzymatique pour environ 15 personnes. (Diffchamb : réf 1.002
réf 409 677)

1 étuve à 37°C

Papier alu pour couvrir les cuves qui doivent incuber à 37°C à l'obscurité (car
ouvertures répétées d'étuve)

Spectrophotomètres (visible)

Microbiologie :

1) Levures

Par élève :

1 hématimètre de Malassez

1 tube à hémolyse stérile

2 mL de bleu de méthylène

2 mL d'une suspension de *Saccharomyces cerevisiae* à 10^7 /mL notée Ld

1 isolement de *Saccharomyces cerevisiae* sur Sabouraud noté Li

1 Api 20Caux

1 gélose RAT

3 pipettes Pasteur

10 pipettes stériles 1 mL

6 boîtes pétri vides

100 mL de Sabouraud en surfusion

Par laboratoire :

Bains thermostatés

2) Moisissure

Par élève :

1 *Aspergillus* ou 1 *Penicillium* noté M

Scotch

2 lames

Pince

**BTS QUALITÉ DANS LES INDUSTRIES
ALIMENTAIRES ET LES BIO-INDUSTRIES
Session 2006**

U52 – TECHNIQUES D'ANALYSE ET DE CONTRÔLE

Contrôle d'un jus d'orange

Barème

Biochimie : 30

1) Dosage des nitrites : 14

Calcul préliminaire : 2

Manipulation :

Gamme étalon : 3

Essais : 5

Régression linéaire : 1

Concentration massique : 2

Conclusion : 1

2) Brix : 5

Manipulation : 3

Brix moyen : 1

Conclusion : 1

3) Dosage de la vitamine C : 11

Manipulation : 7

Concentration molaire : 2

Concentration massique : 1

Conclusion : 1

Microbiologie : 30

1) Levures : 25

Manipulation Malassez : 3

Calcul concentration en levures : 2

Choix justifié dilutions : 2

Technique dénombrement en milieu solide : 6

Calcul dénombrement milieu solide : 2

Résultat/attendu : 1

Comparaison 2 techniques : 1

Réalisation galerie Api : 2

Qualité isolement RAT : 3

Etat frais : 2

Résultat identification : 1

2) Moisissure : 5

3)

Qualité examen microscopique : 2

Schéma annoté : 2

Conclusion identification : 1

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

U52 – TECHNIQUES D'ANALYSE ET DE CONTRÔLE

Durée : 6 heures	Coefficient : 3
------------------	-----------------

DEUXIEME JOUR

Durée : 1 heure 30

Ce sujet comporte 4 pages, numérotées de 1 à 4.
Assurez-vous qu'il est complet dès qu'il vous est remis.

CONTRÔLES DE QUALITÉ DANS LES INDUSTRIES FROMAGÈRES

DEUXIÈME JOUR : 1h30

1. CONTRÔLE DES MATIÈRES PREMIÈRES

1.1. Dénombrement de la flore aérobique mésophile

Dénombrer les colonies.

Présenter les résultats dans un tableau.

Calculer le nombre de microorganismes aérobies mésophiles présents selon la formule recommandée par la norme AFNOR :

$$N = \frac{\Sigma C}{V(n_1 + 0,1 n_2) d}$$

ΣC est la somme des colonies comptées sur toutes les boîtes retenues de deux dilutions successives dont au moins une contient au minimum 15 colonies et au maximum 300 ;

n_1 est le nombre de boîtes retenues à la première dilution ;

n_2 est le nombre de boîtes retenues à la deuxième dilution ;

d est la dilution correspondant à la première dilution retenue ;

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

Arrondir le résultat calculé à deux chiffres significatifs.

Retenir comme résultat un nombre compris de préférence entre 1,0 et 9,9 multiplié par la puissance appropriée de 10.

Conclure.

Donnée : flore totale $< 10^5$ microorganismes aérobies mésophiles /mL

1.2 Recherche d'antibiotique

Mesurer les diamètres d'inhibition (en mm).

Conclure.

2. CONTRÔLES EN COURS DE FABRICATION

Effectuer la lecture de la galerie d'identification.

Identifier le contaminant à l'aide des tableaux fournis, du code API ou du logiciel.

3. CONTRÔLES DU PRODUIT FINI

Lors des contrôles, une moisissure contaminante a été retrouvée sur la croûte des fromages. Cette moisissure est présentée sur milieu gélosé noté « M ».

Réaliser l'observation macroscopique.

Réaliser l'observation microscopique et montrer la préparation à un examinateur en même temps que le compte rendu correspondant.

Proposer une identification jusqu'au genre à l'aide du document fourni en annexe.

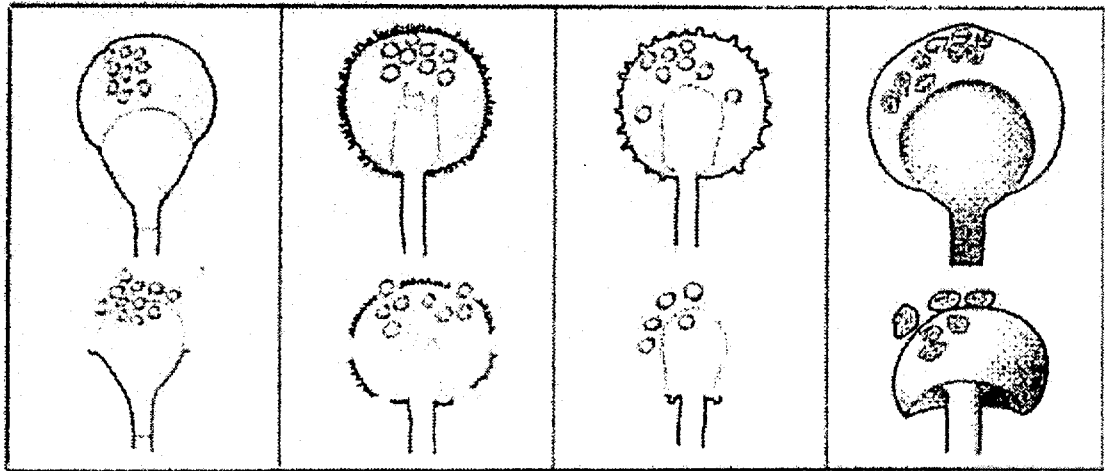
Matériel : Flacon de bleu coton.

Rouleau de ruban adhésif transparent.

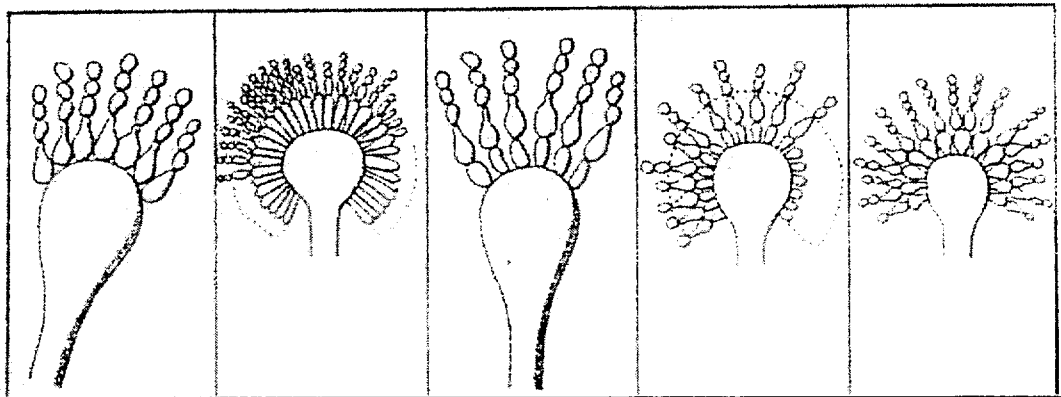
ANNEXE

DOCUMENT D'IDENTIFICATION DES MOISSURES

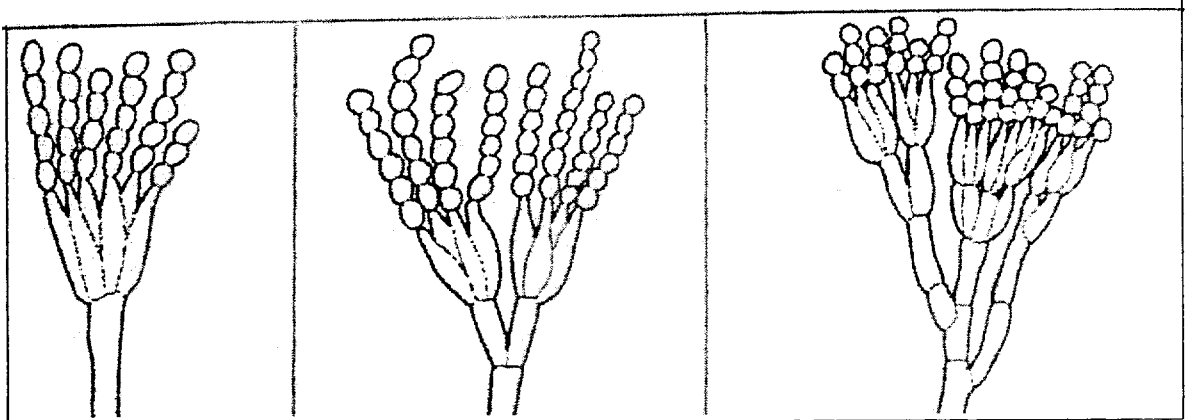
Aspect microscopique de différentes mucorales :



Aspect microscopique de différents *Aspergillus* :



Aspect microscopique de différents *Penicillium* :



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

U52 – TECHNIQUES D'ANALYSE ET DE CONTRÔLE

Durée : 6 heures	Coefficient : 3
------------------	-----------------

DEUXIEME JOUR

Durée : 1 heure 30

Ce sujet comporte 4 pages, numérotées de 1 à 4.
Assurez-vous qu'il est complet dès qu'il vous est remis.

CONTRÔLES DE QUALITÉ DANS LES INDUSTRIES FROMAGÈRES

DEUXIÈME JOUR : 1h30

1. CONTRÔLE DES MATIÈRES PREMIÈRES

1.1. Dénombrement de la flore aérobique mésophile

Dénombrer les colonies.

Présenter les résultats dans un tableau.

Calculer le nombre de microorganismes aérobies mésophiles présents selon la formule recommandée par la norme AFNOR :

$$N = \frac{\Sigma C}{V(n_1 + 0,1 n_2) d}$$

ΣC est la somme des colonies comptées sur toutes les boîtes retenues de deux dilutions successives dont au moins une contient au minimum 15 colonies et au maximum 300 ;

n_1 est le nombre de boîtes retenues à la première dilution ;

n_2 est le nombre de boîtes retenues à la deuxième dilution ;

d est la dilution correspondant à la première dilution retenue ;

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

Arrondir le résultat calculé à deux chiffres significatifs.

Retenir comme résultat un nombre compris de préférence entre 1,0 et 9,9 multiplié par la puissance appropriée de 10.

Conclure.

Donnée : flore totale $< 10^5$ microorganismes aérobies mésophiles /mL

1.2 Recherche d'antibiotique

Mesurer les diamètres d'inhibition (en mm).

Conclure.

2. CONTRÔLES EN COURS DE FABRICATION

Effectuer la lecture de la galerie d'identification.

Identifier le contaminant à l'aide des tableaux fournis, du code API ou du logiciel.

3. CONTRÔLES DU PRODUIT FINI

Lors des contrôles, une moisissure contaminante a été retrouvée sur la croûte des fromages. Cette moisissure est présentée sur milieu gélosé noté « M ».

Réaliser l'observation macroscopique.

Réaliser l'observation microscopique et montrer la préparation à un examinateur en même temps que le compte rendu correspondant.

Proposer une identification jusqu'au genre à l'aide du document fourni en annexe.

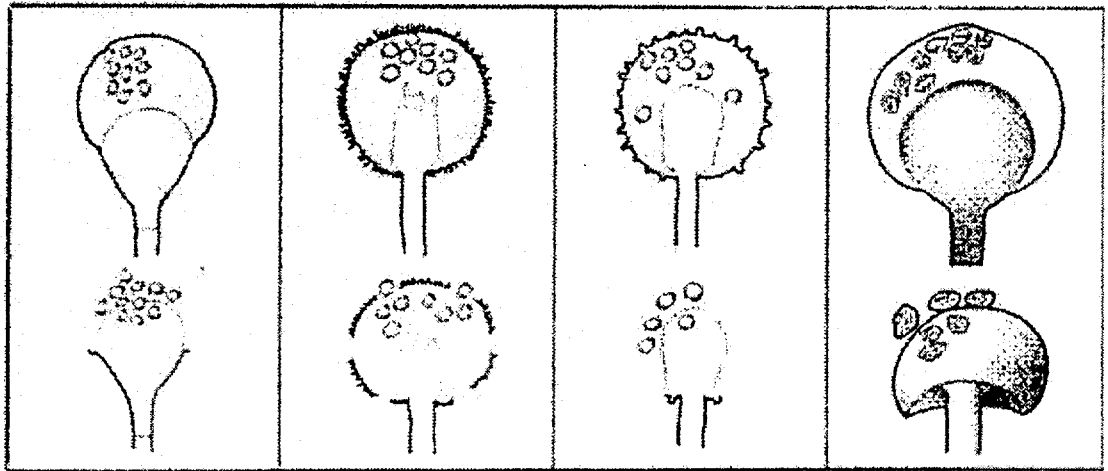
Matériel : Flacon de bleu coton.

Rouleau de ruban adhésif transparent.

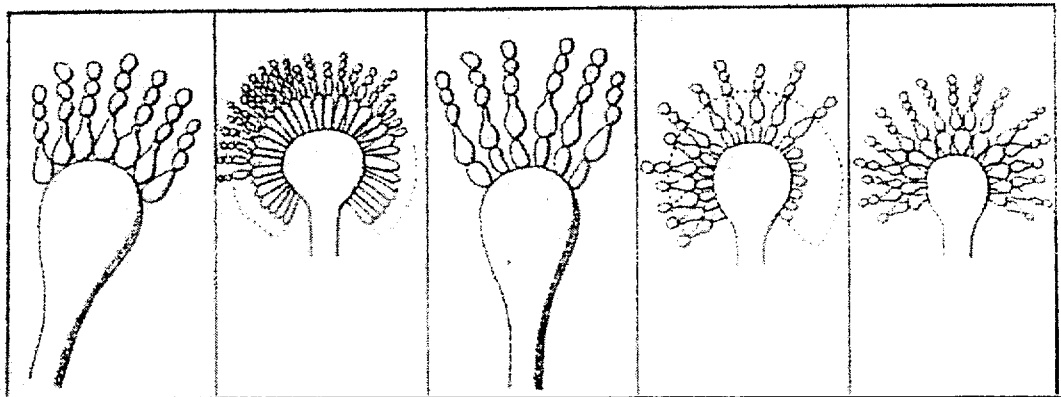
ANNEXE

DOCUMENT D'IDENTIFICATION DES MOISSURES

Aspect microscopique de différentes mucorales :



Aspect microscopique de différents *Aspergillus* :



Aspect microscopique de différents *Penicillium* :

