

CONTRÔLES RÉALISÉS SUR UN PRODUIT DE PÂTISSERIE

Premier jour (5 heures)

Plusieurs contrôles sont réalisés sur un produit de pâtisserie à différentes étapes de son élaboration.

1. CONTRÔLES MICROBIOLOGIQUES (25 points)

La qualité microbiologique des produits de pâtisserie repose sur la maîtrise des contaminations primaires et secondaires et sur la prévention du développement des contaminants lors de la fabrication et du stockage des produits finis. Les produits à base de crème bénéficient d'une surveillance particulière.

1.1. Contrôles du produit fini

Afin de garantir la qualité sanitaire de leurs produits, les professionnels ont mis en place une série de critères d'hygiène des procédés internes aux entreprises. Le tableau ci-dessous présente un exemple de critères microbiologiques des pâtisseries et crèmes pâtisseries au stade de la distribution.

DÉSIGNATION	CRITÈRES (par gramme de produit)
Microorganismes totaux cultivant à 30°C	$3 \cdot 10^5$
Coliformes totaux	10^4
Coliformes thermotolérants	1
<i>Staphylococcus coagulase+</i>	10^2
<i>Salmonella</i>	Absence dans 25 g
Anaérobies sulfitoréducteurs à 46°C	10

Le dénombrement des coliformes totaux est réalisé dans un éclair au café prélevé dans la vitrine d'un point de distribution.

1.1.1.1. Matériel

- 1 sachet contenant l'éclair au café, noté « P + n° de poste »
- 1 flacon d'eau peptonée tamponnée stérile (150 mL)
- 1 tube de suspension mère, noté « SM + n° de poste » ?
- 3 tubes contenant exactement 9 mL d'eau peptonée tamponnée
- 6 tubes de 16 mL de gélose VRBL en surfusion
- 6 tubes de 4 mL de gélose VRBL en surfusion
- 6 boîtes de Pétri vides et stériles
- 6 pipettes de 1 mL à usage unique ou pipeteur automatique et embouts stériles
- 1 agitateur mécanique
- 1 homogénéisateur type Stomacher et un portoir pour sachet (à disposition dans la salle)
- 1 balance, 2 spatules et 1 sachet stérile avec une barrette de fermeture (sous le PSM)

1.1.1.2. Protocole

Préparation de la suspension mère

- Peser 10g environ de pâtisserie dans le sachet stérile.
- Ajouter la masse d'eau peptonée tamponnée nécessaire pour obtenir une dilution au 1/10^{ème} du produit.
- Fermer le sachet.
- Homogénéiser avec un appareil type Stomacher.

Montrer la réalisation de cette manipulation à un examinateur.

Réalisation des dilutions et ensemencements

Afin de faciliter la manipulation, une suspension mère identique a été réalisée par les techniciens.

Elle est répartie en tube et est notée « SM + n° de poste ».

À partir de cette suspension mère, réaliser le dénombrement des coliformes totaux sur gélose VRBL.

- Nombre de dilutions successives testées : 3
- Nombre d'essai par dilution : 2
- Volume d'inoculum : 1 mL
- Mode d'ensemencement : ensemencement en double couche

Montrer la réalisation de cette manipulation à un examinateur.

1.1.3. Compte-rendu

Justifier le choix des dilutions.

Préciser les conditions d'incubation.

Décrire et justifier l'aspect attendu des colonies de coliformes sur milieu VRBL ; sa composition est donnée en annexe 1 .

1.2. Contrôle de l'hygiène sur le point de vente

1.2.1. Propreté des vitrines de présentation

Une moisissure a été isolée lors d'un contrôle de surface, repiquée sur gélose Sabouraud+Chloramphénicol à disposition sur la paillasse (notée « V + n° de poste »).

- Réaliser les examens microscopique et macroscopique de cette moisissure.
- Identifier la moisissure, à l'aide de l'annexe 2 et conclure.
- Montrer un champ microscopique caractéristique à l'examinateur et le schéma légendé de l'observation.

1.2.2. Hygiène des opérateurs

Une souche isolée lors d'un contrôle sur les mains d'un opérateur est fournie sur gélose nutritive (notée « O + n° de poste »).

- Réaliser l'examen microscopique.
- Réaliser le test enzymatique adapté.

Montrer l'observation microscopique et la réalisation du test enzymatique.

- Compléter l'annexe A ; proposer une orientation du diagnostic de cette souche et une galerie d'identification. Cette annexe est à rendre 30 minutes avant la fin de l'épreuve.
- Poursuivre l'identification en ensemençant la galerie d'identification distribuée 30 minutes avant la fin de l'épreuve.

2. CONTRÔLES IMMUNOLOGIQUES (10 points)

Comme tous les produits alimentaires, la qualité des produits finis de pâtisserie dépend en partie de la qualité des matières premières.

La farine utilisée pour la réalisation des pâtes à choux par exemple est soumise à plusieurs contrôles : pureté, humidité, détection de la présence de mycotoxines.

L'ochratoxine A (OTA) est une mycotoxine néphrotoxique, produite par plusieurs espèces de champignons des genres *Aspergillus* et *Penicillium*, qui se développent en particulier sur les denrées alimentaires au cours de leur stockage.

La détection de l'ochratoxine A dans deux farines est réalisée par la technique d'Ouchterlony.

2.1. Matériel à disposition

- 1 gel d'agarose en petite boîte de Pétri
- Tube Eppendorf contenant une solution d'anticorps anti-ochratoxine noté « anti-OC »
- Tube Eppendorf contenant une solution d'ochratoxine A noté « OC »

- Tube Eppendorf contenant un échantillon de farine à tester noté « FAR1 »
- Tube Eppendorf contenant un échantillon de farine à tester noté « FAR2 »
- Tube Eppendorf contenant de l'eau distillée noté « H₂O »
- 1 pipette automatique (P50) et les cônes adaptés stériles
- 1 emporte pièce
- 1 gabarit de perçage des trous présenté en annexe B
- 1 chambre humide

2.2. Mode opératoire

Réaliser 5 puits dans la gélose à l'aide de l'emporte-pièce et du gabarit donné en annexe B. Déposer 10 µL de chaque solution par puits en choisissant une disposition judicieuse des dépôts. Incuber le gel en atmosphère humide à 30°C pendant 24 heures.

2.3. Compte rendu

Rendre compte de l'ordre des dépôts à l'aide de l'annexe B et la remettre avec la copie.

Donner l'intérêt du puits contenant l'ochratoxine.

Donner l'intérêt du puits contenant l'eau distillée.

3. CONTRÔLES BIOCHIMIQUES (25 points)

La fabrication d'éclairs au café correspond à l'assemblage :

- d'une pâte à choux pour éclairs (ingrédients : eau, margarine, sel, farine de blé et œufs liquides) ;
- d'une crème de garniture des éclairs (ingrédients : poudre crème pâtissière, eau, crème fraîche, poudre de café, sucre) ;
- d'un fondant pour le glaçage des éclairs (ingrédients : nappage blond, sirop de glucose, pâte à glacer au café et oxyde de titane).

Cette fabrication utilise comme matières premières de la farine de blé, de la crème fraîche et du sirop de glucose dont les caractéristiques biochimiques sont contrôlées régulièrement par le laboratoire qualité de l'entreprise.

3.1. Dosage du gluten de la farine

Parmi les protéines de la farine, le gluten a une influence déterminante sur les propriétés technologiques de la pâte ; il est en effet responsable de son extensibilité et de son élasticité.

Le gluten de la farine entrant dans la composition de la pâte à choux est dosé par la méthode de Gornall.

3.1.1. Mode opératoire

Réalisation des essais :

Dans un tube, introduire :

- extrait de gluten : 1 mL,
- réactif de Gornall : 4 mL.

Agiter. Laisser reposer 30 minutes à l'obscurité et à température ambiante.

La coloration est stable plusieurs heures.

Lire au spectrophotomètre à 540 nm contre un témoin réactif.

Réaliser deux essais concordants.

Réalisation de la gamme d'étalonnage :

Une solution de protéines étalon à 10 g/L est fournie.

Préparer une gamme d'étalonnage de 6 tubes contenant de 0 à 10 mg/mL de protéines avant addition du réactif de Gornall.

3.1.2. Compte rendu

Réaliser un tableau de colorimétrie détaillant la composition de tous les tubes.

Compléter la feuille de résultats donnée en Annexe C.

Traiter les résultats par l'outil informatique et donner les paramètres de régression linéaire.

Déterminer la concentration massique en gluten de l'extrait, exprimée en g/L.

Procéder à la validation des résultats.

Données :

- $sr = 0,30$ g/L
- $uc = 0,03$ g/L
- Annexe 3 : validation et expression d'un résultat

En déduire le pourcentage de gluten par rapport aux protéines totales de cette farine, sachant que le dosage des protéines totales a donné sur le même extrait et dans les mêmes conditions une concentration massique de 5,40 g/L.

Conclure sur la qualité de cette farine sachant que la teneur usuelle en gluten d'une farine est de 85% des protéines totales.

3.2. Détermination de l'acidité de la crème

La crème est obtenue par fermentation du lait et contient de l'acide lactique.

Le dosage de l'acidité de la crème utilise la soude Dornic. La soude Dornic est une solution d'hydroxyde de sodium à $1/9^{\text{ème}}$ mol/L.

3.2.1. Mode opératoire

- Dans un bécher, introduire 10 g de crème, puis noter exactement sa masse m_c .
- Ajouter 3 gouttes de phénolphaléine.
- Introduire un barreau aimanté dans le bêcher et placer sous agitation douce.
- Titrer par la solution de soude Dornic étalonnée (concentration exacte fournie par le centre) jusqu'au virage au rosé.
- L'équivalence est atteinte lorsque la coloration rosée persiste pendant une dizaine de secondes.
- Réaliser deux essais concordants.
- Appeler un examinateur pour la lecture des chutes de burette.

3.2.2. Compte rendu

- Compléter la feuille de résultats (annexe C).
- Établir la formule littérale de l'acidité titrable.
- Calculer l'acidité titrable de la crème exprimée en g/100g.
- Procéder à la validation des résultats.
- Comparer votre résultat à la norme ci-dessous et conclure.

Données :

- Concentration de la soude fournie par le centre : C_{NaOH} en mol/L
- Masse molaire de l'acide lactique : $M_{\text{acide lactique}} = 90$ g/mol
- Masse de la prise d'essai : m_c :
- Teneur en matière grasse : $MG = 30\%$
- Chute de burette : V
- $sr = 7 \cdot 10^{-4}$ g/100g
- $uc = 0,01$ g/100g
- Annexe 3 : validation et expression d'un résultat
- Norme (*critère NDLR*) des crèmes pasteurisées : acidité de la crème exprimée en grammes d'acide lactique pour 100 g de partie non grasse inférieure à 2,5 %

3.3. Contrôle à réception du degré Brix d'un sirop de glucose

Le degré Brix d'un sirop de glucose est contrôlé par réfractométrie.

3.3.1. Mode opératoire

L'échantillon noté « sirop de glucose » a déjà été dilué au 1/2.

Homogénéiser l'échantillon à l'aide d'une baguette de verre.

Relever la température de l'échantillon à l'aide d'un thermomètre de précision.

Effectuer une mesure sur le réfractomètre.

Réaliser la mesure devant un examinateur.

3.3.2. Compte rendu

Compléter la feuille de résultats (annexe C).

Corriger la valeur mesurée pour se ramener à 20°C à l'aide de la table de correction du réfractomètre (annexe 4).

Comparer votre résultat aux données fournies dans la fiche technique du produit expédié par le fournisseur (annexe 5).

Conclure.

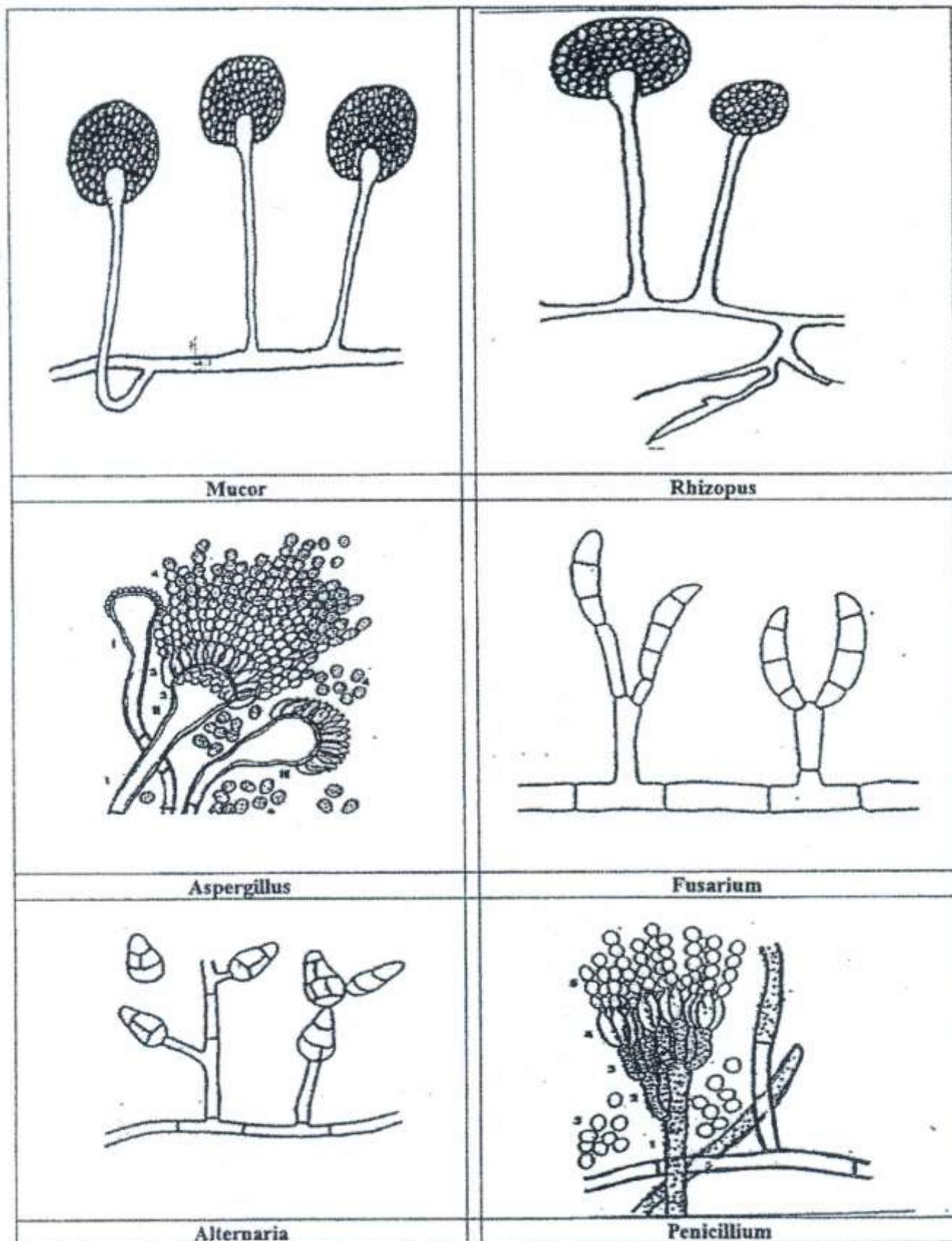
ANNEXE 1 : Composition du milieu VRBL

Ce milieu est utilisé pour le dénombrement des coliformes.

Composants	Concentration en g/L
Peptone	7,0
Extrait de viande	3,0
Lactose	10,0
Désoxycholate de sodium	1,5
Cristal violet	0,002
Rouge neutre	0,03
Chlorure de sodium	5,0
Agar	15,0
pH = 6,8	

ANNEXE 2

Schémas d'organes de fructification de moisissures



ANNEXE 3

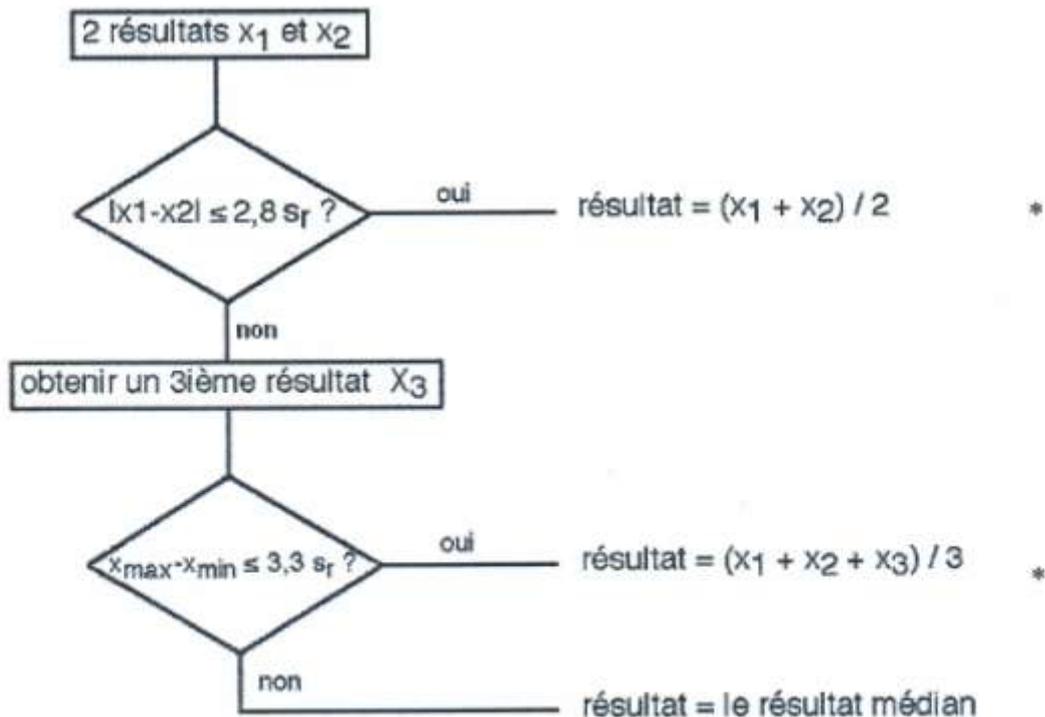
Établissement Centre d'examen	INSTRUCTION DE TRAVAIL	RÉF :
	VALIDATION ET EXPRESSION D'UN RÉSULTAT	Version : 3.1 Date : session 2011 Révisée le : 7/12/2010 page 1/2
Rédacteurs : membres de la commission de sujets Date : session 2011 Visa :	Vérificateur Approbateur : inspection générale Date : session 2011 Visa :	

1 - Vérification de l'acceptabilité entre résultats expérimentaux

- Utiliser l'écart type de répétabilité « s_r » donné avec l'unité de la grandeur.
- Calculer l'écart-type de répétabilité « s_r » si le texte donne le coefficient de variation « CV » au moyen de la relation : **$s_r = CV \times \text{valeur}$** .
On entend par « valeur » soit celle approximative proposée dans le texte, soit l'un des résultats trouvés.
Arrondir l'écart-type de répétabilité avec 2 chiffres significatifs.

Exemple : CV = 1,2 % ; résultat : $c_m = 0,723 \text{ g/L}$; $s_r = (1,2/100) \times 0,723 = 0,0087 \text{ g/L}$

- Traiter les résultats en utilisant le logigramme ci-dessous sans arrondir les valeurs des calculs intermédiaires.



* L'acceptabilité peut être réalisée à l'aide du s_r fourni dans l'énoncé :
 - soit sur les valeurs expérimentales (absorbances, volumes...),
 - soit sur les résultats finaux (concentration, teneur...).

Établissement	INSTRUCTION DE TRAVAIL	RÉF :
Centre d'examen	VALIDATION ET EXPRESSION D'UN RÉSULTAT	Version : 3.1 Date : session 2011 Révisée le : 7/12/2010 page 2/2
Rédacteurs : membres de la commission de sujets Date : session 2011 Visa :	Vérificateur Approbateur : inspection générale Date : session 2011 Visa :	

2 - Expression finale du résultat

L'expression du résultat nécessite de disposer de l'incertitude type composée notée « u_c » qui est soit donnée avec l'unité de la grandeur, soit sous forme de CV.

Exemple 1 : $n = 0,3457 \mu\text{mol}$; $u_c = 0,018 \mu\text{mol}$

Exemple 2 : $c = 0,1257 \text{ mol/L}$ avec $\text{CV} = 1,2\%$ (0,012)
calcul : $u_c = 0,1257 \times 0,012 = 0,0015 \text{ mol/L}$

- Calculer l'incertitude élargie en multipliant par 2 l'incertitude type composée, ce qui donne un niveau de confiance de 95 %.

Incertitude élargie : $U = 2 u_c$

- Arrondir le résultat final :

- Le dernier chiffre significatif doit être à la même position que le dernier chiffre de l'incertitude élargie.
- Les règles usuelles mathématiques d'arrondi s'appliquent. Si le dernier chiffre est inférieur à 5, on conserve le chiffre immédiatement à gauche, sinon on le majore d'une unité.

Exemple 1 : résultat acceptable : $c = 0,24319 \text{ mmol/L}$; $2u_c = 0,0051 \text{ mmol/L}$
→ rendre le résultat sous la forme : $c = (0,2432 \pm 0,0051) \text{ mmol/L}$

Exemple 2 : résultat acceptable : $c = 0,24314 \text{ mmol/L}$; $2u_c = 0,0051 \text{ mmol/L}$
→ rendre le résultat sous la forme : $c = (0,2431 \pm 0,0051) \text{ mmol/L}$

- Rendre le résultat final avec sa valeur numérique, son incertitude, son unité et accompagné de :

- soit la phrase suivante : « L'incertitude proposée est une incertitude élargie par un facteur d'élargissement de 2 qui donne un niveau de confiance d'environ 95 % » ;
- soit la notation : $k = 2$, notation qui remplace la phrase ci-dessus.

Exemple :

$c = (0,2431 \pm 0,0051) \text{ mol/L}$; l'incertitude proposée est une incertitude élargie par un facteur d'élargissement de 2 qui donne un niveau de confiance d'environ 95 %.

ou

$c = (0,2431 \pm 0,0051) \text{ mol/L}$ avec $k = 2$

ANNEXE 4 :

Corrections à effectuer pour des températures différentes de 20°C

On considère que la température de l'échantillon est la même que celle de l'appareil (la température du film de liquide placé entre le prisme et le volet atteint très rapidement la température de l'appareil). Cet appareil est réglé pour être utilisé à une température ambiante de 20°C. S'il est utilisé à des températures différentes, il faut soit additionner, soit retrancher une valeur à celle lue en se référant à l'abaque ci-joint.

Exemple pour une température de 30°C: supposons que la valeur lue sur l'appareil est de 15% en se référant à l'abaque on observe qu'il faut ajouter 0,78%. La concentration théorique du liquide mesuré est donc : 15 + 0,78 soit 15,78%.

Exemple pour une température à 12°C : opérer comme précédemment (toujours en supposant une lecture à 15%) mais dans ce cas retrancher 0,50% à la valeur lue. La concentration théorique est donc : 15 - 0,5% soit 14,5%.

		Concentration (%)															
		0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	
T E M P É R A T U R E	à r e t r a n c h e r	10	0.50	0.54	0.58	0.61	0.64	0.66	0.68	0.70	0.72	0.73	0.74	0.75	0.76	0.78	0.79
		11	0.46	0.46	0.53	0.55	0.58	0.60	0.62	0.64	0.65	0.66	0.67	0.68	0.69	0.70	0.71
		12	0.42	0.45	0.48	0.50	0.52	0.54	0.56	0.57	0.58	0.59	0.60	0.61	0.61	0.63	0.63
		13	0.37	0.40	0.42	0.44	0.46	0.48	0.49	0.50	0.51	0.52	0.53	0.54	0.54	0.55	0.55
		14	0.33	0.35	0.37	0.39	0.40	0.41	0.42	0.43	0.44	0.45	0.45	0.46	0.46	0.47	0.48
		15	0.27	0.29	0.31	0.33	0.34	0.34	0.35	0.36	0.37	0.37	0.38	0.39	0.39	0.40	0.40
		16	0.22	0.24	0.25	0.26	0.27	0.28	0.28	0.29	0.30	0.30	0.30	0.31	0.31	0.32	0.32
		17	0.17	0.18	0.19	0.20	0.21	0.21	0.21	0.22	0.22	0.23	0.23	0.23	0.23	0.24	0.24
		18	0.12	0.13	0.13	0.14	0.14	0.14	0.14	0.15	0.15	0.15	0.15	0.16	0.16	0.16	0.16
		19	0.06	0.06	0.06	0.07	0.07	0.07	0.07	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08
		20		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	à a j o u t e r	21	0.06	0.07	0.07	0.07	0.07	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	
		22	0.13	0.13	0.14	0.14	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	
		23	0.19	0.20	0.21	0.22	0.22	0.23	0.23	0.23	0.23	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24	
		24	0.26	0.27	0.28	0.29	0.30	0.30	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.32	0.32	0.32	
		25	0.33	0.35	0.36	0.37	0.38	0.38	0.39	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	
		26	0.40	0.42	0.43	0.44	0.45	0.46	0.47	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48	
		27	0.48	0.50	0.52	0.53	0.54	0.55	0.55	0.56	0.56	0.56	0.56	0.56	0.56	0.56	
		28	0.56	0.57	0.60	0.61	0.62	0.63	0.63	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64	
		29	0.64	0.66	0.68	0.69	0.71	0.72	0.72	0.73	0.73	0.73	0.73	0.73	0.73	0.73	
		30	0.73	0.74	0.77	0.78	0.79	0.80	0.80	0.81	0.81	0.81	0.81	0.81	0.81	0.81	

ANNEXE 5

ROCLYS A3879S

Définition :

SIROP DE GLUCOSE

Solution aqueuse purifiée et concentrée de saccharides nutritifs, obtenue par hydrolyse de l'amidon

Spécifications :

* PHYSICO – CHIMIQUES

Aspect	liquide sirupeux, incolore à jaunâtre
Goût	sucré
Odeur	neutre
Lecture réfractométrique à 20°C	80,8 à 81,8 Degrés Brix
Indice de réfraction à 20°	1,4928 – 1,4954
Extrait sec	78,6 – 79,5%

VALEURS INDICATIVES :

Composition hydrocarbonée MCL 190 A

GLUCOSE	15% env.
DISACCHARIDES	12% env.
POLYSACCHARIDES SUPÉRIEURS	73% env.

ANNEXE A

N° de poste :

Nom :

ANNEXE A
À COMPLETER ET À RENDRE AVEC LA COPIE
ORIENTATION DU DIAGNOSTIC (Souche O)

Observation macroscopique :

Observation microscopique :

Test complémentaire :

Nom du test :

Réactif nécessaire :

Résultat :

Proposition d'orientation :

Demande de galerie miniaturisée :

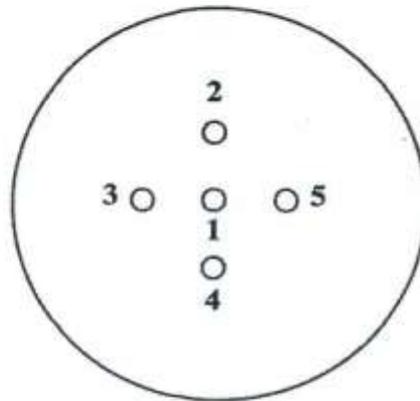
ANNEXE B

N° de poste :

Nom :

ANNEXE B
À COMPLETER ET À RENDRE AVEC LA COPIE
FEUILLE DE RÉSULTATS IMMUNOLOGIE

Gabarit :



Nature des dépôts :

1:

2:

3:

4:

5:

ANNEXE C

N° de poste :

Nom :

ANNEXE C À COMPLÉTER ET À RENDRE AVEC LA COPIE

1. Dosage du gluten de la farine

N° tubes	0	1	2	3	4	5	E1	E2
A à 540 nm								

2. Détermination de l'acidité de la crème

Masse pesée n°1=

Ve_{q1} =

Masse pesée n°2=

Ve_{q2} =

3. Contrôle du degré Brix

Température mesurée :

Température arrondie au nombre entier :

Indice de réfraction :

Deuxième jour (1 heure)

1. CONTRÔLES MICROBIOLOGIQUES

1.1. Contrôles du produit fini

Déterminer le nombre de coliformes totaux par g d'éclair au café.

Exprimer ce résultat en se référant aux données de l'annexe : Extrait de la norme NF ISO 7218/A1 décembre 2001.

Discuter le résultat obtenu et la conduite à adopter par l'entreprise.

Rappel des critères microbiologiques d'hygiène des procédés internes établis par l'entreprise X pour les produits de pâtisserie :

DÉSIGNATION	CRITÈRES (par gramme de produit)
Microorganismes totaux cultivant à 30°C	$3 \cdot 10^9$
Coliformes totaux	10^4
Coliformes thermotolérants	1
<i>Staphylococcus coagulase+</i>	10^2
<i>Salmonella</i>	Absence dans 25 g
Anaérobies Sulfite Réducteurs à 46°C	10

1.2. Contrôle de l'hygiène sur le point de vente

Procéder à l'identification de la souche isolée, à partir d'un prélèvement sur les mains d'un opérateur. Conclure.

2. CONTRÔLES IMMUNOLOGIQUES

Les farines utilisées en pâtisserie doivent être exemptes d'ochratoxine A.

En utilisant les données de l'annexe B du jour 1, décrire les résultats obtenus après incubation et les interpréter.

ANNEXE : Extrait de la norme NF ISO 7218/A1 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 une boîte contenant au minimum 15 colonies.

Calculer ensuite 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 :

$N = \frac{\sum c}{v \cdot (n_1 + 0,1 \cdot n_2) \cdot d}$	Où $\sum c$ est la somme des colonies comptées sur toutes les boîtes retenues de deux dilutions successives et dont au moins une contient au minimum 15 colonies ; v est le volume de l'inoculum appliqué à chaque boîte, en millilitre ; 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 le taux de dilution correspondant à la première dilution retenue.
--	--

Arrondir le résultat à deux chiffres significatifs.

Si le 3^{ème} chiffre est inférieur à 5, le précédent n'est pas modifié ; sinon, il est augmenté d'une unité.

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

Exprimer le résultat comme suit : Nombre N de microorganismes par millilitre (produits liquides) ou par gramme (autres produits)

Mode de calcul : Estimation des petits nombres : Cas de deux boîtes contenant moins de 15 colonies

Si les deux boîtes, au niveau de l'échantillon pour essai (produits liquides) ou de la suspension mère (produits solides) ou de la première dilution ensemencée ou retenue, contiennent moins de 15 colonies, **calculer le nombre NE 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 :

$N_E = \frac{\sum c}{v \cdot n \cdot d}$	Où $\sum c$ est la somme des colonies comptées sur les deux boîtes ; v est le volume de l'inoculum appliqué à chaque boîte, en millilitre ; n est le nombre de boîtes retenues ; d est le taux de dilution de la dilution retenue.
--	--

Arrondir le résultat et l'exprimer comme précédemment.

Durée : 6 heures Coefficient : 3

ÉTUDE D'UNE BOISSON ÉNERGÉTIQUE

Premier jour (5 heures)

Une entreprise fabriquant des boissons énergétiques constate un défaut de goût sur l'un de ses produits.

La boisson énergétique en cause contient entre autres de l'eau, du fructose et de la tartrazine.

L'entreprise entreprend différents contrôles biochimiques et microbiologiques afin d'identifier la ou les cause(s) de ce défaut et de mettre en place les actions correctives nécessaires.

1. DOSAGE SPECTROPHOTOMÉTRIQUE DE LA TARTRAZINE (12 pts)

La tartrazine est un colorant jaune (E102) dont la teneur dans la boisson ne doit pas excéder 15 mg.L^{-1} car il peut être source d'amertume.

1.1. Principe

La tartrazine présente un pic d'absorbance situé entre 350 et 450 nm.

1.2. Matériel et réactifs

1.2.1. Matériel

- Spectrophotomètre UV-Visible ;
- Cuves jetables de spectrophotométrie ;
- Pipettes de 2 mL

1.2.2. Réactifs

- Solution de tartrazine à 25 mg.L^{-1} notée « tartrazine 25 mg.L^{-1} »
- Boisson énergétique défectueuse notée « boisson B »
- Eau désionisée

1.3. Mode opératoire

1.3.1. Détermination de la longueur d'onde du pic d'absorbance

Effectuer sur la solution de tartrazine un spectre d'absorbance entre 350 et 450 nm.

1.3.2. Préparation des solutions étalons

Préparer directement en cuve 6 solutions étalon à 0, 5, 10, 15, 20 et 25 mg.L^{-1} sous un volume final de 2,5 mL. Le diluant est de l'eau désionisée.

1.3.3. Lecture d'absorbance

Effectuer une lecture des absorbances de la gamme étalon et de la boisson énergétique défectueuse sans dilution préalable à la longueur d'onde adéquate ; 2 essais compatibles seront effectués.

1.4. Résultats et compte-rendu

Justifier le choix de la longueur d'onde pour la lecture d'absorbance.

Construire le tableau de colorimétrie.

Détailler la préparation d'une cuve de la gamme.

Réaliser au moyen de l'outil informatique la courbe de l'absorbance en fonction de la concentration en tartrazine.

Donner les paramètres de la régression linéaire.

Calculer la concentration en tartrazine des essais.

Vérifier la concordance des résultats.

En déduire la teneur moyenne en mg.L^{-1} de tartrazine de la boisson défectueuse.

Conclure sur la conformité de la boisson.

Données :

	Concentration en tartrazine (mg.L^{-1})
Sr	0,05
Uc	0,1

Annexe 1 : validation et expression d'un résultat : voir TP A

2. DÉTERMINATION du TITRE HYDROTIMÉTRIQUE de L'EAU (18 pts)

Le service qualité soupçonne une interaction entre les arômes et l'eau utilisée pour la fabrication de la boisson. En effet, des interférences peuvent apparaître entre les arômes et les minéraux comme le calcium et le magnésium.

La dureté de l'eau, due aux ions Ca^{2+} et Mg^{2+} , s'évalue par la détermination du titre hydrotimétrique (TH) qui s'exprime en °f en France.

L'eau est satisfaisante si son TH est inférieur ou égal à 15°f.

2.1. Principe

La détermination du titre hydrotimétrique de l'eau s'effectue par un dosage complexométrique des ions Ca^{2+} et Mg^{2+} par l'EDTA (noté Y^{2-}).

2.2. Matériel et réactifs

2.2.1. Matériel

- Burette de 25 mL,
- coupelle de pesée,
- spatule,
- pipette jaugée de 50 mL

2.2.2. Réactifs

- Solution d'EDTA à environ $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ notée « EDTA $\approx 0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ »
- Noir Eriochrome noté « NET »
- Sulfate de magnésium solide noté « $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ »
- Eau à analyser notée « eau à analyser »
- Tampon ammoniacal de pH 10 noté « tampon pH 10 »

2.3. Mode opératoire

2.3.1. Étalonnage de l'EDTA

Peser exactement une masse de sulfate de magnésium approchée à 50 mg.

Dans une fiole d'Erlenmeyer de 250 mL, placer :

- la masse de sulfate de magnésium pesée,
- environ 50 mL d'eau désionisée,
- 5 mL de tampon ammoniacal pH 10,
- une pointe de spatule de NET.

Titrer par la solution d'EDTA jusqu'au virage à la couleur bleue, sans trace de coloration violette.

Appeler un examinateur pour la lecture du dosage.

Deux essais concordants seront réalisés.

2.3.2. Dosage du titre hydrotimétrique de l'eau

Dans une fiole d'Erlenmeyer de 250 mL, placer :

- 50 mL d'eau à analyser,
- 5 mL de tampon ammoniacal de pH 10,
- une pointe de spatule de NET.

Titre par la solution d'EDTA jusqu'au virage à la couleur bleue, sans trace de coloration violette. Deux dosages compatibles seront réalisés.

2.4. Résultats et compte rendu

Établir la formule littérale donnant la concentration molaire de la solution d'EDTA.

Exprimer la concentration molaire moyenne de la solution d'EDTA en mol.L⁻¹ sous conditions de répétabilité (Annexe 1).

Établir la formule littérale donnant la dureté de l'eau analysée en °f.

Calculer la dureté moyenne de l'eau analysée.

Conclure.

Données :

- M (MgSO₄, 7 H₂O) = 246,5 g.mol⁻¹
- 1°f correspond à une concentration en ions Ca²⁺ ou Mg²⁺ égale à 0,1 mmol.L⁻¹.

	Concentration EDTA (mmol.L ⁻¹)	Dureté (°f)
Sr	0,10	0,25
Uc	0,2	0,3

3. ÉTUDE MICROBIOLOGIQUE DE LA BOISSON (7 points)

Afin de vérifier la salubrité de la boisson, la recherche de microorganismes est réalisée par filtration sur membrane de nitrocellulose.

3.1. Principe

Les critères microbiologiques utilisés pour contrôler la boisson énergétique sont donnés dans le tableau ci-dessous.

Critères du 20 décembre 2001	
Germes à 20°C	100 UFC/mL
Germes à 37°C	20 UFC/mL
Anaérobies sulfito-réducteurs et les spores	1 UFC/50mL
Entérocoques	0 UFC/250 mL
<i>Escherichia coli</i>	0 UFC/250 mL

Seul le dénombrement d'*Escherichia coli* est réalisé.

3.2. Matériel et réactifs

- 600 mL de boisson pour sportif notée « boisson M »
- 2 petites boîtes de Pétri avec de la gélose au tergitol 7 + TTC
- 2 membranes de nitrocellulose
- 300 mL d'eau désionisée stérile
- 1 éprouvette 250 mL
- Système de filtration

3.3. Mode opératoire

Effectuer deux filtrations de 250 mL chacune. Montrer une des deux filtrations à un examinateur.

Déposer chaque filtre sur une gélose au tergitol 7 + TTC.

Incuber 24 heures à 37°C.

4. VALIDATION DU PROCÉDÉ DE NEUTRALISATION DES DÉSINFECTANTS UTILISÉS DANS L'USINE (16 points)

Le service qualité de l'usine souhaite savoir si la méthode employée pour neutraliser les désinfectants est valable pour ceux utilisés dans l'usine : Anioستéril et P3 oxonia.

4.1. Principe

La détermination de l'activité bactéricide d'un désinfectant nécessite la réalisation d'un essai préliminaire validant le procédé de neutralisation du désinfectant utilisé.

Cette étude utilisera comme souche de référence : *Escherichia coli*.

4.2. Matériel et réactifs

- Suspension bactérienne d'*E.coli* entre 2.10^8 et 6.10^8 cellules/mL, notée « suspension A »
- 2 mL de Anioستéril
- 2 mL de P3 oxonia
- 6 tubes de 9 mL de tryptone-sel stérile (TS)
- 1 tube de 9,5 mL de TS
- 1 tube de 5 mL d'eau désionisée stérile
- 3 tubes de 9 mL de diluant-neutralisant
- 170 mL de PCA en surfusion en flacon
- 8 boîtes de Pétri vides
- 1 vortex (agitateur, mélangeur ou secoueur)
- 20 pipettes de 1 mL
- 1 chronomètre

4.3. Mode opératoire

4.3.1. Dilution de la « suspension A »

Effectuer les dilutions en série au 1/10 nécessaires pour obtenir 10 mL d'une suspension contenant entre $2. 10^3$ et $6. 10^3$ cellules par mL, appelée « suspension fille ». Montrer la réalisation d'une dilution à un examinateur.

4.3.2. Dénombrement de la « suspension fille »

Introduire 0,5 mL de la « suspension fille » dans 9,5 mL de tryptone-sel.

Ensemencer en profondeur et en simple couche 1 mL de cette nouvelle suspension dans un milieu PCA.

Effectuer 2 essais.

4.3.3. Réalisation de l'essai préliminaire

Dans 3 tubes de 9 mL de diluant-neutralisant, introduire :

- dans T1 : 0,5 mL d'Anioستéril,
- dans T2 : 0,5 mL de P3 oxonia,
- dans T3 : 0,5 mL d'eau désionisée stérile.

Agiter et laisser en contact 10 min à 20°C.

Introduire dans chacun des tubes 0,5 mL de la « suspension fille » en déclenchant le chronomètre dès le début de l'addition.

Agiter au vortex (agitateur électrique) 3 à 5 s.

Laisser en contact pendant 5 min à 20°C.

Ensemencer en profondeur et en simple couche 1 mL de chaque tube dans un milieu PCA.

Effectuer 2 essais pour chaque tube.

Incuber 48 heures à 37°C.

4.4. *Compte rendu*

Expliquer les dilutions effectuées pour obtenir « la suspension fille ».

5. ÉVALUATION TOXICOLOGIQUE DE LA BOISSON ÉNERGÉTIQUE (7 pts)

Pour que la boisson soit considérée comme réhydratante, elle doit être isotonique à la concentration plasmatique. Un test d'hémolyse des globules rouges de lapin avec la boisson énergétique est réalisé.

5.1. *Matériel et réactifs*

- 500 µL de globules rouges, noté « globules rouges »
- 150 µL d'eau physiologique, noté « phy »
- 150 µL d'eau désionisée, noté « désio »
- 150 µL d'une solution de NaCl à 15g/L, noté « NaCl »
- 150 µL de la boisson énergétique notée « boisson T »
- Microplaque à fond conique
- P100 + cônes
- Étuve à 37°C

5.2. *Réalisation du test*

Déposer successivement :

- 50 µL d'eau désionisée dans les puits A1 et A2
- 50 µL d'eau physiologique dans les puits A3 et A4
- 50 µL de la solution de NaCl à 15 g/L dans les puits A5 et A6
- 50 µL de boisson énergétique dans les puits B1 et B2

Homogénéiser la solution de globules rouges et en déposer 50 µL dans chacun des puits de la ligne A et B utilisés. Agiter doucement la plaque pendant 30 secondes.

Recouvrir la plaque.

Incuber 30 minutes à 37°C.

Sortir la plaque et laisser à température ambiante pendant 2 heures.

5.3. *Lecture*

Observer les résultats de la ligne A.

À l'aide de ces résultats, évaluer l'hémolyse dans les puits de la ligne B.

5.4. *Compte rendu*

Faire un tableau comprenant le contenu de chaque puits et le résultat obtenu.

Expliquer les résultats obtenus dans la ligne A.

Conclure sur le pouvoir réhydratant de la boisson énergétique.

Annexe 1 : Validation et expression des résultats : voir Annexe 3 TP A

Deuxième jour (1 heure)

1. ÉTUDE MICROBIOLOGIQUE DE LA BOISSON

1.1. Lecture des boîtes

Dénombrer des colonies présentes sur les boîtes. Présenter les résultats dans un tableau.

1.2. Interprétation des résultats

Calculer la concentration bactérienne en *Escherichia coli* de la boisson pour sportif. Conclure par rapport aux critères choisis par l'entreprise.

Données :

Critères du 20 décembre 2001	
Germes à 20°C	100 UFC/mL
Germes à 37°C	20 UFC/mL
Anaérobies sulfite-réducteurs et les spores	1 UFC/50mL
Entérocoques	0 UFC/250 mL
<i>Escherichia coli</i>	0 UFC/250 mL

2. VALIDATION DU PROCÉDÉ DE NEUTRALISATION DES DÉSINFECTANTS UTILISÉS DANS L'USINE

2.1. Dénombrement de la suspension fille

Dénombrer les colonies présentes sur les boîtes du dénombrement.

Présenter la totalité des résultats dans un tableau.

Calculer la concentration de la « suspension fille » sachant qu'il a été réalisé le premier jour le mélange suivant : 0,5 mL de suspension fille introduit dans 9,5 mL de tryptone sel.

Vérifier que le résultat obtenu correspond à la « suspension fille » de $2 \cdot 10^3$ et $6 \cdot 10^3$ cellules/mL.

2.2. Réalisation de l'essai préliminaire

Dénombrer les colonies présentes sur les boîtes ensemencées.

Présenter la totalité des résultats dans un tableau.

Vérifier que le neutralisant est sans effet sur la suspension bactérienne.

Le neutralisant est considéré sans effet sur la culture si au moins 90% des cellules restent en vie.

Vérifier que 50 % au moins des cellules bactériennes d'*E.coli* sont protégées de l'action antibactérienne des désinfectants par le neutralisant.

Justifier.

Conclure sur l'efficacité du neutralisant employé.

Pour traiter cette 2^{ème} partie un rappel du sujet du 1^{er} jour est fourni aux étudiants : principe, matériel, réactifs et mode opératoire de la validation du procédé de neutralisation des désinfectants utilisés dans l'usine.