SESSION 2012
France métropolitaine

BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR AGRICOLE

ÉPREUVE E7-1

ANALYSES ET CONTRÔLES

Option : ANABIOTEC

Durée : 3 heures

Matériel(s) et document(s) autorisé(s) : **Calculatrice**

Rappel : Au cours de l'épreuve, la calculatrice est autorisée pour réaliser des opérations de calcul, ou bien élaborer une programmation, à partir des données fournies par le sujet.
Tout autre usage est interdit.

Le sujet comporte 11 pages

PARTIE 1 : DOSAGE DU LACTOSE ..... **7 points**
PARTIE 2 : RECHERCHE DE LA β-LACTOGLOBULINE ..... **3,5 points**
PARTIE 3 : MÉTHODES D'ANALYSE MICROBIOLOGIQUE ..... **9,5 points**

SUJET

MISE AU POINT D'UN LAIT APPAUVRI EN LACTOSE ET β-LACTOGLOBULINE

Suite à une demande du service marketing d'une entreprise spécialisée dans les produits laitiers, une nouvelle formulation d'un lait pasteurisé appauvri en lactose et β-lactoglobuline a été mise au point.

Ce lait étant destiné à une clientèle ciblée sur les points suivants :

- Intolérance au lactose ;
- Allergie à la β-lactoglobuline bovine responsable de 80 % des cas d'allergie des jeunes enfants au lait.

Le laboratoire qualité de l'entreprise est amené à vérifier :

- La teneur en lactose ;
- La présence de la β-lactoglobuline ;
- La qualité microbiologique de ce lait pasteurisé.

PARTIE 1

Dosage du lactose

Afin de vérifier la teneur en lactose du produit nouvellement élaboré, sa teneur est déterminée par une technique chromatographique selon la méthode de référence donnée par la norme ISO 22662 : 2007 [(voir **document 1** : extrait de la norme (simplifiée)].

Pour cela, le technicien doit analyser :

- Échantillon A : un lait normal dont la teneur en lactose est d'environ 4,5 % (en masse).
- Échantillon B : le lait appauvri en lactose.

Dans un premier temps, un seul essai est réalisé par échantillon.

1.1 - À partir du mode opératoire du **document 1**, lister et quantifier le matériel nécessaire à la réalisation de l'ensemble de l'analyse demandée (hormis le module HPLC).

1.2 - Déterminer la masse de α-lactose monohydraté à peser à ± 1 mg pour préparer la solution étalon en lactose anhydre.

Données : masses molaires atomiques en $g.mol^{-1}$: $M_C = 12$; $M_H = 1$; $M_O = 16$

1.3 - On obtient les résultats suivants :

Échantillon	Essai	Masse pesée (en g)	Aire mélézitose (en mV)	Aire lactose (en mV)
A : lait à 4,5 %	A	3,096	15 000	21 000
B : lait appauvri en lactose	B	3,088	14 500	3 450
E : solution étalon	E	///	16 000	33 185

1.3.1 - Déterminer pour les échantillons A et B, la concentration massique volumique en lactose en $mg.mL^{-1}$ du filtrat.

1.3.2 - En déduire le pourcentage massique (c'est-à-dire la masse de lactose en g pour 100 g de lait).

1.4 - Après cette première mise au point, l'analyse du lait appauvri en lactose a été réalisée en double par 2 techniciens différents pour « estimer » les conditions de fidélité par rapport à des résultats obtenus lors d'essais interlaboratoires (selon la norme ISO 5725).

Les résultats expérimentaux sont consignés ci-dessous :

Teneur en lactose en % (en masse)	T1	T2
B1	0,750	0,875
B2	0,745	0,873

Données :

Ecarts types en % (en masse) : - répétabilité : $s_r = 0,021$ - reproductibilité : $s_R = 0,046$
Sachant que les limites de répétabilité (r) et de reproductibilité (R) sont calculées comme suit :
$r = 2,8 \times s_r$ $R = 2,8 \times s_R$ pour un intervalle de confiance de 95 %.
La différence absolue entre 2 résultats d'essai « testés » en conditions de répétabilité ou reproductibilité doit être inférieure ou égale à r ou R.

À partir des résultats et des données, vérifier la répétabilité puis la reproductibilité et conclure.

PARTIE 2

Recherche de la β-lactoglobuline

La β-lactoglobuline bovine (βlg) est un des composants principaux du lait de vache (2,5 à 3 g/L). C'est après la caséine la protéine la plus abondante.
Les caractéristiques de cette molécule sont présentées dans le **document 2**.
On envisage la production d'un lait appauvri en β-lactoglobuline.

2.1 - À partir des données fournies dans le **document 2**, proposer, en justifiant, une technique permettant d'isoler la β-lactoglobuline des autres constituants du lait.

2.2 - On souhaite vérifier la présence de cette protéine dans le lait pasteurisé produit.
La technique utilisée est une méthode immunoenzymatique, ELISA, dont le mode opératoire est fourni ci-après.

Mode opératoire :

- Placer, dans chacun des 6 puits coatés, les solutions suivantes :
  - Puits 1 et 2 : 100 µL d'eau pure.
  - Puits 3 et 4 : 100 µL d'une solution de βlg de concentration connue.
  - Puits 5 et 6 : lait testé (produit par l'entreprise).

- Ajouter dans chaque puits 100 µL de solution d'anticorps traceur ou marqueur.
- Incuber 30 minutes à température ambiante.
- Vider le contenu des puits.
- Laver à l'eau pure (renouveler l'opération trois fois).
- Ajouter dans chaque puits 200 µL de solution d'Ellman (substrat).
- Incuber 10 minutes.
- Lire les résultats.

2.2.1 - Indiquer le rôle des solutions déposées dans les puits 1 et 2 d'une part et les puits 3 et 4 d'autre part.

2.2.2 - Justifier le but des trois lavages et préciser leur importance pour la technique utilisée.

2.3 - Variantes

2.3.1 - Citer une technique utilisant un marquage autre qu'enzymatique de l'anticorps.

2.3.2 – Indiquer, pour chaque technique, leurs avantages et inconvénients et préciser laquelle vous semble la plus appropriée pour le dosage de la β-lactoglobuline.

PARTIE 3

Méthodes d'analyse microbiologique

3.1 - Les analyses microbiologiques applicables au lait pasteurisé sont données dans le **document 3** (extrait du paquet hygiène).
Justifier l'intérêt de la recherche des entérobactéries et expliquer la signification des termes n, c, m, M utilisés pour le plan d'échantillonnage et les limites de celui-ci.

3.2 - Recherche de *Listeria* par deux méthodes : référence et alternative.
Le **document 4** représente les différentes étapes de réalisation de la méthode de référence sous forme d'un logigramme.

3.2.1 - Indiquer l'intérêt des deux premières étapes du **document 4** :
- Diluer au 1/10 dans le bouillon Fraser demi.
- Transférer 0,1 mL de l'enrichissement primaire dans 10 mL de milieu Fraser complet.

3.2.2 - À la fin du logigramme, après la confirmation, il y a 2 réponses possibles ; il s'agit de critères non chiffrés. Comment interpréter ces résultats ? Préciser la conséquence sur le produit.

La technique de la PCR en temps réel est une méthode alternative (**document 5**) qui a été validée par l'AFNOR pour la détection de *Listeria.*

3.2.3 - Identifier les différents points critiques de l'analyse depuis la pesée de l'échantillon jusqu'à l'introduction du mix dans le thermocycleur.

3.2.4 - Indiquer le principal avantage d'une PCR en temps réel par rapport à une PCR classique.

3.2.5 - Citer les avantages et les inconvénients de la méthode de référence par rapport à la méthode alternative.

3.3 - Comparaison de deux méthodes d'identification (alternative et référence).

On se propose de comparer deux méthodes de détection du nombre d'ufc dans 25 g de plusieurs produits laitiers contaminés artificiellement :

- la méthode de référence ;
- la méthode alternative.

On a analysé dix produits contaminés numérotés de P_1 à P_{10} à la sortie de l'entreprise, suivant les deux méthodes. Le niveau de détection (logarithme décimal du nombre moyen d'ufc pour 25 grammes) est reporté dans le tableau suivant :

Produits laitiers	Méthode de référence	Méthode alternative
P_1	**0,41**	**0,37**
P_2	**1,15**	**1,1**
P_3	**0,94**	**0,83**
P_4	**1,13**	**1,20**
P_5	**1,32**	**1,51**
P_6	**0,96**	**0,98**
P_7	**1,12**	**1,09**
P_8	**1,05**	**1,04**
P_9	**0,48**	**0,54**
P_{10}	**1,28**	**1,46**

<u>On note</u> :

- X_1 : la variable aléatoire prenant pour valeur le nombre moyen de ufc par 25 grammes obtenu par la méthode de référence d'un produit laitier pris au hasard et supposée de loi normale.
- X_2 : la variable aléatoire prenant pour valeur le nombre moyen de ufc par 25 grammes obtenu par la méthode alternative d'un produit laitier pris au hasard et supposée normale.
- D : la variable aléatoire égale à la différence $D = X_1 - X_2$. On admet que la loi de probabilité de la variable aléatoire D est la loi normale de moyenne μ_D et d'écart type σ_D.
- $\overline{D}$: la variable aléatoire qui à tout échantillon aléatoire simple et indépendant de taille 10, on associe la moyenne de ces différences.
- S_D : la variable aléatoire qui à tout échantillon aléatoire simple et indépendant de taille 10, on associe l'écart type de la série des différences.

3.3.1 - Pour chaque produit, calculer la différence d_i entre les deux valeurs puis calculer, à 10^{-2} prés, la moyenne $\overline{d}$ et l'écart type s_d de la série des différences. Les calculs intermédiaires ne sont pas demandés.

3.3.2 - On cherche à savoir, au seuil de risque $\alpha = 0{,}05$, s'il y a une différence entre les deux méthodes de détection.

a) Expliquer pourquoi le test de comparaison de moyennes dans le cas d'échantillon apparié est approprié.

b) Formuler l'hypothèse nulle H_0 et l'hypothèse alternative H_1.

c) On admet que sous H_0 la loi de probabilité de la variable aléatoire $T = \dfrac{\overline{D}}{\dfrac{S_D}{\sqrt{n-1}}}$ est la loi de Student à n-1 degrés de liberté.

Calculer, à 10^{-2} près, la valeur observée t_0 définie par $t_0 = \dfrac{\overline{d}}{\dfrac{s_d}{\sqrt{n-1}}}$, les valeurs critiques $t_{1-\frac{\alpha}{2};n-1}$ et $t_{\frac{\alpha}{2};n-1}$ et rédiger la conclusion pour ce test statistique. On pourra utiliser le **document 6**.

3.3.3 - La normalité de la variable aléatoire D n'est pas vérifiée.

a) Expliquer pourquoi le test non paramétrique dit le test des signes, est plus adapté pour comparer les deux méthodes de détection dans ce cas.

b) Soit *P* : la variable aléatoire qui à tout échantillon de taille 10 associe le nombre de différence positive parmi les dix valeurs non nulles.
Sous l'hypothèse H_0, déterminer la loi de probabilité de la variable aléatoire *P.*

c) On admet que : pour $k \in \{0;1;.....10\}$ $prob(P = k) = \binom{10}{k} \times (\frac{1}{2})^{10}$. Calculer, à 10^{-3} prés, $prob(P \leq 2)$ et $prob(P \geq 8)$.

d) Au seuil de risque $\alpha = 0{,}11$, y a-t-il une différence entre les deux méthodes ? On donnera les valeurs critiques, la valeur observée et on rédigera la conclusion de ce test.

DOCUMENT 1

LAIT ET PRODUITS LAITIERS - DÉTERMINATION DE LA TENEUR EN LACTOSE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (MÉTHODE DE RÉFÉRENCE)

Extrait de la norme ISO 22662 (2007)

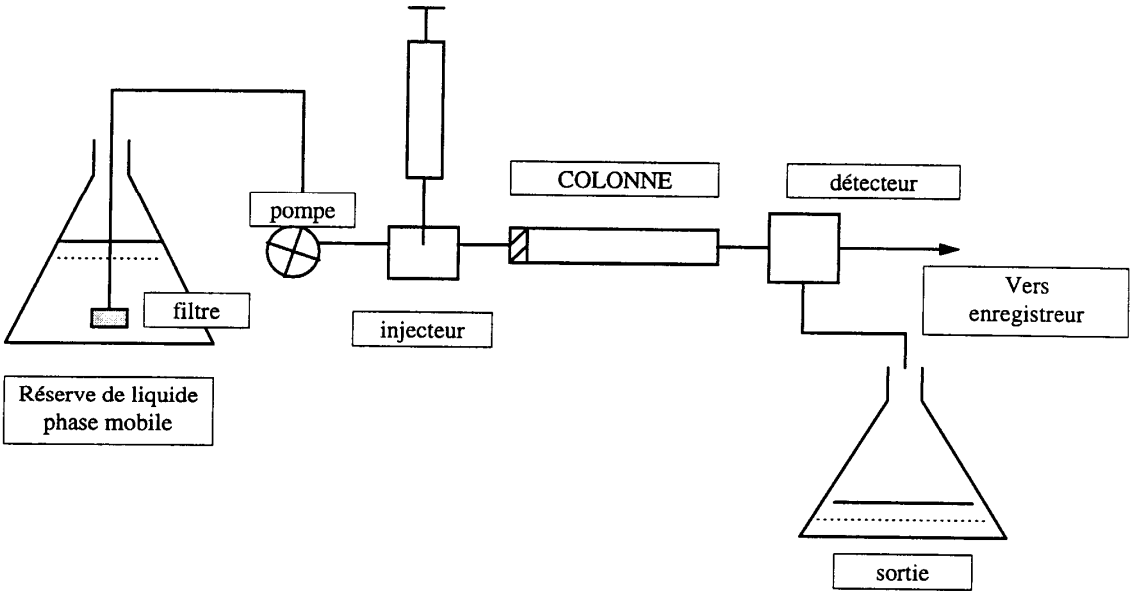
Principe :

Un étalon interne (D(+)-mélézitose) est ajouté à un volume de lait et à un étalon de lactose.
Un réactif (Biggs-Szijarto) est ajouté pour précipiter les fractions de composants gras et protéiques du lait.
L'échantillon est filtré puis analysé par HPLC et détecté par un réfractomètre.

Réactifs :

- Eau de qualité HPLC
- Solution de D(+)-mélézitose ($C_{18}H_{32}0_{16},H_2O$) à 50 $mg.mL^{-1}$.
- α-lactose monohydraté($C_{12}H_{22}0_{11},H_2O$)
- Solution de Biggs-Szijarto (pour 200 mL):
  - 25 g acétate de zinc dihydraté
  - 12,5 mg d'acide phosphotungstique monohydraté
  - 20 mL d'acide éthanoïque
  - Qsp 200 mL eau qualité HPLC

Module HPLC :



Mode opératoire :

Préparation de la solution étalon :

A partir de l' α-lactose **monohydraté** ($C_{12}H_{22}O_{11},H_2O$), préparer 10,00 mL d'une solution exacte à 20 $mg.mL^{-1}$ α-lactose **anhydre** contenant 2 mL de D(+)-mélézitose à 50 $mg.mL^{-1}$qsp 10 mL avec H_2O qualité HPLC.

Préparation de l'essai :

Peser à 1 mg près environ 3 mL d'échantillon de lait préalablement homogénéisé, ajouter 2 mL de D(+)-mélézitose à 50 $mg.mL^{-1}$ et 1,2 mL de la solution de Biggs-Szijarto qsp 10 mL avec H_2O qualité HPLC.
Après homogénéisation et attente de 10 min, l'échantillon est filtré d'abord sur papier filtre puis à l'aide d'un filtre de porosité 0,45 µm. On obtient un filtrat qui sera analysé.

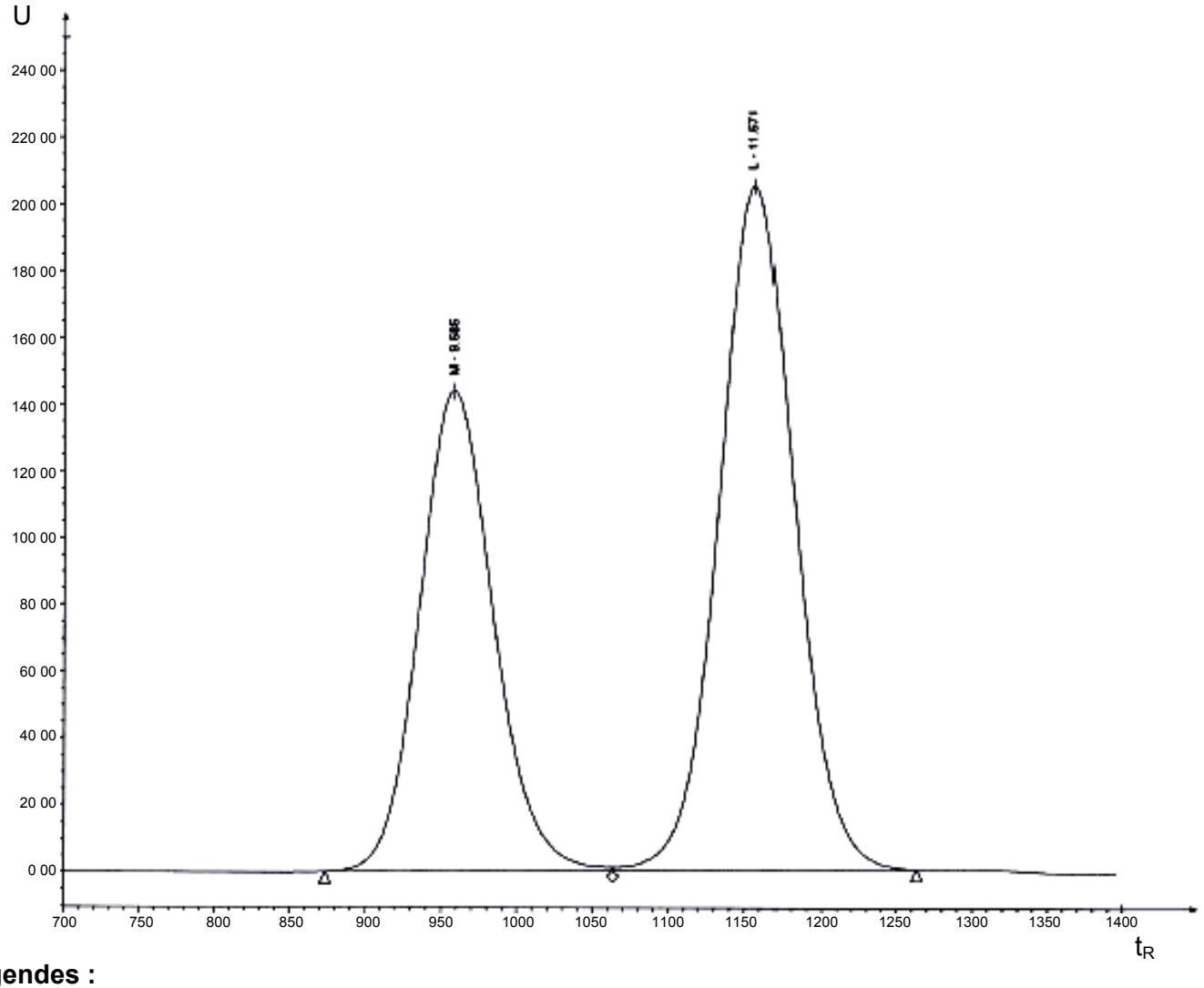
DOCUMENT 1 (suite)

Injection :

Conditions de travail

- Débit : 0,6 mL.min^{-1}
- phase mobile : H_2O qualité HPLC dégazée
- Injection : 20 µL
- Température colonne : 85°C
- Durée : 15 min

Chromatogramme :



Légendes :

M : D(+)-mélézitose
L :α-lactose
t_R : temps de rétention
U : différence de potentiel

Calcul et expression des résultats :

L'intégration du chromatogramme par un logiciel génère l'aire des pics de la solution de mélézitose et de la solution de lactose.
Les résultats en pourcentage massique sont à exprimer à 3 chiffres décimaux.

DOCUMENT 2

Caractéristiques de la β-lactoglobuline

- 162 acides aminés
- Masse moléculaire : 18 kDa sous sa forme monomérique et 36 kDa sous sa forme dimérique
- pHi = 5,2

Composition moyenne d'un lait de vache en g/L

	Eau	Matière grasse	Protéines totales	Caséine	Albumine	β-lactoglobuline bovine	Glucides : lactose	Matières minérales
Lait de vache	900	35-40	30-35	27-30	3-4	2-3	45-50	8-10

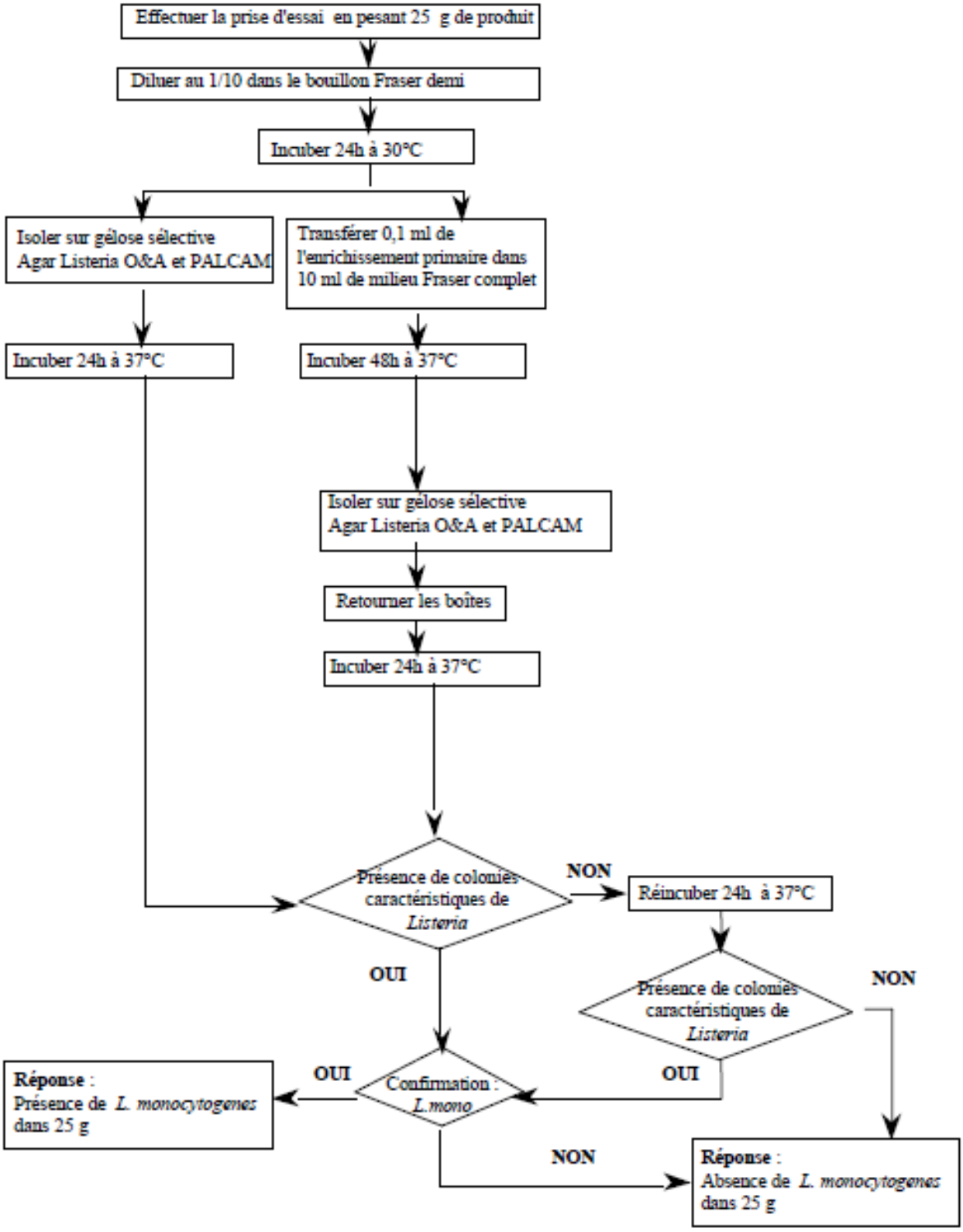
DOCUMENT 3

Extrait du règlement CE (N°2073/2005) concernant les critères microbiologiques applicables à des laits pasteurisés

critères	Microorganismes	Plan d'échantillonnage		Limites		Méthode de référence	Stade d'application du critère
		n	c	m	M		
sécurité	***Listeria monocytogenes***	**10**	**0**	**Absence dans 25 g**		**EN/ISO 11290-1**	**Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation**
hygiène	***Entero-bacteriaceae***	**5**	**2**	**< 1 ufc/mL**	**5 ufc/mL**	**ISO 21528-1**	**Fin du procédé de fabrication**

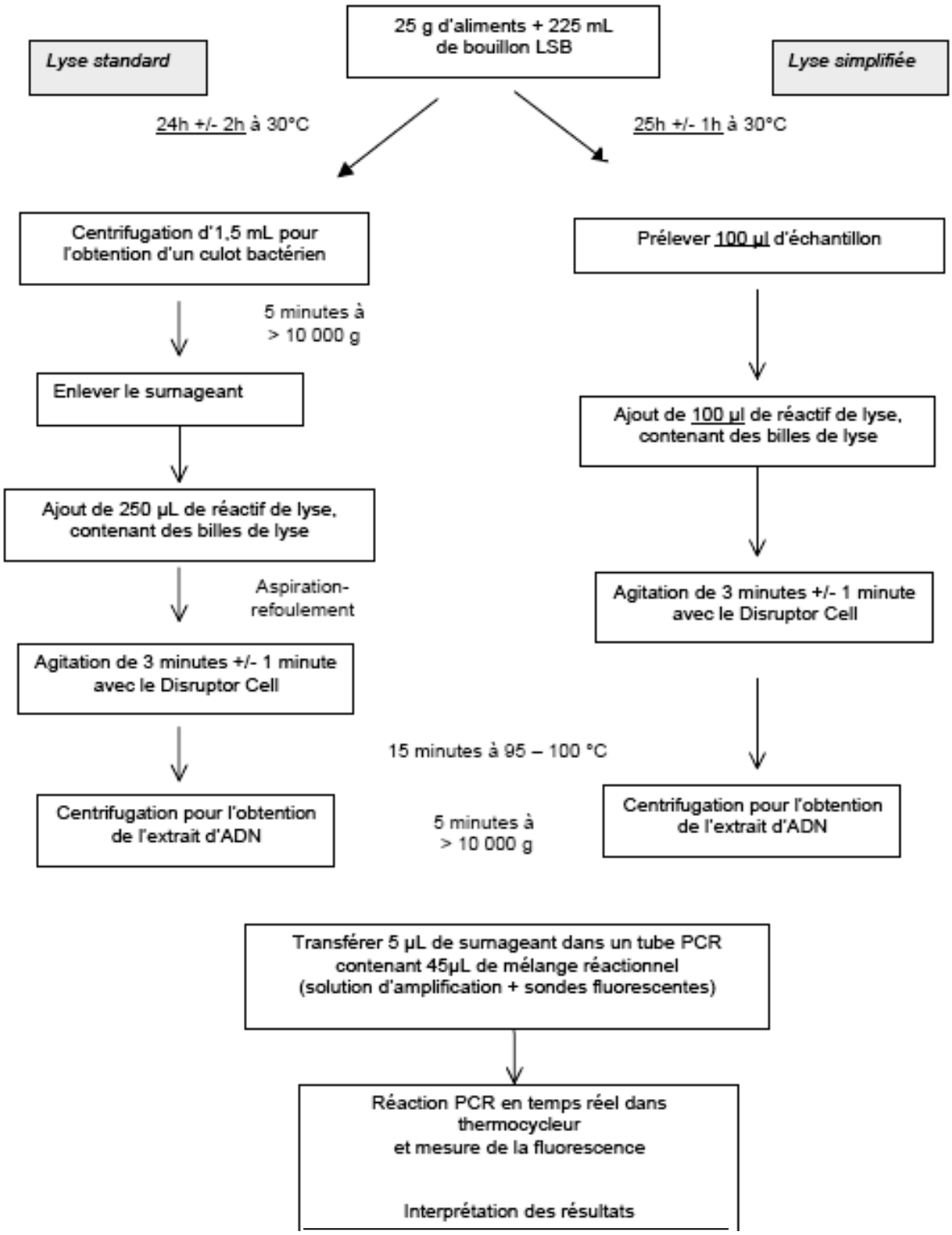
DOCUMENT 4

Mode opératoire de la méthode de référence
(NORME NF EN ISO 11290-1 : 2005)



DOCUMENT 5

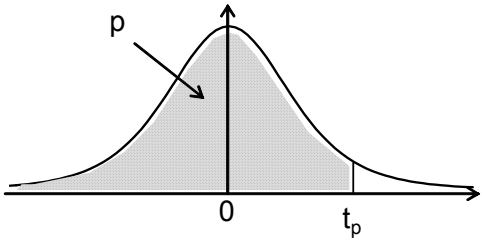
Mode opératoire de la méthode alternative



DOCUMENT 6

Extrait de la table de Student

Fonction de répartition d'une variable de Student à k degrés de liberté.
Valeurs t_p telles que Prob($T \leq t_p$) = p



k \ p	0,90	0,95	0,975	0,99	0,995	0,999	0,9995
1	3,08	6,31	12,71	31,82	63,66	318,29	636,58
2	1,89	2,92	4,30	6,96	9,92	22,33	31,60
3	1,64	2,35	3,18	4,54	5,84	10,21	12,92
4	1,53	2,13	2,78	3,75	4,60	7,17	8,61
5	1,48	2,02	2,57	3,36	4,03	5,89	6,87
6	1,44	1,94	2,45	3,14	3,71	5,21	5,96
7	1,41	1,89	2,36	3,00	3,50	4,79	5,41
8	1,40	1,86	2,31	2,90	3,36	4,50	5,04
9	1,38	1,83	2,26	2,82	3,25	4,30	4,78
10	1,37	1,81	2,23	2,76	3,17	4,14	4,59
11	1,36	1,80	2,20	2,72	3,11	4,02	4,44
12	1,36	1,78	2,18	2,68	3,05	3,93	4,32
13	1,35	1,77	2,16	2,65	3,01	3,85	4,22
14	1,35	1,76	2,14	2,62	2,98	3,79	4,14
15	1,34	1,75	2,13	2,60	2,95	3,73	4,07
16	1,34	1,75	2,12	2,58	2,92	3,69	4,01
17	1,33	1,74	2,11	2,57	2,90	3,65	3,97
18	1,33	1,73	2,10	2,55	2,88	3,61	3,92
19	1,33	1,73	2,09	2,54	2,86	3,58	3,88
20	1,33	1,72	2,09	2,53	2,85	3,55	3,85
21	1,32	1,72	2,08	2,52	2,83	3,53	3,82
22	1,32	1,72	2,07	2,51	2,82	3,50	3,79
23	1,32	1,71	2,07	2,50	2,81	3,48	3,77
24	1,32	1,71	2,06	2,49	2,80	3,47	3,75
25	1,32	1,71	2,06	2,49	2,79	3,45	3,73
26	1,31	1,71	2,06	2,48	2,78	3,43	3,71
27	1,31	1,70	2,05	2,47	2,77	3,42	3,69
28	1,31	1,70	2,05	2,47	2,76	3,41	3,67
29	1,31	1,70	2,05	2,46	2,76	3,40	3,66
30	1,31	1,70	2,04	2,46	2,75	3,39	3,65
35	1,31	1,69	2,03	2,44	2,72	3,34	3,59
40	1,30	1,68	2,02	2,42	2,70	3,31	3,55
45	1,30	1,68	2,01	2,41	2,69	3,28	3,52
50	1,30	1,68	2,01	2,40	2,68	3,26	3,50
60	1,30	1,67	2,00	2,39	2,66	3,23	3,46
80	1,29	1,66	1,99	2,37	2,64	3,20	3,42
100	1,29	1,66	1,98	2,36	2,63	3,17	3,39
200	1,29	1,65	1,97	2,35	2,60	3,13	3,34
500	1,28	1,65	1,96	2,33	2,59	3,11	3,31
1000	1,28	1,65	1,96	2,33	2,58	3,10	3,30
10000	1,28	1,64	1,96	2,33	2,58	3,09	3,29