SESSION 2015
Métropole

BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR AGRICOLE

ÉPREUVE E5

LABORATOIRE

Option : ANABIOTEC

Durée : 3 heures

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

Le sujet comporte 11 pages

SUJET

LE BURGER « IN VITRO »

SCIENCES - Une équipe de chercheurs prévoit de produire d'ici à la fin de l'année le premier burger fabriqué en laboratoire...

Faire pousser de la viande de bœuf en laboratoire… et la manger. Selon le *Guardian*, c'est ce que propose une équipe de chercheurs de l'université de Maastricht dirigée par le Dr Mark Post qui souhaite réduire le nombre de bovins exploités pour la production de viande. L'objectif est aussi écologique : moins de bovins en circulation, c'est aussi moins de méthane dans l'air. Une bonne nouvelle pour le réchauffement climatique. […]

L'épreuve du goût

Si la viande de laboratoire peut au final ressembler à de la viande classique, personne ne l'a encore goûtée. Le Dr Post lui-même admet que la ressemblance, au niveau visuel mais surtout au niveau du goût, pourrait ne pas être parfaite. […] Elle est issue de cellules souches extraites de tissus musculaires et cultivées en laboratoire dans une solution à base de sérum de veau fœtal. Pour améliorer la texture des tissus ainsi créés, les chercheurs les soumettent à un courant électrique.

D'après un article du *Guardian* paru le 20 février 2012.

Un laboratoire de recherches sur la viande bovine s'intéresse à ces travaux. Il souhaite comparer ce nouveau produit à un steak haché naturel.

Un process de fabrication des steaks hachés de synthèse a été mis au point par l'équipe de chercheurs et est fourni dans le **document 1**.

A - L'une des difficultés rencontrées pour la mise au point de la viande de synthèse est la texture molle des fragments de tissus produits. Plusieurs hypothèses sont émises pour expliquer ce constat. L'une d'entre elles porte sur le manque de cohésion des cellules des tissus produits. ***(3,5 points)***

1. Dans un premier temps, l'équipe de chercheurs souhaite observer au microscope la structure des cellules produites. Proposer une coloration histologique et justifier la réponse.

2. Afin d'observer le tissu produit, on prélève un fragment de ce muscle. Proposer le protocole de préparation des coupes histologiques jusqu'à l'observation microscopique.

3. On constate des défauts lors de l'observation. Citer les causes possibles permettant d'évaluer la mauvaise réalisation de la préparation.

B - Le produit obtenu, après broyage et mise en forme, serait commercialisé dans les mêmes circuits que les steaks hachés traditionnels. Le laboratoire décide de réaliser un test de vieillissement (basé sur la norme NFV 01 003) en étudiant l'évolution de la flore totale aérobie à 30°C en le combinant à un Challenge test en contaminant artificiellement le produit avec *E.coli.* Ceci pour vérifier la DLC de 12 jours.

(6,5 points)

1. Comparer les termes : date limite de consommation et durée de vie microbiologique.

2. Citer au moins trois facteurs qui peuvent influer sur la durée de vie du produit.

3. A partir des **documents 2 et 5** fournis, proposer un protocole pour réaliser le test de vieillissement. Préciser le nombre d'échantillons nécessaires, les températures de conservation pendant la durée du test et les analyses à réaliser.

4. Les flores recherchées sont les suivantes : *E.coli* et flore totale.

On ensemence en début de protocole *E.coli* à raison de 10^3 UFC/g de produit.

Seuil maximal : m = 10^5 UFC/g de produit pour *E.coli*
Seuil maximal : m = 10^6 UFC/g de produit pour la flore totale

On recherche *E.coli* sur le milieu VRBL avec confirmation (**document 3**).

4.1. Schématiser le protocole de fabrication du milieu.

4.2. Déterminer les points critiques concernant les risques de contamination par des entérobactéries du milieu en utilisant le logigramme fourni (**document 4**).

4.3. Rédiger un plan de contrôle pour la fabrication de ce milieu.

Les résultats obtenus pour le test de vieillissement sont les suivants :

J_0 du test (en UFC/g de produit)						DLC J_0+12(en UFC/g de produit)				
N°échantillon	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**
Flore totale	1 500	1 800	980	1 300	1 200	$1,9.10^5$	$8,2.10^5$	$9,8.10^6$	$3,2.10^5$	$8,9.10^4$
Escherichia coli	10^3	10^3	10^3	10^3	10^3	$4,0.10^4$	$3,2.10^5$	$4,8.10^5$	$2,8.10^5$	$3,1.10^4$

On utilisera comme critères d'interprétation n = 5 et c = 2.

5. À la lecture de ces résultats, conclure quant à la conformité du produit. Justifier la réponse.

C - Le laboratoire souhaite se faire accréditer (ISO 17025) selon le programme 59 « Microbiologie des aliments ». Vous avez en charge la réalisation de ce projet. Proposer un planning de mise en place de cette accréditation sur une période de deux ans. ***(1 point)***

D - Le tissu conjonctif est une des deux composantes de la tendreté de la viande (l'autre étant la maturation). Le tissu conjonctif est constitué de 2 protéines fibreuses : le collagène et l'élastine qui rendent globalement la viande moins tendre. La L-hydroxyproline représente environ 80 % de la masse du tissu conjonctif et peut donc être considérée comme un marqueur spécifique de ce tissu.

Le dosage de la L-hydroxyproline est la méthode de référence (NF V 04-415) communément admise pour déterminer la quantité de collagène d'un échantillon de viande naturelle.

On souhaite doser la L-hydroxyproline de cette viande de synthèse en suivant le protocole donné dans le **document 6**. ***(6 points)***

1. Expliquer la réalisation de la gamme étalon.

2. Enoncer les précautions à prendre (de l'ordre de la sécurité) lors de la préparation du dérivé coloré.

3. Nommer la loi qui régit le dosage spectrophotométrique. Ecrire son expression et indiquer ses conditions de validité.

4. L'absorbance est mesurée à 558 nm au spectrophotomètre. Expliquer comment cette valeur a été obtenue expérimentalement.

5. Après analyse au spectrophotomètre et après avoir tracé la droite d'étalonnage, on obtient une valeur de 8,6 $mg.L^{-1}$ pour une dilution d'hydrolysât de 1/10. La teneur moyenne en L-hydroxyproline d'une viande naturelle est de 120 $mg.L^{-1}$. Conclure sur la tendreté de la viande de synthèse.

E - Il est important que la teneur en collagène soit homogène, afin que la tendreté de la viande soit régulière. Pour une viande naturelle, la variance de la teneur ne doit pas être supérieure à 0,02. ***(3 points)***

Dans un échantillon de 10 steaks de synthèse, on a obtenu les teneurs suivantes :

Teneur en collagène (g / 100 g)	1,73	1,72	1,71	2,11	2,01	2,19	1,96	1,75	2,00	1,80

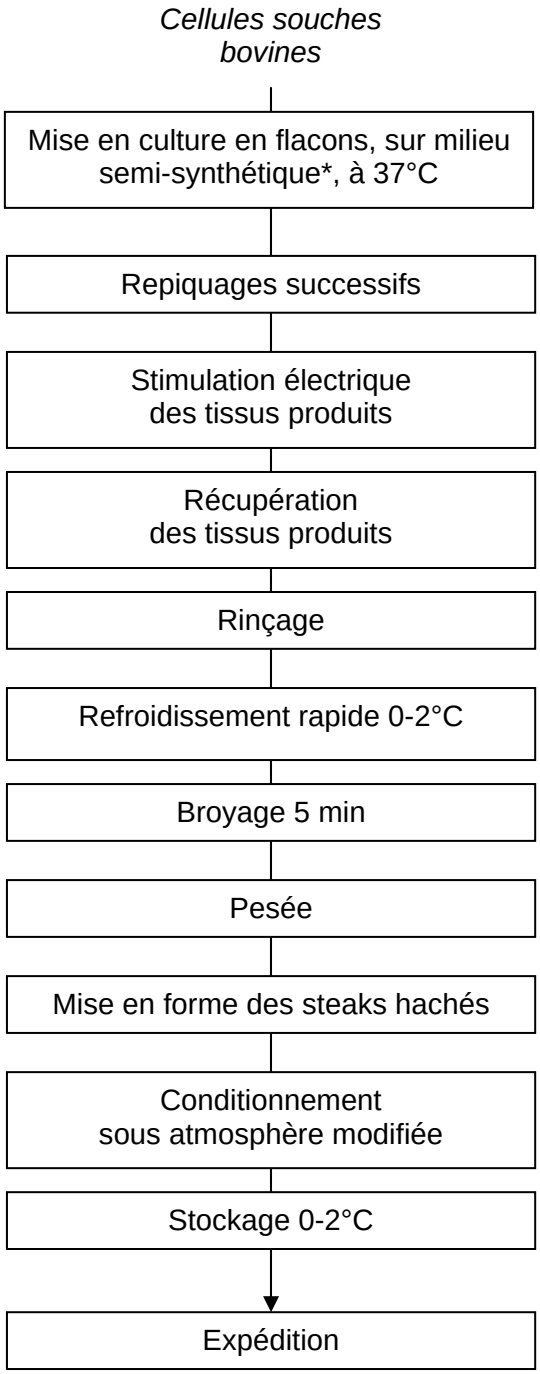
On veut effectuer un test de conformité de la variance, au seuil de 5 %, pour montrer que la teneur en collagène est homogène.

On admet que la loi de probabilité de la variable aléatoire $K^2 = \frac{nS^2}{\sigma^2}$ est une loi du khi-deux à n - 1 degrés de liberté.

Mettre en œuvre ce test en précisant les hypothèses, la règle de décision, les calculs et l'interprétation (voir **document 7**).

DOCUMENT 1

Process de fabrication du steak haché de synthèse



Milieu semi-synthétique * : composé du milieu minimum de Eagle complémenté par 5 % de sérum de veau fœtal (SVF).

Moyenne des échantillons réalisés : **pH = 6,8 et Aw = 0,98**

DOCUMENT 2

Note de service DGAL/SDSSA/N2010-8062 du 09 mars 2010 : *Durée de vie microbiologique des aliments*

Test de vieillissement :

Les tests de vieillissement permettent d'évaluer la croissance de bactéries dans les aliments naturellement contaminés, conservés dans des conditions naturellement prévisibles. Ils peuvent être mis en œuvre dans le cadre de la validation ou de la vérification de la maîtrise de la qualité microbiologique en fin de durée de vie microbiologique.

Tests de croissance ou challenge test :

Les tests de croissance ont pour objectif de fournir une information sur le comportement des micro-organismes inoculés artificiellement dans un aliment avant son stockage sous différentes conditions. Ces tests peuvent être utilisés pour :

- déterminer le potentiel de croissance, c'est-à-dire savoir si un micro-organisme peut se développer dans un aliment au cours de sa durée de vie, et, le cas échéant, connaître l'amplitude de sa croissance ;
- ou évaluer le taux de croissance, c'est-à-dire la vitesse de multiplication.

DOCUMENT 3

Milieu VRBL

PREPARATION :

- Mettre en suspension 38,5 g de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution.
- Ne pas surchauffer.
- Ne pas autoclaver.

MODE D'EMPLOI :

- Refroidir et maintenir le milieu à 44-47°C.
- Transférer 1 mL du produit à analyser et de ses dilutions décimales dans des boîtes de Petri stériles.
- Couler 12 mL de gélose.
- Homogénéiser parfaitement.
- Laisser solidifier sur une surface froide.
- Couler à nouveau 4 mL de milieu, de façon à former une deuxième couche.
- Laisser solidifier.
- Incuber :
    - à 30°C pendant 24 heures pour la recherche et le dénombrement des coliformes ;
    - à 44°C pour les coliformes thermotolérants.

LECTURE :

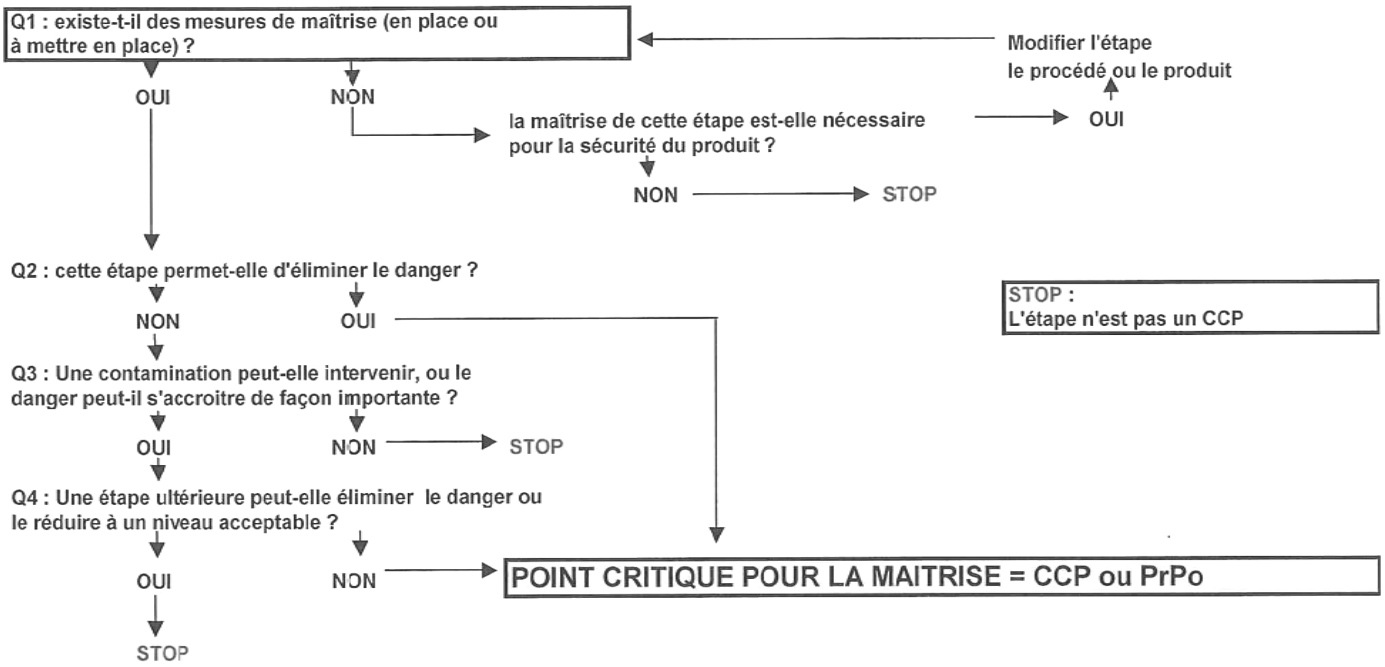
Les coliformes présentent des colonies violacées de diamètre égal ou supérieur à 0,5 mm après 24 heures d'incubation. Les entérobactéries lactose-négatif sont incolores. Dans le cadre du protocole opératoire décrit par la norme NF ISO 4832, il pourra s'avérer nécessaire de confirmer les colonies atypiques éventuellement obtenues, en recherchant leur caractère gazogène en bouillon lactosé bilié au vert brillant (BLBVB) (BK002, BM011).

FORMULE – TYPE :

Pour 1 litre de milieu :
- Peptone pepsique de viande ..... 7,0 g
- Extrait autolytique de levure ..... 3,0 g
- Lactose ..... 10,0 g
- Sels biliaires..... 1,5 g
- Chlorure de sodium ..... 5,0 g
- Rouge neutre ..... 30,0 mg
- Cristal violet ..... 2,0 mg
- Agar agar bactériologique..... 12,0 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,4 ± 0,2.

DOCUMENT 4


Q1 : existe-t-il des mesures de maîtrise (en place ou à mettre en place) ?
OUI
NON
la maîtrise de cette étape est-elle nécessaire pour la sécurité du produit ?
OUI
Modifier l'étape le procédé ou le produit
NON
STOP
Q2 : cette étape permet-elle d'éliminer le danger ?
NON
OUI
STOP : L'étape n'est pas un CCP
Q3 : Une contamination peut-elle intervenir, ou le danger peut-il s'accroitre de façon importante ?
OUI
NON
STOP
Q4 : Une étape ultérieure peut-elle éliminer le danger ou le réduire à un niveau acceptable ?
OUI
NON
STOP
POINT CRITIQUE POUR LA MAITRISE = CCP ou PrPo

DOCUMENT 5

Comment réaliser un test de vieillissement (adapté de la norme NF 01-003)

Comment calculer la DLC (Date Limite de Consommation)/DLUO (Date Limite d'Utilisation Optimale) de mon produit ?

Vous commercialisez une denrée périssable ou devant être réfrigérée, quelle est la durée de vie microbiologique de votre produit ?

1) Vous estimez la DLC ou DLUO de votre produit à X jours.

2) Faites "vieillir" votre produit dans des conditions *a priori* défavorables :

- Si le produit doit être conservé réfrigéré, placez-le, pendant X/3 jours à la température de 4°C puis pendant 2X/3 jours à la température de 8°C (température moyenne d'un réfrigérateur ménager).

- Si le produit doit être conservé à température ambiante, placez-le pendant X/3 jours à la température de 18 - 20°C puis pendant 2X/3 jours à la température de 35 - 40°C (produit oublié sur la plage arrière de la voiture du consommateur).

3) À l'issue de ce vieillissement, faites réaliser les tests microbiologiques sur un nombre d'échantillons suffisant. Le nombre d'échantillons doit être représentatif de votre rythme de production. L'obtention de résultats favorables vous permet de valider votre DLC ou DLUO. Dans le cas contraire, il faut envisager et vérifier une conservation plus courte.

Références : Norme NF VO1-003. Lignes directrices pour l'établissement d'un protocole de test de vieillissement pour la validation de la durée de vie microbiologique (denrées périssables et réfrigérées).

DOCUMENT 6

Viande et produits de viande
Détermination de la teneur en L-hydroxyproline (méthode de référence)
Extrait de la norme NF 04-415

PRINCIPE :

La L-hydroxyproline est libérée par une hydrolyse à chaud des protéines de la viande, suivie d'une oxydation en milieu neutre. Les produits de cette oxydation forment des dérivés qui réagissent avec le réactif d'Ehrlich (ou PDMAB) pour donner un composé absorbant à une longueur d'onde de 558 nm.

REACTIFS :

- Hydrolysât (fiole jaugée de 100 mL)
- Poudre cristalline de L-hydroxyproline (soluble dans l'eau)
- Propan-1-ol
- Solution aqueuse de chloramine T à 10,5 % (solution A)
- Solution tampon à pH 6 (solution B)
- Acide perchlorique à 17,5 %
- PDMAB (contient de l'acide chlorhydrique concentré) à 5 % dans le propan-2-ol

MODE OPERATOIRE :

- L'hydrolysât a été obtenu à partir d'un échantillon de viande (4,00 g) minéralisé pendant 16 h (ébullition douce) en présence d'acide chlorhydrique, le tout ayant été neutralisé, transvasé dans une fiole jaugée de 100 mL et ajusté au trait de jauge avec de l'eau distillée.

- Préparation de la gamme étalon : à partir de la L-hydroxyproline en poudre, préparer une gamme étalon de solutions filles de concentrations comprises entre 0 et 20 $mg.L^{-1}$.

- Préparation de l'échantillon : compte-tenu des informations données sur la composition du muscle, effectuer la dilution adéquate de l'hydrolysât.

- Préparation du dérivé coloré :
    - introduire dans un tube à essai :
        - 0,5 mL de la gamme étalon ou de l'échantillon
        - 1 mL de propan-1-ol
        - 0,5 mL du mélange solution A/Solution B (1 mL/4 mL)
    - Agiter et laisser reposer 10 minutes
    - Introduire :
        - 1,5 mL d'acide perchlorique
        - 1 mL de PDMAB
    - Homogénéiser, mettre 15 minutes au bain-marie à 60°C, laisser refroidir
    - Ajouter 1,5 mL de propan-2-ol

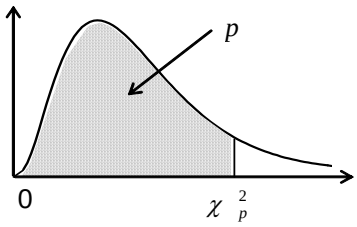
- Mesurer l'absorbance à 558 nm

DOCUMENT 7

Table du khi-deux

Fonction de répartition d'une variable du Khi2 à k degrés de liberté

Valeurs χ^2_p telles que $\text{Prob}(\chi^2 \leq \chi^2_p) = p$



k \ p	0,005	0,010	0,025	0,050	0,100	0,900	0,950	0,975	0,990	0,995
1	0,000	0,000	0,001	0,004	0,02	2,71	3,84	5,02	6,63	7,88
2	0,01	0,02	0,05	0,10	0,21	4,61	5,99	7,38	9,21	10,60
3	0,07	0,11	0,22	0,35	0,58	6,25	7,81	9,35	11,34	12,84
4	0,21	0,30	0,48	0,71	1,06	7,78	9,49	11,14	13,28	14,86
5	0,41	0,55	0,83	1,15	1,61	9,24	11,07	12,83	15,09	16,75
6	0,68	0,87	1,24	1,64	2,20	10,64	12,59	14,45	16,81	18,55
7	0,99	1,24	1,69	2,17	2,83	12,02	14,07	16,01	18,48	20,28
8	1,34	1,65	2,18	2,73	3,49	13,36	15,51	17,53	20,09	21,95
9	1,73	2,09	2,70	3,33	4,17	14,68	16,92	19,02	21,67	23,59
10	2,16	2,56	3,25	3,94	4,87	15,99	18,31	20,48	23,21	25,19
11	2,60	3,05	3,82	4,57	5,58	17,28	19,68	21,92	24,73	26,76
12	3,07	3,57	4,40	5,23	6,30	18,55	21,03	23,34	26,22	28,30
13	3,57	4,11	5,01	5,89	7,04	19,81	22,36	24,74	27,69	29,82
14	4,07	4,66	5,63	6,57	7,79	21,06	23,68	26,12	29,14	31,32
15	4,60	5,23	6,26	7,26	8,55	22,31	25,00	27,49	30,58	32,80
16	5,14	5,81	6,91	7,96	9,31	23,54	26,30	28,85	32,00	34,27
17	5,70	6,41	7,56	8,67	10,09	24,77	27,59	30,19	33,41	35,72
18	6,26	7,01	8,23	9,39	10,86	25,99	28,87	31,53	34,81	37,16
19	6,84	7,63	8,91	10,12	11,65	27,20	30,14	32,85	36,19	38,58
20	7,43	8,26	9,59	10,85	12,44	28,41	31,41	34,17	37,57	40,00
21	8,03	8,90	10,28	11,59	13,24	29,62	32,67	35,48	38,93	41,40
22	8,64	9,54	10,98	12,34	14,04	30,81	33,92	36,78	40,29	42,80
23	9,26	10,20	11,69	13,09	14,85	32,01	35,17	38,08	41,64	44,18
24	9,89	10,86	12,40	13,85	15,66	33,20	36,42	39,36	42,98	45,56
25	10,52	11,52	13,12	14,61	16,47	34,38	37,65	40,65	44,31	46,93
26	11,16	12,20	13,84	15,38	17,29	35,56	38,89	41,92	45,64	48,29
27	11,81	12,88	14,57	16,15	18,11	36,74	40,11	43,19	46,96	49,65
28	12,46	13,56	15,31	16,93	18,94	37,92	41,34	44,46	48,28	50,99
29	13,12	14,26	16,05	17,71	19,77	39,09	42,56	45,72	49,59	52,34
30	13,79	14,95	16,79	18,49	20,60	40,26	43,77	46,98	50,89	53,67
35	17,19	18,51	20,57	22,47	24,80	46,06	49,80	53,20	57,34	60,27
40	20,71	22,16	24,43	26,51	29,05	51,81	55,76	59,34	63,69	66,77
45	24,31	25,90	28,37	30,61	33,35	57,51	61,66	65,41	69,96	73,17
50	27,99	29,71	32,36	34,76	37,69	63,17	67,50	71,42	76,15	79,49
60	35,53	37,48	40,48	43,19	46,46	74,40	79,08	83,30	88,38	91,95
70	43,28	45,44	48,76	51,74	55,33	85,53	90,53	95,02	100,43	104,21
80	51,17	53,54	57,15	60,39	64,28	96,58	101,88	106,63	112,33	116,32
90	59,20	61,75	65,65	69,13	73,29	107,57	113,15	118,14	124,12	128,30
100	67,33	70,06	74,22	77,93	82,36	118,50	124,34	129,56	135,81	140,17