



Ce document a été mis en ligne par l'organisme [FormaV](#)®

Toute reproduction, représentation ou diffusion, même partielle, sans autorisation préalable, est strictement interdite.

Pour en savoir plus sur nos formations disponibles, veuillez visiter :

www.formav.co/explorer

**BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR AGRICOLE
E5 LABORATOIRE**

Option : ANABIOTEC

Durée : 180 minutes

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

Le sujet comporte 13 pages

SUJET

« Lait p'tits gourmands »

L'entreprise « Lait p'tits gourmands » fabrique des produits laitiers fermiers.

Elle se divise en deux unités :

- ➔ Une partie élevage bovin et production de lait.
- ➔ Un atelier de transformation du lait pour élaborer des fromages.

En pleine expansion, l'entreprise souhaite diversifier ses fabrications. Pour élargir sa clientèle, elle envisage la fabrication de yaourts. Dans cette optique, elle souhaite créer un laboratoire de contrôle qui lui permettra de maîtriser la qualité du produit.

Vous êtes nommé(e) au poste de responsable qualité au sein de cette entreprise.

Votre mission sera de mettre en place :

- Dans un premier temps, le contrôle qualité de la matière première et des produits finis sur la chaîne fabrication du yaourt.
- Puis la méthode HACCP pour la fabrication prévisionnelle de yaourts.

PARTIE 1 : Mise en place d'analyses biochimiques (8 points)

1. Indiquer le type et le domaine d'activité de ce laboratoire.
2. Expliquer brièvement pourquoi l'on cherche à maîtriser la qualité d'une production.

À réception de la matière première, le pH et la densité du lait sont vérifiés sur place. Vous devez aménager le laboratoire afin de pouvoir réaliser les mesures de matière grasse et de matière protéique.

3. Lister, en les justifiant et en vous aidant du **document 1**, les équipements et les installations nécessaires au bon déroulement de ces analyses, dans le respect des règles d'hygiène, de sécurité et de respect de l'environnement.

Votre laboratoire est dorénavant en mesure d'effectuer ces différentes analyses, à savoir l'analyse des matières grasses et de la matière protéique.

D'ici quelques semaines, un stagiaire viendra vous accompagner au laboratoire.

4. Indiquer la documentation nécessaire à mettre en place, de manière à le placer dans des conditions d'autonomie et de sécurité optimales.

PARTIE 2 : HACCP et plan de contrôle (5 points)

L'atelier de transformation est agréé par la DDCSPP (Direction Départementale de la Cohésion Sociale et de la Protection des Populations). La sécurité sanitaire des consommateurs doit être garantie. Pour cela, l'application de la méthode HACCP est obligatoire. Elle permet de réduire le risque sanitaire. Deux points critiques, liés à la maîtrise du danger microbiologique, ont été identifiés dans la fabrication des yaourts :

- CCP 1 : la pasteurisation ;
- CCP 2 : le conditionnement.

- 5.1. Justifier l'emplacement des deux points critiques à ces étapes de la fabrication, en vous référant aux **documents 3 et 4**.

Afin de surveiller le CCP1, vous utilisez un kit enzymatique (**document 2**) qui permet de mesurer l'activité de la phosphatase alcaline.

5.2. Justifier le choix de ce test.

5.3. Rédiger le plan de contrôle des étapes de pasteurisation et de conditionnement, en vous appuyant sur le **document 2**.

PARTIE 3 : Analyses microbiologiques (7 points)

Les autocontrôles concernant les entérobactéries et *Listeria monocytogenes* sont réalisés par un laboratoire extérieur sur le lait et les produits finis. Ils permettent de garantir la qualité sanitaire de la production mise sur le marché, suivant les recommandations du GBPH (Guide des Bonnes Pratiques d'Hygiène).

Quatre autocontrôles par an sont effectués sur la production des yaourts, selon la réglementation en vigueur figurant sur le **document 5**.

Les résultats obtenus lors d'un autocontrôle sont consignés dans le tableau suivant :

Unité d'échantillon	1	2	3	4	5
Entérobactéries (ufc/g)	24	3	32	5	121
<i>Listeria monocytogenes</i> (/25g)	Abs.	Prés.	Abs.	Prés.	Prés.

Abs. : absence Prés. : Présence

6.1. Interpréter ces résultats, en justifiant vos réponses.

6.2. Proposer les actions correctives adéquates sur le produit fini.

6.3. Dans le cadre de résultats non satisfaisants, émettre des hypothèses quant à l'origine de la contamination.

En parallèle, vous souhaitez comparer différentes méthodes de dénombrement des entérobactéries sur le lait. Pour ce faire, votre choix s'est porté sur deux méthodes de dénombrement alternatives que vous comparerez à la méthode de référence (**documents 6, 7 et 8**) :

- Méthode de référence, norme NF ISO 21528-2 (2004) ;
- Méthode alternative n°1 (Petrifilm) ;
- Méthode alternative n°2 (IDEXX).

7.1. Choisir en justifiant, parmi les deux méthodes alternatives, celle qui semble la plus adaptée à votre entreprise.

Le dénombrement avec les trois méthodes, à partir des mêmes dilutions de chacun des échantillons, a permis d'obtenir les résultats qui figurent dans le tableau ci-dessous :

Unité d'échantillon testé	Nombre d'UFC/mL		
	Méthode de référence	Méthode alternative n°1	Méthode alternative n°2
1	2	3	2
2	3	4	1
3	4	1	0
4	1	5	6
5	1	2	4
6	2	3	2
7	3	4	1
8	6	1	3
9	2	2	2
10	4	2	5

On souhaite comparer les résultats obtenus par la méthode que vous avez retenue à la question « 7.1. » avec ceux de la méthode de référence.

7.2. Mettre en œuvre un test statistique, en justifiant le choix effectué, permettant d'établir, au seuil de risque de 5 %, s'il existe une différence significative entre les résultats de la méthode de référence et la méthode alternative choisie (**document 9**).

7.3. Conclure quant à la pertinence de votre choix.

Liste des documents joints

Document 1 : Analyses physico-chimiques réalisées à la réception du lait

(Source : document produit pour les besoins de l'épreuve)

Document 2 : Fiche technique du Test Phosphatase Alcaline

(Source : Grosseron, 2018. FT0889001 – Test rapide de la phosphatase alcaline - version 01)

Document 3 : Diagramme de fabrication des yaourts

(Document élaboré pour les besoins de l'épreuve)

Document 4 : Arbre de décision CCP

(Source : extrait d'un document de la FAO : analyse des risques et points critiques (HACCP), 2011)

Document 5 : Document élaboré pour les besoins de l'épreuve, à partir des critères microbiologiques de la FCD (Fédération du commerce et de la distribution)

Document 6 : Méthode horizontale de dénombrement des *Enterobacteriaceae*

(Source : norme NF ISO 21528-2 (2004))

Document 7 : Méthode alternative n°1 de dénombrement des entérobactéries

(Source : www.3mfrance.fr)

Document 8 : Méthode alternative n°2 de dénombrement des entérobactéries

(Source : www.idexx.fr)

Document 9 : Tests de comparaison de 2 moyennes de 2 populations (Échantillons de petites tailles)

DOCUMENT 1

Analyses physico-chimiques réalisées à la réception du lait

1. Mesure du taux de matière grasse

Détermination de la teneur en matière grasse du lait dans un butyromètre.

Les éléments autres que la matière grasse sont dissous par l'acide sulfurique concentré. Puis par centrifugation avec action d'alcool isoamylique, la matière grasse se sépare en une couche quantitativement mesurable.

Protocole :

- Introduire 10 mL d'acide sulfurique concentré dans un butyromètre ;
- Ajouter 11 mL de lait, mesurés à la pipette à lait ;
- Ajouter 1 mL d'alcool isoamylique ;
- Boucher et homogénéiser par retournement (**réaction exothermique**) ;
- Centrifuger 5 min à 3 000 rpm ;
- Placer le butyromètre au bain-marie 5 min à 65 °C ;
- Lire dans la colonne graduée la taille de la couche de matière grasse.

Vider le butyromètre immédiatement après lecture et le nettoyer à l'eau de javel.

2. Mesure du taux de matière protéique

Détermination de la teneur en protéines du lait par dosage indirect après fixation du colorant noir amido.

Protocole :

- Introduire 1 mL de lait homogénéisé dans un tube à centrifuger ;
- Ajouter 20 mL de solution de noir amido ;
- Boucher et mélanger manuellement pendant 40 s ;
- Centrifuger 5 min à 350 g ;
- Prélever le surnageant ;
- Mesure l'absorbance à une longueur d'onde $\lambda = 550 \text{ nm} - 620 \text{ nm}$.

L'obtention de la teneur en matière protéique se fera à l'aide d'une gamme étalon.

Pour information : **Noir amido**



Source : document produit pour les besoins de l'épreuve

DOCUMENT 2

Fiche technique du Test Phosphatase Alcaline

0889001 – Test rapide de la Phosphatase Alcaline

Contenu du kit LACTO-PAST BIOMEDIX

- Réactif R1, 40 mL
- Réactif R2, 10 mL
- Réactif R3, 5 mL



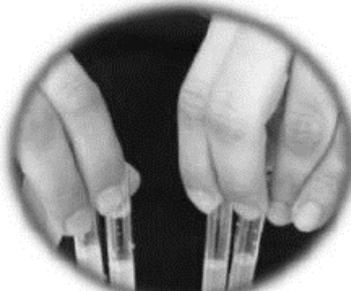
Equipement nécessaire (non fournis)

- Micropipette à volume variable 100 - 1000µL
- Micropipette à volume variable 0.5-10 µL
- Pointes adaptées aux micropipettes
- 100 tubes avec bouchons ou microtubes
- 1 portoir pour tubes ou microtubes
- 1 Flacon pour les déchets

Procédure :

1. Dans le portoir à tubes, placer autant de tubes que d'échantillons à vérifier. Les identifier.
Pour chaque tube à tester :
2. Prélever 400 µL du réactif R1 et l'ajouter au tube.
3. Changer de pointe et prélever 100 µL du réactif R2 pour l'ajouter au tube
4. Changer de pointe et prélever 10 µL du réactif R3 pour l'ajouter au tube
5. Changer de pointe et ajouter 8.3µL de l'échantillon de lait à examiner.
6. Fermer les tubes et les agiter pendant 5 secondes.

Interprétation des résultats :

<p>→ Positive (+) :</p> <p>Après 5 secondes, la couleur de l'échantillon passe au blanc. La pasteurisation du lait est réussie.</p>		<p>→ Négative (-)</p> <p>Après 5 secondes, la couleur de l'échantillon tourne au vert-jaune. La pasteurisation n'est pas réussie.</p>
---	---	---

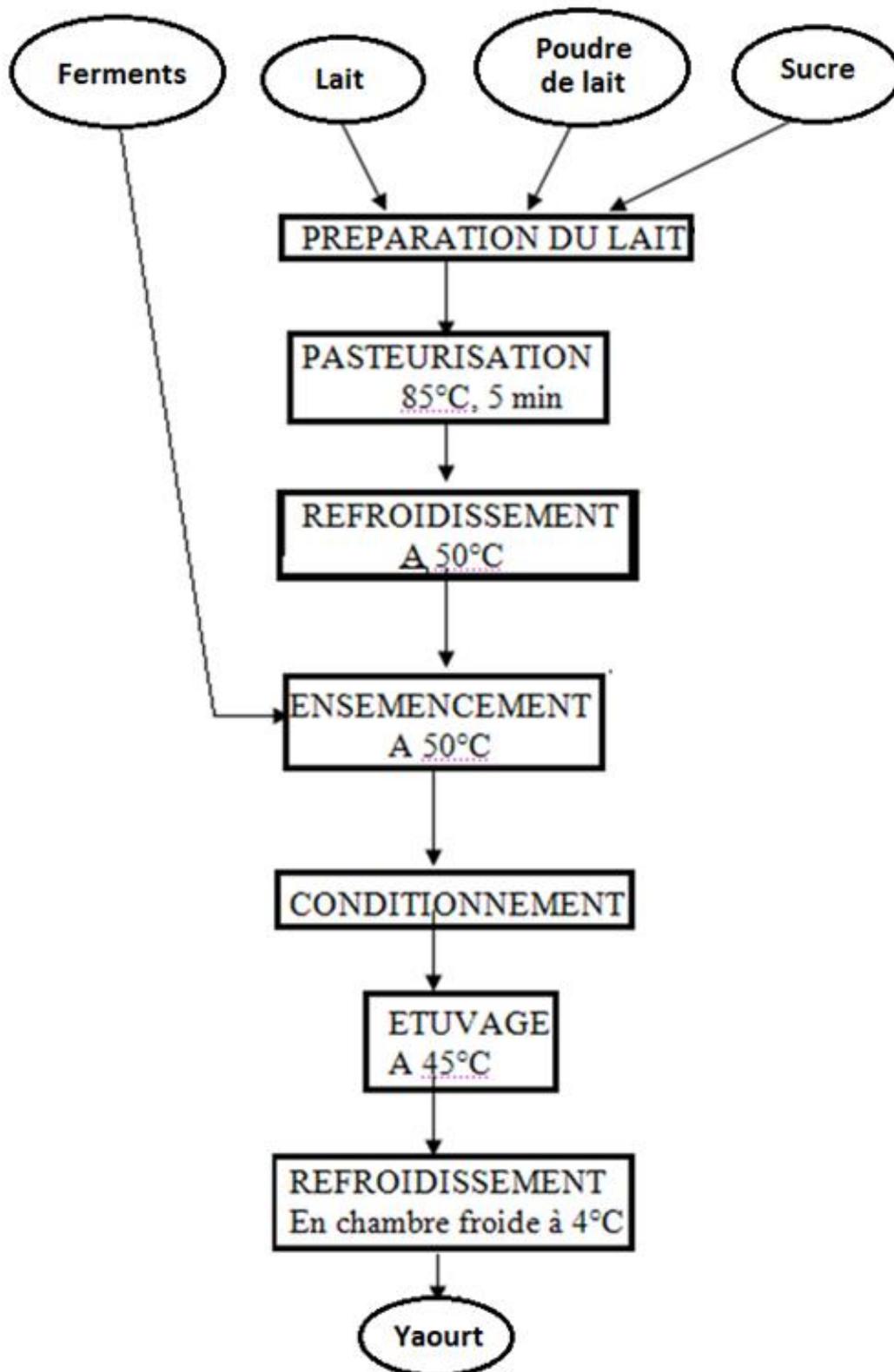
INFORMATIONS IMPORTANTES :

- Pour la réalisation du test, il n'y a pas besoin de préparation thermique de l'échantillon. Le test fonctionne à des températures comprises entre 2 et 42°C.
- Le kit avec les réactifs doit être entreposé au réfrigérateur à des températures de 2-8°C.

Source : Grosseron, 2018. FT0889001 – Test rapide de la phosphatase alcaline - version 01

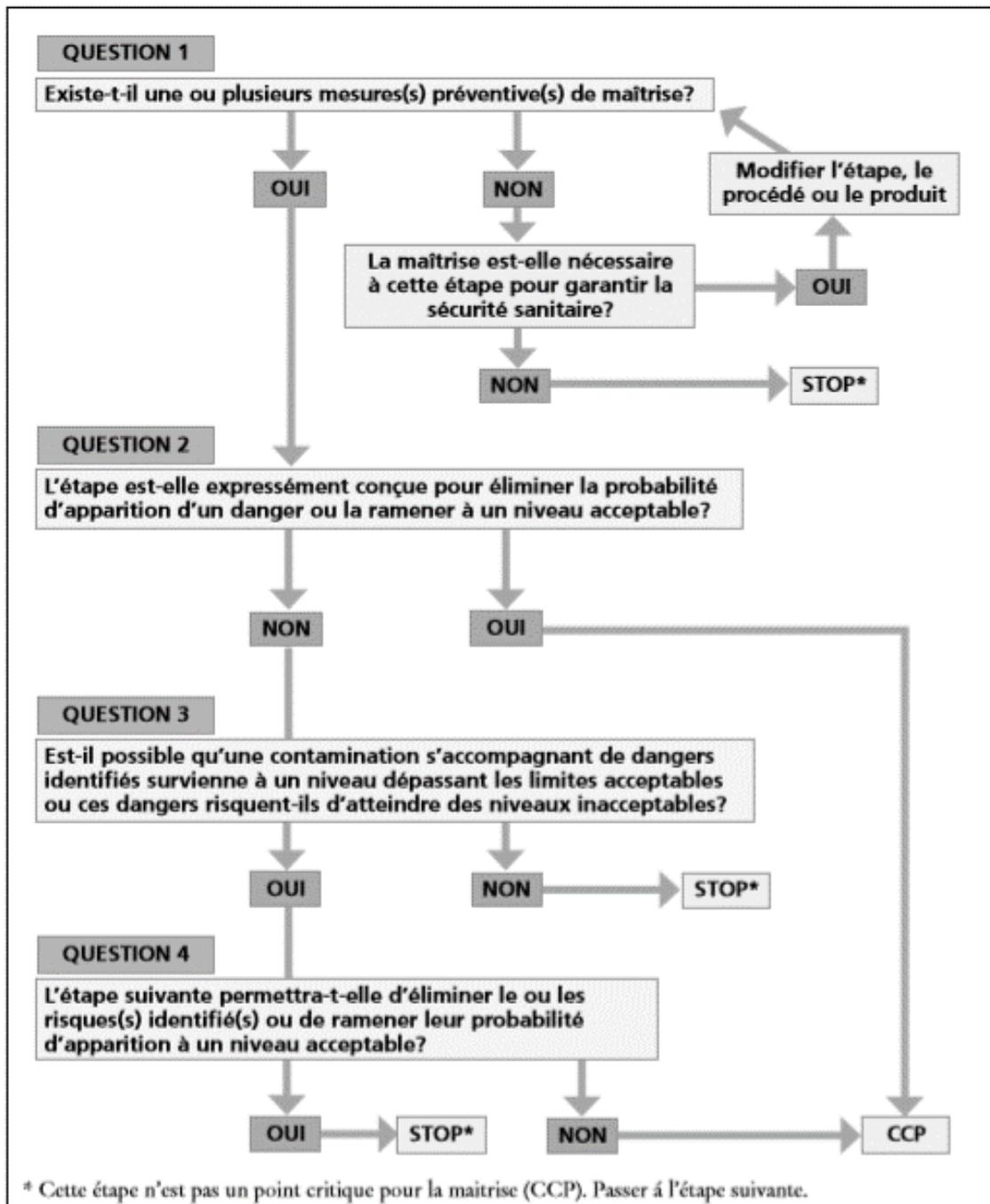
DOCUMENT 3

Diagramme de fabrication des yaourts



Document élaboré pour les besoins de l'épreuve

DOCUMENT 4
Arbre de décision CCP



Source : extrait d'un document de la FAO : analyse des risques et points critiques (HACCP), 2011

DOCUMENT 5

Document élaboré pour les besoins de l'épreuve à partir des critères microbiologiques de la FCD (Fédération du commerce et de la distribution)

Dénrée	Germe	Plan d'échantillonnage		Limites	
		n	c	m	M
9. Produits liquides à base de lait pasteurisé non fermenté	Germes à 30 °C	5	2	1 000 ufc/g	10 000 ufc/g
	Entérobactéries	5	2	1 ufc/g	10 ufc/g
	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	Absence dans 25 g	
10. Yaourt (yaourts, kéfirs) et laits fermentés	Entérobactéries	5	2	10 ufc/g	100 ufc/g
	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	Absence dans 25 g	

DOCUMENT 6

Méthode horizontale de dénombrement des *Enterobacteriaceae*

Suspension-mère en eau peptonée tamponnée et dilutions décimales en peptone-sel



1 mL par boîte (2 boîtes par dilution)



Ajout du milieu VRBG en surfusion en double couche



Incubation 24(+/-2) heures à 37(+/-1)°C



Comptage des colonies caractéristiques

Roses à rouges violettes (avec ou sans halo de précipitation)



Confirmation de 5 colonies caractéristiques (oxydase + fermentation du glucose)

Source : norme NF ISO 21528-2 (2004)

DOCUMENT 7

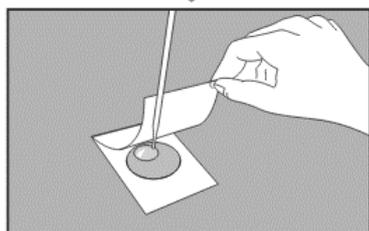
Méthode alternative n°1 de dénombrement des entérobactéries

3M

Petrifilm™

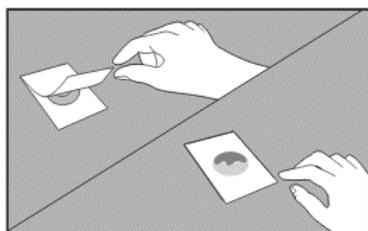
Test pour la Numération des Entérobactéries

Ensemencement



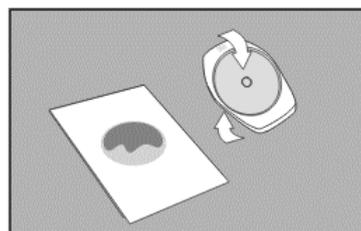
7 Placer le test Petrifilm CC sur une **surface plane**. Soulever le film supérieur.

Avec une pipette tenue **perpendiculairement** au test Petrifilm CC, déposer 1ml de l'échantillon dilué au centre du film inférieur.



8 **Recouvrir délicatement** avec le film supérieur de manière à éviter l'introduction de bulles d'air.

Ne pas laisser le film supérieur retomber brutalement.



9 Placer le diffuseur, **face lisse vers le bas**, au centre du film supérieur, au niveau de l'inoculum.

Etaler l'échantillon en exerçant une **légère pression** sur le diffuseur avant que le gel ne se forme. Ne pas tourner ou faire glisser le diffuseur.

Retirer le diffuseur. Attendre au minimum 1 minute pour permettre au gel de se solidifier.

Source : www.3mfrance.fr

DOCUMENT 8

Méthode alternative n°2 de dénombrement des entérobactéries

Tous les tests IDEXX se déroulent selon ces mêmes étapes très simples:



Les certificats de contrôle qualité de nos méthodes sont conformes à la norme ISO 11133:2014 et nous sommes accrédités selon l'ISO17025:2005

Pour commencer



1

Ajouter le réactif dans l'échantillon



2

Boucher le récipient et agiter-le pour mélanger l'échantillon.

Présence / Absence

OU

Quantification



3

Incuber l'échantillon pendant 12 à 24h.



3

Ajouter 2 gouttes de solution antimousse INEXX. Verser l'échantillon dans le plateau Quanti-Tray



4

Interpréter les résultats en vous référant à la notice du produit.



4

Fermer hermétiquement le Quanti-tray avec le Quanti-tray sealer, puis incuber le tout pendant 24h à 38°C.



5

Lecture des résultats en vous référant à la table IDEXX NPP (nombre le plus probable)

Source : www.idexx.fr

DOCUMENT 9

Tests de comparaison de 2 moyennes de 2 populations (Échantillons de petites tailles)

Échantillons appariés	Normalité	$T = \frac{\bar{D}}{\frac{S_D}{\sqrt{n-1}}}$ <p>T suit la loi de Student à $n - 1$ ddl</p>
	Non normalité	<p>X : variable aléatoire qui associe le nombre de différence positive ou négative</p> <p>X suit la loi binomiale $B(n ; \frac{1}{2})$</p> $p(X=k) = C_n^k \left(\frac{1}{2}\right)^n = \binom{n}{k} \left(\frac{1}{2}\right)^n$
Échantillons indépendants	Variances des populations connues	$U = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\frac{\sigma_1^2}{n_1} + \frac{\sigma_2^2}{n_2}}}$ <p>U suit la loi normale centrée réduite $N(0 ; 1)$</p>
	Variances des populations inconnues mais supposées égales	$T = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{S \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \text{ avec } S^2 = \frac{n_1 S_1^2 + n_2 S_2^2}{n_1 + n_2 - 2}$ <p>T suit la loi de Student à $n_1 + n_2 - 2$ ddl</p>
	Non normalité	Test de Mann-Whitney