EVALUATION DES COMPETENCES EXPERIMENTALES

SPECIALITE BIOTECHNOLOGIE

Contrôle de l'efficacité d'une opération de pasteurisation d'un lait utilisé pour la fabrication d'un fromage

La pasteurisation est un procédé de traitement thermique modéré (par exemple, chauffage à 72-76°C pendant 20 secondes) permettant de détruire tous les microorganismes pathogènes et de réduire la flore totale. Ce traitement permet une meilleure conservation des aliments. Le chauffage détruit aussi la plupart des enzymes.

Un fromage est préparé à partir d'un lait pasteurisé LP.

Pour contrôler l'efficacité du traitement thermique du lait pasteurisé (LP) utilisé pour la production d'un fromage, on se propose de mettre en œuvre 2 activités expérimentales:

- mesure de l'activité de la phosphatase alcaline (PAL) du lait LP par une méthode immunologique (**document n°1**) ;
- dénombrement des Entérobactéries du fromage fabriqué à partir de ce lait LP **(document nº2)**.

Réflexion préalable et préparation de la situation expérimentale :

1. **Dosage de la PAL du lait pasteurisé**
   - Après avoir lu le **document n°1**, compléter le tableau de préparation des étalons figurant sur le **document n°3** et le présenter à l'examinateur pour validation.
   - Construire le tableau des dépôts à réaliser : étalons et solution (LD) préparée à partir du lait pasteurisé.
   - Réaliser un organigramme du mode opératoire..

2. **Dénombrement des entérobactéries du fromage (document nº2)**
   - Donner la liste des réactifs et matériel nécessaires pour effectuer la manipulation décrite dans le **document nº2**.
   - Indiquer la précaution à prendre concernant la température de la gélose VRBG utilisée pour le dénombrement.

Réalisations pratiques :

1. **Dosage de la PAL du lait pasteurisé**
   Réaliser le dosage de la PAL sur la solution (LD) préparée à partir du lait pasteurisé en utilisant les **documents n°3(a)** et **3(b).**

1. **Dénombrement des entérobactéries du fromage**
   Réaliser le dénombrement des entérobactéries de la suspension mère du fromage S selon le **document n°2**.

Exploitations expérimentales :

1. **Dosage de la PAL du lait pasteurisé**

Le critère biochimique d'acceptabilité du procédé de pasteurisation du lait est donné dans le **document n° 4(a)**.

Le logigramme d'acceptabilité des mesurages est donné dans le **document n°5**.

1.1. Tracer la droite d'étalonnage A à 405 nm = f (*c*)

1.2. Déterminer la concentration d'activité PAL en milli-unité par litre (mU/L) pour la solution (LD) préparée à partir du lait pasteurisé et en déduire la concentration d'activité PAL pour le lait pasteurisé (LP).

1.3. Conclure sur l'efficacité du traitement thermique à l'aide du document 4a.

Données :

s_r = 600 mU/L

Document de travail

2. Dénombrement des entérobactéries du fromage

Le critère microbiologique d'acceptabilité du procédé de pasteurisation d'un fromage fabriqué à partir de lait pasteurisé est donné dans le **document n° 4(b)**.
Des résultats de dénombrement sont donnés dans le **document n°6**.

2.1. Calculer le nombre d'entérobactéries dans la suspension mère (S) du fromage et en déduire le nombre d'UC d'entérobactéries par gramme de fromage.
Rappel : on utilisera la formule donnée par la norme AFNOR

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

- **N** : nombre d'UFC par mL,
- **$\sum$C** : somme des colonies comptées sur toutes les boîtes retenues.
- **n_1** : nombre des boîtes retenues à la première dilution,
- **n_2** : nombre des boîtes retenues à la deuxième dilution,
- **d** : taux de dilution de la première dilution.
- **v** : volume de l'inoculum.

On choisira les boîtes comportant un nombre d'UFC compris entre 15 et 150.

2.2. Conclure en s'appuyant sur le **document n°4(b).**

3. Conclusion générale

A l'aide de l'ensemble des résultats, conclure sur l'efficacité du traitement thermique du lait.

Document de travail

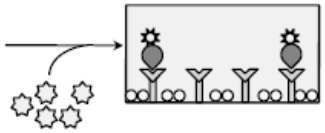
Document n°1 : PAL TEST Kit de dosage spécifique de la phosphatase alcaline bovine (PAL) dans les produits laitiers par méthode immunologique

PRINCIPE

1 – Extraction de la PAL du lait : récupération dans la phase aqueuse après extraction au butanol.
2 – Incubation dans les puits des plaques sensibilisées avec l'anticorps monoclonal anti PAL bovine.
3 – Fixation spécifique de la PAL du lait de vache

4 – Lavages élimination des PAL fongiques, bactériennes, des inhibiteurs et autres molécules non fixées

5 – Ajout du substrat paranitrophénylphosphate (*p*NPP) ou 1-4 nitrophénylphosphate



*p*NPP

Développement d'une coloration jaune dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de PAL capturée par l'anticorps monoclonal anti PAL bovine

6- Après addition de la solution d'arrêt, l'absorbance est lues à 405 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques. **Les résultats sont exprimés en milli-unité par litre (mU/L).**

REACTIFS ET MATERIEL

- Barrette de 16 puits sensibilisés avec un anticorps monoclonal spécifique de la PAL du lait de vache ;
- Adhésif pour barrettes 16 puits ;
- Réactif **R1** : Tampon de dilution pour la gamme et les échantillons ;
- Réactif **R2** : Solution mère étalon à 600 000 mU/L ;
- Réactif **R3** : Tampon de lavage ;
- Réactif **R4** : Substrat *p*NPP à 1 mg/mL ;
- Réactif **R5** : Solution d'arrêt 1,5M NaOH ;

MODE OPERATOIRE

1) Extraction de la PAL du lait : DEJA REALISEE.

Agiter vigoureusement l'échantillon afin d'en assurer l'homogénéité puis :
1. Prélever 3 mL de lait à l'aide d'une pipette automatique et les verser dans un tube en verre à usage unique. Ajouter 3 mL de butanol-1. Boucher le tube puis agiter vigoureusement à la main 5 à 10 s. Vortexer pendant 30 s. Centrifuger pendant 30 minutes entre 2500 g et 3500 g.
2. Récupérer la phase aqueuse sous le disque de crème à l'aide d'une pipette.
3. Diluer la phase aqueuse à l'aide du tampon de dilution R1 au 1/20.
Cette solution appelée LD est fournie au candidat.

2) Préparation des étalons

Préparer une solution fille à 15 000 mU/L comme suit : 50 µL R2 + 1950 µL R1.
A partir de la solution fille à 15 000 mU/L, préparer les étalons (Et1 à Et4) suivants : 5000, 3000,1000 et 500 mU/L.

Document de travail

3) Dosage

Il est recommandé d'analyser les étalons en simple et les échantillons en double.
Une barrette sensibilisée dont les puits sont remplis de solution de lavage est fournie.
1. Eliminer le tampon de lavage par retournement. Sécher en tapant la plaque retournée sur du papier absorbant.
2. Distribuer **100 µL** par puits des étalons ou échantillons dans les puits correspondants.
Recouvrir la plaque à l'aide de l'adhésif. Incuber **30 minutes sous agitation douce.**
3. Vider le liquide contenu dans les puits par retournement. Distribuer 300 µL de tampon de lavage (**R3**) dans chaque puits. Vider le liquide de lavage par retournement. Répéter l'opération 3 fois. Après le dernier lavage, éliminer les gouttelettes résiduelles en tapant la plaque retournée sur du papier absorbant propre et sec. *NB : Ne pas laisser sécher les puits entre deux étapes*
4. Distribuer **100 µL** de substrat (**R4**) dans chaque puits. Recouvrir à l'aide de l'adhésif et agiter doucement quelques secondes sur l'agitateur de plaques. Incuber **45 min** à 35-38°C.
5. Distribuer **50 µL** de solution d'arrêt (**R5**) dans chaque puits. Recouvrir à l'aide de l'adhésif et agiter doucement quelques secondes sur l'agitateur de plaques.
6. Retirer l'adhésif et lire l'absorbance à 405 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques.

Document nº2 : Dénombrement des entérobactéries en milieu gélosé.

MILIEU UTILISE

Gélose VRBG

Ingrédient	Quantité
Peptone pepsique de viande	7,0 g
Extrait autolytique de levure	3,0 g
Glucose	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	13,0 g
Eau	Qsp 1 L

pH 7,4 ± 0,2

Document de travail

MODE OPERATOIRE

1) Préparation de la suspension mère de fromage

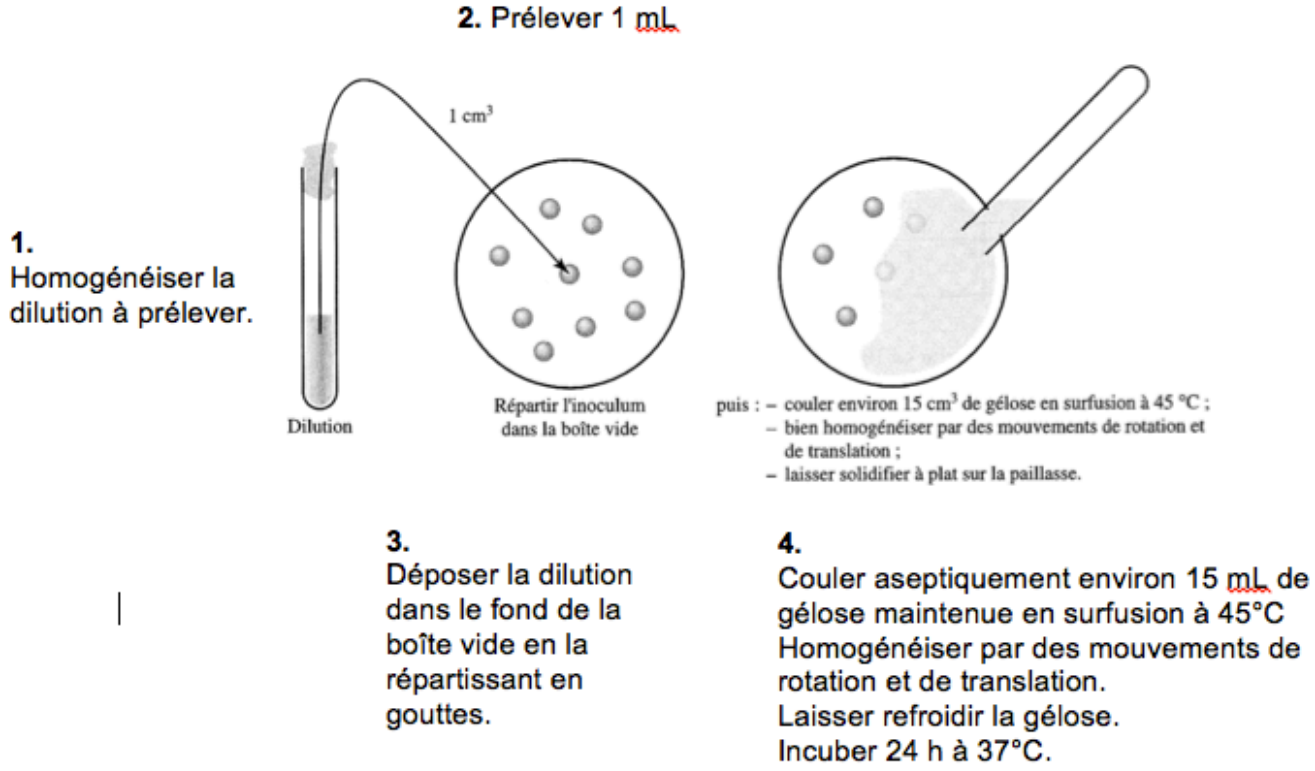
Une suspension mère de fromage est obtenue en broyant 10 g de fromage dans 90 mL de diluant.
La suspension S est fournie au candidat

2) Dilutions décimales de l'échantillon

Préparer 2 dilutions décimales du lait pasteurisé fourni : 10^{-1}, 10^{-2}

3) Ensemencements

Réaliser un ensemencement en double essai de la suspension mère de fromage et de chaque dilution décimale de cette suspension selon le protocole suivant.



3) Lectures

Les entérobactéries présentent des colonies violet-rouges, entourées ou non d'un halo violet de sels biliaires précipités.

Document n°3 : Préparation des étalons
Document à présenter à l'examinateur

	Et1	Et2	Et3	Et4
$c_{\text{étalon}}$ (mU/L)	5000	3000	1000	500
Solution fille à 15 000 mU/L (µL)				
R1 (µL)	200	300	700	725

Document nº4

Document nº4(a) : Critère biochimique d'acceptabilité du procédé de pasteurisation du lait

Grandeur mesurée	Limite	Stade d'application du critère	*Action en cas de résultat insatisfaisant*
Activité de la phosphatase alcaline	< 700 mU/L	Fin du procédé de fabrication	Contrôle du traitement thermique

Document nº4(b) : Critère microbiologique d'acceptabilité pour un fromage à base de lait ayant subi un traitement thermique

Micro-organismes	Plan échantillonnage		Limites		Méthodes d'analyse de référence	Stade d'application du critère	*Action en cas de résultat insatisfaisant*
	n	c	m	M			
Entérobac-téries	2	1	100 ufc/g	1000 ufc/g	ISO 21528-2	Fin du procédé de fabrication	Contrôle de l'efficacité du traitement thermique de la matière première et prévention de la recontamination

n : nombre d'unités formant l'échantillon, devant être prélevé au hasard dans un lot. *n* représente la taille de l'échantillon.

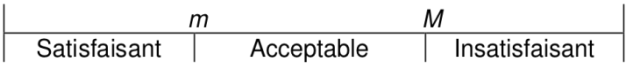
***c* :** représente le nombre maximal permis d'unités d'échantillon de qualité acceptable. Si le nombre d'unités de qualité acceptable est supérieur à *c*, le lot d'où provient l'échantillon est inacceptable.

m : limite des concentrations de microorganismes correspondant à une qualité microbiologique satisfaisante, concentrations habituellement exprimées par nombre d'UFC (unités formant colonie) par g ou mL.

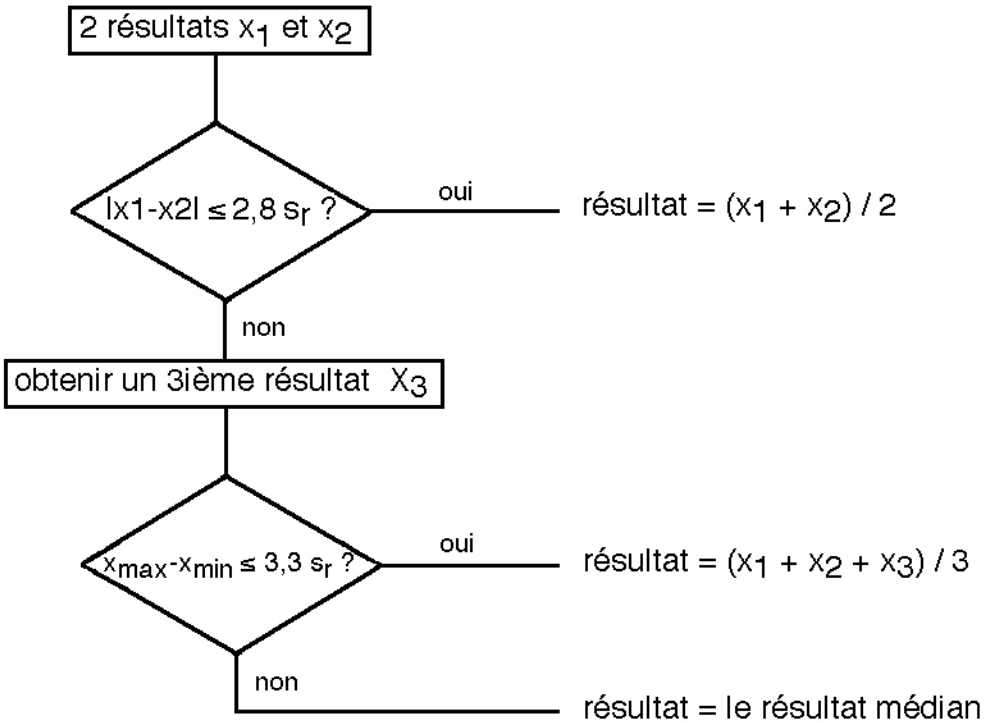
M : limite des concentrations insatisfaisantes de microorganismes, habituellement exprimées par nombre d'UFC par g ou mL. Son dépassement correspond à des conditions inacceptables, non contrôlées et/ou présentant un risque pour la santé, selon le critère. *M* distingue les unités de qualité acceptable de celles qui sont de qualité insatisfaisante. Si la valeur d'une seule unité d'échantillon est supérieure à *M*, l'unité d'échantillon ou le lot d'où provient l'échantillon est inacceptable.

Interprétation selon un plan à 3 classes

Document d'travail



Document nº5
Acceptabilité des résultats d'essais
Plan à 2 résultats obtenus pour débuter et troisième résultat supplémentaire éventuellement déterminé (en condition de répétabilité)



Document nº6 : Résultats du dénombrement des entérobactéries pour la suspension mère de fromage

Dilution de la suspension mère S du fromage	10^0	10^{-1}	10^{-2}
Essai 1 (nombre d'UFC)	123	18	1
Essai 2 (nombre d'UFC)	102	20	2

Document de travail

Document de travail