

1 Etude de la fabrication du Saint-Nectaire

Les différentes étapes de la fabrication du Saint Nectaire fermier sont présentées sur deux supports en **annexe 1** :

- un diagramme de fabrications comparées du Saint-Nectaire fermier et laitier.
- un support numérique, à visionner sur l'ordinateur mis à disposition : « Le fromage Saint-Nectaire fermier du Fayet » (3'45)
<http://www.youtube.com/watch?v=VdsbQNlb6Jo>

1.1 Visionner la vidéo sur l'ordinateur mis à disposition

1.2 A l'aide de la vidéo, compléter le diagramme de fabrication du Saint-Nectaire imprimé sur transparent à l'aide des mots clés et expressions proposés ci-dessous :

soutirage du « petit lait » ou lactosérum / moulage / salage / emprésurage ou ajout de la présure / décaillage ou découpage du caillé / pressage / mise en cave d'affinage .

1.3 Comparer les diagrammes de fabrication d'un Saint-Nectaire fermier et d'un Saint-Nectaire laitier et en déduire la (les) différence(s) fondamentale(s) entre les deux procédés et les conséquences qui peuvent en découler au niveau microbiologique et organoleptique.

Le travail effectué sera présenté au cours d'un **entretien de 10 minutes**.

2 Valorisation d'un sous-produit de la fabrication du Saint-Nectaire : le lactosérum ou « petit lait »

Les documents en **annexe 2** présentent différentes données relatives au lactosérum: composition, intérêt, production, problèmes environnementaux et valorisation, **l'annexe 3** présente des données sur le marché mondial du lactosérum.

A partir de l'exploitation de ces documents, présenter les raisons conduisant à valoriser le lactosérum. Un **exposé de 10 minutes sera suivi par 10 minutes d'entretien** avec le jury.
Un plan détaillé rédigé sur transparent(s) servira de support à la présentation orale.

1 Contrôle au laboratoire de la pasteurisation du lait

1.1 Etude préliminaire

1.1.1 Principe du contrôle

La fabrication laitière du Saint-Nectaire requiert du lait pasteurisé. La pasteurisation du lait cru autrefois réalisée à 60°C pendant 30 minutes (appelée basse pasteurisation) est maintenant remplacée en laiterie par une pasteurisation à 72°C pendant 20 secondes (appelée haute pasteurisation).

La destruction des micro-organismes pathogènes visée par le traitement thermique est corrélée à la disparition de certaines enzymes thermosensibles naturelles du lait. En effet le lait cru possède une

activité phosphatase alcaline qui disparaît quel que soit le type de pasteurisation et une activité peroxydase qui disparaît après une haute pasteurisation. Ainsi l'efficacité de la pasteurisation peut être vérifiée par la recherche de l'activité de ces deux enzymes.

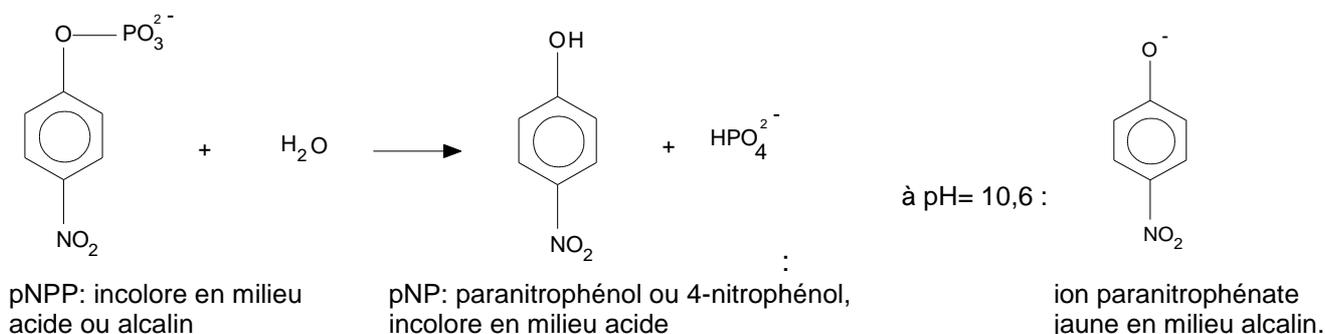
Q1.1. Compléter le tableau ci-dessous par des signes + (présence de l'enzyme) ou – (absence de l'enzyme).

	<i>Phosphatase alcaline</i>	<i>Peroxydase</i>
<i>Lait cru</i>		
<i>Lait (basse pasteurisation)</i>		
<i>Lait (haute pasteurisation)</i>		
<i>Lait stérilisé</i>		

1.1.2 Principe de la recherche de la phosphatase alcaline

Pour rechercher l'activité, il suffit d'ajouter un substrat incolore qui, après action de l'enzyme, donne un produit coloré. Le substrat utilisé est le 4-nitrophénylphosphate disodique (para-nitrophenylphosphate disodique) ou pNPP.

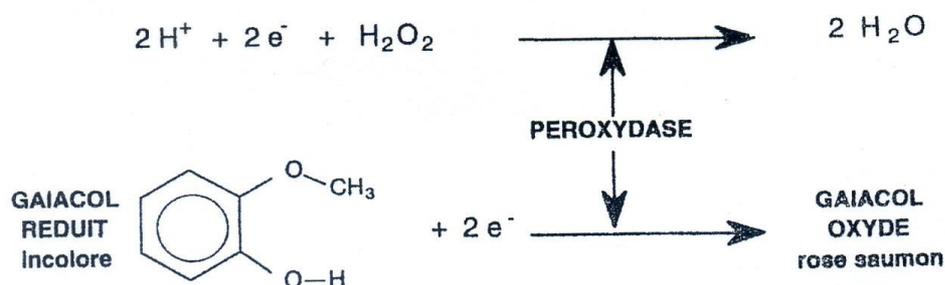
La phosphatase alcaline (PAL) catalyse l'hydrolyse du paranitrophénylphosphate disodique (pNPP) en ion paranitrophénate jaune à pH = 10,6 et à une T°C optimale proche de 35°C.



Q1.2. Discuter l'importance des conditions physicochimiques opératoires (températures et pH).

1.1.3 Principe de la recherche de la peroxydase (réaction de Dupouy)

La peroxydase catalyse un transfert d'électrons d'une molécule organique réduite sur le peroxyde d'hydrogène ou eau oxygénée. Pour mettre en évidence cette activité enzymatique, Dupouy propose d'utiliser le gaïacol, une molécule organique incolore sous forme réduite qui devient rose-saumon après oxydation.



Q1.3. Un gaiacol mal conservé pourrait être oxydé. Proposer un contrôle simple qui permet de s'assurer de la bonne qualité du gaiacol.

Q1.4. Consulter l'extrait de la fiche de sécurité du gaïacol en **annexe 3** et énoncer les mesures de protection à mettre en place pour son utilisation.

Q1.5. Un témoin positif et un témoin négatif doivent être réalisés parallèlement au contrôle des échantillons de laits pasteurisés ; préciser la composition de chacun pour chaque recherche enzymatique.

1.2 Réalisation pratique

- Objectifs :**
- Contrôler l'efficacité de la pasteurisation de 2 laits notés «LP 101 » pour l'un et «LP 102 » pour l'autre.
 - Valider la série de mesures par la réalisation de témoins positif et négatif.

Matériels et réactifs fournis:

Laits pasteurisés à contrôler notés LP101 et LP102,
Lait cru
Lait stérilisé
pNPP en poudre
Solution tampon (pH=10,6)
Solution saturée de gaiacol
Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à 900 mmol.dm^{-3} (10 volumes).
Tubes à vis propres et secs et leurs bouchons
Bain thermostaté à 35°C
Pipettes graduées en verre et en plastique
Propipette
Pipette automatique de 1 cm^3 et cônes bleus
Eprouvette de 100 ou 200 cm^3 .
1 flacon en verre brun de 150 cm^3

1.2.1 Recherche de la phosphatase alcaline

a- Préparation de la solution tamponnée de pNPP

Substrat : 4 nitrophénylphosphate disodique (pNPP)
Solution tampon: carbonate de sodium 3,5 g; hydrogénocarbonate de sodium 1,5 g pour 1 dm^3 d'eau (pH=10,6)
Dans le flacon brun, peser 0,015 g de substrat, ajouter 100 cm^3 de solution tampon pH = 10,6, agiter pour dissoudre.

b- Mode opératoire pour la réalisation de l'essai et des témoins

Placer dans un tube 5 cm^3 de solution tamponnée de pNPP. Le boucher et le porter 2 min à 35°C (préchauffage).
Ajouter 1 cm^3 de lait.
Mélanger puis incuber dans un bain thermostaté à 35°C .
Faire une lecture visuelle après 10 min.

1.2.2 Recherche de la peroxydase dans le lait (réaction de Dupouy)

Mode opératoire pour la réalisation de l'essai et des témoins

Placer dans un tube:
- 2 cm^3 de lait
- 2 cm^3 de solution saturée de gaiacol (à prélever avec une pipette en verre)
Agiter légèrement et ajouter
-0,5 mL d' H_2O_2 . Ne pas agiter.
Placer le tube dans le bain thermostaté à 35°C .
Observer après 1 minute.

1.3 Présentation et exploitation des résultats

- Rendre compte des résultats dans le tableau en **annexe A**.
- Rappeler les résultats attendus pour les témoins et commenter ceux obtenus.
- Conclure sur les échantillons de laits pasteurisés analysés.

ANNEXE A : (à compléter et à rendre avec la copie)

Poste :.....

	Phosphatase alcaline		Peroxydase	
	Observation	Interprétation	Observation	Interprétation
Témoin +				
Témoin –				
LP101				
LP102				

2 Dosage d'entérotoxines de *Staphylococcus aureus* dans un broyat de fromage

2.1 Etude préliminaire

Les *Staphylococcus aureus* peuvent produire plusieurs types d'entérotoxines, nommées A, B, C, D, E, F. Ce sont de petites protéines thermostables. L'entérotoxine A est la plus fréquemment rencontrée lors d'une intoxication alimentaire due à un Staphylocoque.

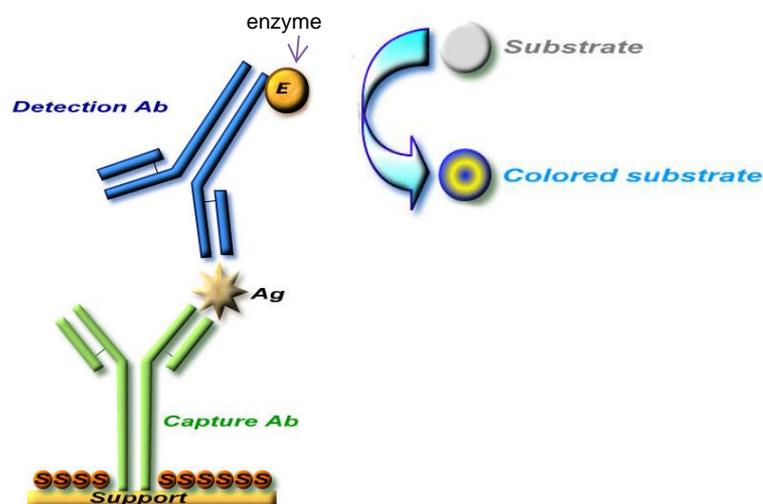
De nombreux aliments sont susceptibles de contenir cette toxine, en particulier le lait et les produits laitiers.

Certaines études montrent que l'ingestion de seulement 100 à 200 ng d'entérotoxine staphylococcique peut déclencher des symptômes d'intoxication. C'est pourquoi leur détection dans les aliments nécessite des techniques permettant de déceler de faibles concentrations de ces molécules.

L'immunoenzymologie ELISA est une des méthodes les plus utilisées. Elle repose sur la formation de liaisons entre anticorps et antigènes spécifiques ; ces liaisons étant mises en évidence par une réaction colorée due à la fixation d'une enzyme sur les complexes anticorps-antigène.

Il existe plusieurs variantes de la méthode ELISA ; celle qui sera utilisée lors de l'analyse proposée sera une méthode dite « ELISA sandwich ».

Q2.1. A partir du schéma ci-dessous justifier l'appellation « ELISA sandwich ».



2.2 Réalisation pratique

La manipulation suivante vise à évaluer la concentration d'une entérotoxine A éventuellement présente dans un fromage.



La manipulation peut être interrompue à la fin de chaque lavage. Il faut alors laisser le tampon PBS simple dans les cupules. Il suffira de vider les cupules plus tard pour reprendre le cours de l'analyse.

2.2.1 Préparation de l'échantillon (déjà réalisée)

20 g de fromage ont été broyés dans 20 mL de tampon d'extraction. La suspension obtenue a été laissée au repos 20 minutes pour assurer la diffusion de la toxine éventuellement présente dans l'échantillon.

La suspension a été filtrée pour éliminer les particules alimentaires. Le dosage sera réalisé sur le filtrat aqueux récupéré.

2.2.2 Matériel et réactifs

● Pour le groupe :

- Gants
- Agitateur de microplaques et lecteur de microplaque

- Etuve à 37°C

● **A chaque poste :**

- 8 tubes à hémolyse sur leur portoir
- Pipettes automatiques P200, P1000 et leurs cônes
- Microplaque sensibilisée + Film autocollant
- Flacon contenant 50 mL de tampon de lavage : « **PBS tween** »
- Flacon contenant 10 mL de tampon « **PBS** »
- Tube contenant 2,5 mL de tampon de dilution à pH = 7,2 : « **Td** »
- Tube contenant 1 mL de solution étalon d'entérotoxine A à 10 ng/mL : « **étalon** »
- Tube contenant 0,5 mL du filtrat à doser : « **F** »
- Tube contenant 3,5 mL d'une solution d'anticorps anti-entérotoxine A sur lesquels on a fixé de la phosphatase alcaline : « **Ac-Enzyme** »
- Un tube contenant 3,5 mL de substrat de l'enzyme : « **substrat** »
- Un tube contenant 1 mL d'une solution de NaOH à 3 mol.L⁻¹ : « **stop** »
- Un cristalliseur contenant du désinfectant
- Du papier absorbant

2.2.3 Protocole ➡ *porter des gants*

2.2.3.1 Préparation des solutions étalons

Dans les tubes à hémolyse vides, préparer une gamme de sept dilutions de la solution « étalon » d'entérotoxine, en tampon de dilution « Td ». On réalisera des dilutions successives de raison 1/2, le volume final par tube sera de 200 µL.

tubes	1	2	3	4	5	6	7
Volume de Td en µL	200	200	200	200	200	200	200
Volume de solution étalon en µL	200						
Volume à prélever dans le tube précédent en µL		200	200	200	200	200	200

2.2.3.2 Dilution de l'échantillon « F »

Dans un tube à hémolyse, diluer le filtrat à tester au 1/2 en tampon de dilution Td : préparer 300 µL de cette dilution.

2.2.3.3.Sensibilisation de la microplaque (déjà réalisée)

La paroi des cupules des colonnes 1 et 2, **sauf A1**, a été tapissée par des anticorps anti-entérotoxine A.

Toutes les cupules des colonnes 1 et 2 ont été ensuite traitées de manière qu'aucune substance ne puisse aller se coller spontanément sur le plastique.

Les cupules sont remplies d'un tampon spécial.

2.2.3.4. Etapes du dosage

♦Vider les cupules par retournement de la microplaque au-dessus du cristalliseur ; poser la microplaque retournée sur le papier absorbant et tapoter pour parfaire l'égouttage ;

♦Procéder à 3 lavages successifs des cupules des colonnes 1 et 2 avec du PBS tween : pour chaque lavage déposer 200 µL de tampon PBS tween dans chaque cupule, laisser agir 10 secondes puis vider dans le cristalliseur.

Finir par un lavage par le tampon PBS simple, vider et égoutter sur papier absorbant ;

Rappel : la manipulation peut être interrompue à ce stade en laissant le tampon PBS simple dans les cupules.

♦Déposer les étalons, le filtrat, sa dilution et le tampon Td comme indiqué ci-dessous, à raison de 100µL par cupule :

	Colonne 1	Colonne 2
A	Etalon à 10 ng/mL	Etalon à 10 ng/mL
B	Tampon de dilution Td	Dilution étalon tube 7
C	Etalon à 10 ng/mL	Dilution étalon tube 6
D	Etalon à 10 ng/mL	Dilution étalon tube 5
E	F	Dilution étalon tube 4
F	F	Dilution étalon tube 3
G	F au ½	Dilution étalon tube 2
H	F au ½	Dilution étalon tube 1

Couvrir la plaque avec le film autocollant et incuber 30 minutes à 37°C ;

♦Vider les cupules et réaliser 3 lavages en PBS tween et un dernier en PBS. Egoutter ;
Rappel : pause possible en laissant le PBS simple dans les cupules.

♦Dans toutes les cupules **sauf C1**, ajouter 200 µL d' « anticorps-enzyme ». Dans la cupule C1 déposer 200 µL de tampon Td ;
 Couvrir la plaque avec le film autocollant et incuber 30 minutes à 37°C ;

♦Vider les cupules et réaliser 3 lavages en PBS tween et un dernier en PBS. Egoutter ;
Rappel : pause possible en laissant le PBS simple dans les cupules.

♦Dans toutes les cupules **sauf D1**, ajouter 200 µL de « substrat ». Dans la cupule D1 déposer 200 µL de tampon Td.
 Couvrir la plaque avec le film autocollant et incuber 5 minutes à 37°C ;
 ♦Arrêter la réaction colorée en ajoutant 50 µL de solution « stop » dans chaque cupule. Agiter 30 secondes.

♦ Dans le lecteur de plaques, lire les absorbances à 405 nm contre l'air.

2.3 Présentation et exploitation des résultats

2.3.1. Expliquer grâce à des schémas ce qui se produit dans la cupule A2 lors des différentes étapes de la manipulation.

2.3.2. Justifier la nécessité des lavages.

2.3.3. Indiquer comment doit varier l'absorbance dans les cupules de la colonne 2. Justifier la réponse.

2.3.4. Les cupules A1, B1, C1, D1 correspondent à des témoins. Récapituler ce que contient chacune de ces cupules et en déduire le rôle de chaque témoin.

2.3.5. Compléter le tableau de résultats en **annexe B**.

2.3.6. Commenter les résultats des témoins.

2.3.7. A partir des résultats des étalons tracer la courbe $A_{405\text{ nm}} = f(\log \text{ concentration en entérotoxine})$

2.3.8. Déterminer la concentration en entérotoxine dans le filtrat « F ». En déduire la teneur en entérotoxine dans le fromage en ng/g d'aliment.

ANNEXE B :

A compléter et à rendre avec la copie

Poste :

	A1	B1	C1	D1	E1	F1	G1	H1
A 405 nm								
C entérotoxine (ng/mL)								
log C								

	A2	B2	C2	D2	E2	F2	G2	H2
A 405 nm								
C entérotoxine (ng/mL)								
log C								