

POINTS CRITIQUES ET TENDANCE DES METHODES KJELDAHL ET NOIR AMIDO

La méthode Kjeldahl et la méthode au Noir Amido sont deux méthodes distinctes dans leur principe. Mais, pour des raisons d'histoire et/ou de commodité, les laboratoires ont le choix d'utiliser l'une ou l'autre pour le dosage de routine des protéines ou pour le calibrage infra-rouge. Puisque la méthode au Noir Amido est calibrée par rapport à la méthode Kjeldahl, la comparaison des résultats obtenus par différents laboratoires ne doit pas, en principe, poser de problème. Mais ces méthodes comportent de nombreux points critiques. Tout défaut de maîtrise risque alors d'aboutir à des différences. Pour les éliminer, il faudra donc analyser méthodiquement les points critiques recensés dans la mise en oeuvre de chacune des méthodes.

La méthode Kjeldahl est la méthode de référence par excellence pour doser l'azote des produits agroalimentaires, et notamment du lait et des produits laitiers. Cependant, c'est la méthode au Noir Amido, de mise en oeuvre plus facile, mais néanmoins calibrée par rapport à la méthode Kjeldahl, qui a été choisie pour assurer de manière suffisamment économique les analyses de routine des protéines.

Actuellement la méthode Noir Amido tend à devenir méthode de référence secondaire dans de nombreux laboratoires où la spectrophotométrie infra rouge est utilisée comme méthode de routine. Mais parallèlement, d'autres laboratoires préfèrent, dans ce cadre, s'en tenir à la méthode Kjeldahl comme méthode de référence.

La coexistence de ces deux méthodes, de principe distinct, pour calibrer l'infra rouge, ou même pour doser en routine les protéines, ne devrait en principe pas poser de problème de comparaison entre laboratoires dans la mesure où l'une est calibrée par rapport à l'autre et que dans les deux cas elles sont correctement mises en oeuvre. Il importe pour cela de se montrer particulièrement attentif aux points critiques de chaque étape de l'une et l'autre méthode :

- minéralisation, distillation et titration pour la méthode Kjeldahl;
- système de prise d'essai, agitation, séparation du coagulum et mesure photométrique pour la méthode au Noir Amido

Historiquement, deux méthodes de dosage coexistent

La méthode Kjeldahl est reconnue et normalisée depuis fort longtemps au niveau international, dans la quasi totalité des pays à productions laitières, quel que soit, par ailleurs le mode d'expression de la matière azotée. Elle est basée sur la minéralisation de l'échantillon par chauffage; suivie de l'alcalinisation des produits de la réaction et de la titration de l'ammoniaque libéré.

La méthode Noir Amido, plus simple à mettre en oeuvre, est basée sur la formation d'un complexe insoluble entre le colorant et les protéines, puis sur la mesure de l'absorbance de la solution qui reste après l'élimination du complexe.

Lors de la mise en place des premiers laboratoires interprofessionnels et de contrôle laitier, l'INRA de Poligny a eu pour mission d'assurer le contrôle et la garantie de la qualité des

résultats d'analyses par la méthode au Noir Amido. D'où la mise en place d'un système de calibrage centralisé par envois mensuels d'échantillons de référence, service repris et développé depuis 1990 par CECALAIT. Ces échantillons de référence permettent depuis de calibrer les systèmes noir amido en place, en équivalent-Kjeldahl.

Parallèlement, depuis les années soixante-dix, la spectrophotométrie infra rouge, en se développant, supplante peu à peu la méthode au Noir Amido, en tant que méthode de routine, tandis que cette dernière se généralise progressivement dans les laboratoires d'entreprises en raison de sa rapidité et de sa simplicité d'utilisation.

La méthode au Noir Amido ne disparaît pourtant pas des laboratoires laitiers de grande routine mais prend dès lors le statut de méthode de référence secondaire pour les appareils infra rouge. En effet, les étalons pour noir amido ne peuvent être utilisés pour l'infra rouge qui, en raison de son principe, doit être calibré par chaque laboratoire à l'aide de laits de sa zone de collecte. L'objectif est alors de favoriser un système qui permette d'optimiser la reproductibilité de la méthode de référence choisie pour les laboratoires. La méthode au Noir Amido et son système de calibrage centralisé répondent mieux à cet objectif que la méthode Kjeldahl, plus lourde, plus difficile et plus coûteuse.

C'est ce système qui est encore en place à l'heure actuelle pour l'activité paiement du lait et contrôle laitier et que tendent à utiliser à présent, de plus en plus nombreuses, les entreprises laitières qui ont franchi le pas de l'infra rouge. D'autres préfèrent en toute légitimité, opter pour l'usage de la méthode Kjeldahl.

Toutefois, le Journal Officiel fixe la méthode Kjeldahl comme méthode de référence; pour le paiement du lait. Dans le même document, il définit la méthode au Noir Amido comme la méthode officielle pour le paiement du lait, à calibrer par rapport à la méthode de référence. Les appareils infra rouge n'apparaissent que comme des instruments agréés d'emploi individuellement.

Puisque la méthode au Noir Amido est calibrée par rapport à la méthode Kjeldahl, la comparaison entre laboratoires ne devrait pas poser problème. Si ce n'est pas le cas, c'est que l'une ou l'autre des méthodes n'est pas correctement mise en oeuvre. Il faut alors examiner attentivement leur déroulement, qui comporte de nombreux points critiques.

🔗 LES POINTS CRITIQUES DE LA METHODE KJELDAHL

① MINERALISATION

Les points critiques à surveiller lors de cette étape sont :

- * la qualité des différents réactifs (acide, catalyseur),
- * les quantités relatives entre prise d'essai et différents réactifs,
- * la température et le temps de minéralisation.

Un défaut de maîtrise aboutit à une minéralisation insuffisante ou à de la surchauffe, avec risque de vaporisation et de pyrolyse. Dans les deux cas, les résultats obtenus auront tendance à être minorés.

② DISTILLATION

Ici les points critiques à considérer concernent :

- * le déplacement total de l'ammoniaque par la soude, qui doit être en excès,
- * l'entraînement complet de l'ammoniaque déplacé ; le distillat doit être en volume suffisant,
- * la fixation complète de l'ammoniaque distillé par l'acide borique ; il faut surveiller la quantité de solution, sa concentration, l'agitation,
- * l'absence de fuite dans le système

Le défaut de maîtrise entraînera une récupération partielle de l'azote, d'où, à nouveau une tendance à des résultats sous-estimés.

③ TITRATION

L'ajustement et/ou la correction du « blanc » ainsi que la justesse du titre de l'acide de titration -dont la concentration est susceptible d'augmenter par évaporation au cours du temps - constituent les points critiques de cette étape. En règle générale, une maîtrise insuffisante de ces deux points aboutit de même, à des résultats plutôt par défaut.

🔗 LES POINTS CRITIQUES DE LA METHODE NOIR AMIDO

① TOUT SYSTEME DE PRISE D'ESSAI

Le point critique lors de la prise d'essai est le risque de moussage des échantillons d'étalonnage. L'air est, en effet facilement émulsifiable dans les ETG non gras à 25, 30, 36 g/kg. D'où l'importance de la méthode utilisée pour le rinçage et la purge de la seringue. Un volume de prise d'essai trop faible est cause d'une sous-évaluation de l'étalonnage et induit un réajustage à la hausse non nécessaire. Ce défaut provoque une erreur pouvant aller jusqu'à +0,2-0,3 g/kg.

② AGITATION

La dispersion du coagulum protéines-colorant constitue le point critique de cette étape.

En effet, les sites de fixations protégés par un coagulum trop épais ne fixent pas de colorant. Une agitation ou un brassage instantané et vigoureux sont donc nécessaires. On constate d'ailleurs que la fixation est plus aisée sur les ETG reconstitués, du fait d'un coagulum fin.

De ce fait, des anomalies peuvent apparaître sur les laits naturels alors que le calibrage correct ne signale rien.

Cette étape mène généralement à des erreurs irrégulières par défaut, d'où une mauvaise répétabilité.

③ SEPARATION DU COAGULUM

Les points critiques sont ici :

- * la centrifugation, où temps et accélération centrifuge doivent être suffisants et correspondre aux minima de la norme V 04-216. Un défaut sur ce point conduit à des résultats généralement incohérents et peu répétables,
- * la filtration; où il faut veiller à la fois à la qualité des filtres (porosité, absence de pliures), à leur position sur le support et à la pression de filtration.

On notera, en particulier, que le coagulum obtenu sur les ETG reconstitués à 25, 30 et 36 g/kg est très fin et peut traverser le filtre en cas de défaillance. Ce n'est pas le cas avec les laits naturels.

Un passage de coagulum au cours de cette étape mène à un abaissement apparent des teneurs, par obscurcissement de la cellule. Ceci entraîne un réajustement de l'étalonnage à la hausse non nécessaire, d'où une tendance *in fine* à des résultats par excès, avec des erreurs pouvant aller jusqu'à + 0,2-0,3 g/kg.

④ MESURE PHOTOMETRIQUE :

La réaction chimique impliquée dans la méthode au Noir Amido n'est pas complètement stoechiométrique, d'où une courbure légère de la réponse avec un photomètre linéaire

Pour corriger ce point critique, un étalonnage sur trois points est nécessaire, ce qui permet de réduire un écart qui est de l'ordre de +0,1-0,2 g/kg au niveau de 30 g/kg. Cette étape conduit donc elle aussi à un risque de surestimation des résultats.

Il faut enfin veiller à se placer dans une plage de réponse correcte. La plage de densités optiques (D.O.) utilisable doit ainsi pouvoir contenir le domaine d'application choisi pour la méthode, à savoir :

- 24 à 40 g/l pour le lait de vache
- 45-65 g/l pour le lait de brebis

Ceci implique de jouer sur le volume de prise d'essai. Le pH et la concentration de la solution de Noir Amido, le trajet optique (cuvette) sont également des éléments qui conditionnent la "fenêtre" de D.O. et qu'il faut maîtriser. Les résultats hors fenêtre seront erronés, voire plafonnés et sans lien avec la méthode Kjeldahl. Selon le type d'appareil, ils pourront aussi ne pas apparaître, remplacés par un message d'erreur.

CONCLUSIONS

Par principe, les méthodes Noir Amido et Kjeldahl fournissent des résultats équivalents puisque la première est calibrée par rapport à la deuxième. Néanmoins, la méthode Kjeldahl insuffisamment maîtrisée a tendance à produire des **résultats sous-estimés**, alors que dans le même cas, la méthode Noir Amido a tendance à produire des **résultats surestimés**. La comparaison de résultats des deux méthodes ne peut donc se faire qu'à la lumière des contrôles qualités appliqués à l'une et à l'autre méthode.

(par O. Leray, in Réunion annuelle des Présidents et Directeurs des LIAL, Aurillac, 25-26 septembre 1997)

