

PARAMETRES INFLUENCANT LA REPETABILITE DU DOSAGE ENZYMATIQUE DU LACTOSE DU LAIT

Il y a bientôt deux ans, nous avons consacré un article de La Lettre de CECALAIT aux problèmes de précision rencontrés dans la méthode de dosage du lactose du lait par voie enzymatique. (cf Lettre de CECALAIT n° 2). Nous avons alors évoqué une étude en cours à la station INRA de Poligny et promis de vous tenir au courant.

Cette étude, consacrée aux paramètres influençant la répétabilité du dosage du lactose du lait par voie enzymatique est terminée maintenant. Voici, brièvement, la synthèse des principaux résultats obtenus !

Les points clés à étudier : conditions de défécation, conditions d'agitation et maîtrise des quantités mises en œuvre.

Parmi les facteurs susceptibles d'avoir une influence sur le dosage enzymatique du lactose, ce sont les 5 paramètres paraissant les plus importants qui ont été étudiés, à savoir :

* la quantité de lait mise en œuvre pour la défécation, qui agit directement sur la quantité de lactose présente dans la cuve du spectrophotomètre ;

* le mode de défécation, en utilisant les protocoles expérimentaux préconisés par :

- l'AFNOR (V 04-213,1971), mais adapté à 1 ml de lait au lieu des 20 ml prévus dans la norme ;

- la FIL (79B:1991), modifié pour être applicable au lait frais ;

- BOEHRINGER MANNHEIM, avec les kits de dosage commercialisés par cette société ;

* la conservation des défécations ;

* la pesée des volumes délivrés dans la cuve du spectrophotomètre ;

* le mode d'agitation de la cuve ; c'est-à-dire, avec ou sans parafilm.

L'ensemble de l'étude a été mené avec un lait à teneur « normale » (autour de 45g/l) en lactose et avec deux laits enrichis.

Pour tous les essais, on a suivi le protocole de défécation selon l'AFNOR, sauf pour l'étude du deuxième point (mode de défécation). Le dosage enzymatique proprement dit, a été réalisé selon les instructions fournies par Boehringer Mannheim avec ses kits (il correspond à ce qui est décrit comme « dosage enzymatique par la voie galactose », dans la norme FIL 79B :1991).

1) EFFET DE LA QUANTITE DE LAIT MISE EN ŒUVRE

Les essais de défécation ont été menés, respectivement, avec 1 g (1), 1,8 g (2) et 2 g (3) de lait pour 100 ml de volume réactionnel total.

Les résultats montrent que plus la quantité de lait mise en œuvre pour la défécation est importante, plus la concentration en lactose est élevée. Son accroissement total –entre (1) et (3)- avoisine 1 g, avec le lait « normal » et 0,7 g avec le lait enrichi. La variabilité des résultats s'améliore en diminuant parallèlement à l'augmentation de la concentration ; l'écart-type passe ainsi de 0,87 dans le cas (1) à 0,06 dans le cas (3) avec le lait « normal ».

Il faut cependant prendre garde à rester dans les limites de concentration recommandées dans les normes (100µg dans la cuve du spectrophotomètre).

2) EFFET DU MODE DE DEFECATION

Le tableau ci-dessous compare les trois méthodes de défécation étudiées ici.

Facteurs/ Défécation	AFNOR	FIL	Boehringer
Quantité de lait mise en jeu	(2ml ds 200 ml) ⇒ 1ml ds 100ml	(1g ds 100 ml) ⇒ 1ml ds 100ml	(2g ds 100ml) ⇒ 2ml ds 100ml
Réactifs pour 100 ml	Fe(CN) ₆ K ₄ (2ml) ⇒ 0.1ml Zn(CH ₃ COO) ₂ (2ml) ⇒ 0.1ml	Fe(CN) ₆ K ₄ 5ml ZnSO ₄ 5ml	CCl ₃ COOH 1ml NaOH 3ml
Eau permutée	Quantité suffisante pour 100 ml FILTRER (1 ou 2 fois selon le cas)		
Concentration des réactifs	Fe(CN) ₆ K ₄ 0.175 mol.l ⁻¹ ⇒ 1.75.10 ⁻⁵ mol	Fe(CN) ₆ K ₄ 0.042 mol.l ⁻¹ ⇒ 21.10 ⁻⁵ mol	CCl ₃ COOH 3 mol.l ⁻¹ ⇒ 0.003 mol
⇒ quantité réagissante	Zn(CH ₃ COO) ₂ 1.37 mol.l ⁻¹ ⇒ 13.7.10 ⁻⁵ mol	ZnSO ₄ 0.25 mol.l ⁻¹ ⇒ 125.10 ⁻⁵ mol	NaOH 0.1 mol.l ⁻¹ ⇒ 0.003 mol
Type de défécation	Action de métaux lourds	Action de métaux lourds	Acidification
Temps de manipulation	45 min à 1 h	1 h	30 min
Temps de filtrage	Moyen	Moyen	Long
Turbidité	Limpide	Limpide	Trouble
Quantité de lait en jeu	+	+	++
Coût	Sensiblement le même		

Les résultats obtenus montrent des différences significatives entre les trois méthodes.

Les concentrations de lactose décroissent de la méthode Boehringer à la méthode AFNOR, puis à la méthode FIL ;

Avec, à titre d'exemple, pour un lait « normal », des teneurs mesurées, respectivement de 45,09 g/kg ; 44,63 g/kg et 44,37 g/kg.

Les méthodes FIL et AFNOR diffèrent peu en valeur moyenne (écart relatif de 0,58 pour un lait normal), mais la méthode BOEHRINGER conduit à des valeurs plus élevées (écarts de 1,02 par rapport à la méthode AFNOR et 1,6 par rapport à la méthode FIL, toujours pour un lait « normal »).

En revanche, les trois méthodes sont sensiblement sujettes à la même variabilité.

Rien ne semble donc avantager une méthode par rapport à une autre. Le choix de l'une d'entre elles obéira essentiellement à des considérations pratiques : réactifs disponibles, habitudes du laboratoire... Mais il faudra toujours utiliser la même pour rester le plus homogène possible dans les manipulations et dans les résultats.

Il reste que la désignation de la méthode censée donner la valeur vraie devient délicate et requiert des études complémentaires (comparaison entre méthodes cuprométriques et enzymatiques...etc).

3) EFFET DE LA CONSERVATION DES DEFECATIONS

Les défécations des laits « normal » et enrichi ont été conservées à 4°C, et soumises au même dosage à un mois d'intervalle. Les écarts obtenus sont faibles. On peut considérer que la conservation des défécations n'altère pas le résultat des dosages.

4) EFFET DE LA PESEE DES VOLUMES MIS EN ŒUVRE

Il s'agit de maîtriser les quantités mises en œuvre pendant le dosage ; et donc de tenir compte dans la formule de calcul finale de la masse de la prise d'essai et des réactifs présents dans la cuve et non plus de leur volume.

Les teneurs en lactose obtenues en prenant en compte les masses des volumes délivrés dans la cuve (méthode dite pondérale) sont plus faibles qu'en ne tenant compte que des seuls volumes (méthode dite volumétrique). On a ainsi 41,32 g/kg dans le premier cas et 41,5 g/kg dans le deuxième cas pour un lait « normal ». Cependant les écarts-types restent approximativement les mêmes : 0,43 pour le lait normal dans les deux cas ; 0,3 par la méthode pondérale contre 0,4 par méthode volumétrique pour le lait enrichi.

D'un point de vue pratique, la méthode volumétrique est incontestablement plus rapide, mais l'utilisation de pipettes à piston est une importante source d'erreur car les volumes délivrés sont peu répétables : l'étude montre des écarts de volume de l'ordre de 10 à 15 µl pour un volume théorique

de 2900µl. L'étalonnage préalable des pipettes à piston est donc indispensable.

Cet étalonnage devient inutile dans le cas de la méthode pondérale, puisque toutes les cuves sont pesées. Cette méthode est cependant longue et lourde à mettre en œuvre. De plus, lorsqu'il y a dosage d'une série de 10 à 20 échantillons, la perte de temps occasionnée par la pesée des cuves conduit à l'évaporation d'une partie de la solution qu'elles contiennent (surtout pour des dosages effectués l'été). C'est ainsi qu'une prise d'essai de 0,1 g ne pèsera plus que 0,0988 g au bout du temps passé à peser 20 prises d'essai, soit une augmentation de concentration de 1,2 %. Au total l'écart de poids dû ici à l'évaporation est du même ordre que l'écart de volume lié à l'imprécision des pipettes dans la méthode volumétrique.

Il semble donc souhaitable d'utiliser cette dernière méthode pour les dosages de routine et de réserver la méthode pondérale, pour les analyses de référence, en limitant le nombre d'échantillons à doser à 5 au maximum.

5) INFLUENCE DU TYPE D'AGITATION

Les différents composants du mélange réactionnel peuvent être agités soit par retournement de la cuve (avec un morceau de Parafilm sur la cuve), soit par un mouvement pendulaire en prenant soin d'éviter tout débordement (en l'absence de Parafilm sur la cuve).

Une première comparaison entre ces deux modes d'agitation a été faite après l'ajout de deux réactifs seulement (prise d'essai et enzyme). Elle montre un écart de 0,15 g/kg pour un lait « normal », la valeur la plus importante ayant toujours été obtenue en présence de Parafilm, malgré la perte inévitable d'un peu de mélange réactionnel sur le Parafilm (cette perte existe même lorsqu'on prend la précaution de récupérer un maximum du mélange par frottement du Parafilm sur le rebord de la cuve). Il est probable que cette perte de volume soit compensée par l'augmentation de la concentration de la prise d'essai par évaporation, pendant le temps nécessaire à la manipulation avec Parafilm (6 fois plus long que sans Parafilm). Au total, à ce stade de la réaction, le mode d'agitation n'a pas d'effet significatif sur la variation des résultats.

La même comparaison entre modes d'agitation a été effectuée ensuite en présence de tous les réactifs (cuve pleine). Dans ce cas, on obtient toujours un taux de lactose plus élevé en agitant sans Parafilm, mais avec un écart-type plus important. On a ainsi, pour un lait de teneur « normale » en lactose : une moyenne de 44,91 g/kg après agitation sans Parafilm contre 43,97 g/kg avec Parafilm et respectivement des écarts-types de 0,64 contre 0,47.

La contribution de ce facteur « mode d'agitation de la cuve » à la variabilité des résultats diminue cependant au fur et à mesure que la concentration du lait en lactose augmente.

Comme dans le point précédent, il semble souhaitable de réserver le mode d'agitation avec Parafilm, très

consommateur de temps, aux analyses de référence, sur un faible nombre d'échantillons. Pour les analyses de routine, le mode d'agitation sans Parafilm semble préférable.

CONCLUSION

Le point clé pour améliorer la répétabilité du dosage enzymatique du lactose est incontestablement d'augmenter la quantité de lait mise en œuvre lors de la défécation : 2 ml (ou 1,8 ml pour les laits enrichis) sont préférables à 1ml.

La pesée des volumes délivrés n'est à conseiller que pour des analyses de référence. Il en est de même pour l'homogénéisation du mélange réactionnel par retournement de la cuve (agitation avec Parafilm).

Quant à la méthode de défécation utilisée, elle n'intervient pas sur la répétabilité du dosage (à condition toutefois d'utiliser la même méthode), le problème de la « valeur vraie » de lactose obtenue à partir d'une défécation de lait reste cependant en suspens !

La répétabilité est, dans tous les cas, bien meilleure que dans la norme !

Il reste que sur l'ensemble des laits testés tout au long de cette étude, l'écart-type relatif de répétabilité est inférieur à 1% !

Rappelons que la norme FIL 79B :1991 fixe :

* dans sa version française, une valeur de répétabilité de 7% (pour le dosage enzymatique par la voie galactose)

* dans sa version anglaise, des valeurs de répétabilité de 3% (dans le cas de dosages effectués sur du lait sec ou des mélanges secs pour crèmes glacées) ou de 7% (dans le cas des fromages fondus)

Les deux versions de la norme devraient normalement être identiques ; il y a donc probablement une erreur de texte ; toutefois la version anglaise étant la plus récente (décembre 1991, par rapport à juin 1991 pour la version française), c'est elle qui fait foi.

L'amélioration de la répétabilité de ce dosage est donc loin d'être un objectif irréaliste !

Source : GOBY, Valérie. Dosage enzymatique de la teneur en lactose du lait : étude des paramètres influençant la répétabilité. Poligny : INRA-SRTAL, 1992, 59 p., rapport de stage