

CENTRE D'ETUDES ET DE CONTROLE DES
ANALYSES EN INDUSTRIE LAITIERE

avril 1993

LA LETTRE

N° 6

DE

CECALAIT

CECALAIT INRA SRTAL BP 89 39801 Poligny TEL : 84.73.63.00 / 84.73.63.19 TELECOPIE : 84.37.37.81

Rédaction achevée en Avril 1993

Equipe rédactionnelle :

A. VAN REUSEL, Ph. TROSSAT, O. LERAY, A. BAPTISTE

SOMMAIRE

Validations AFNOR p. 1
nouvelles validations
gélose Rambach pour l'isolement des *Salmonella*

La lipolyse p. 2

Mesure de la lipolyse dans le lait par la méthode aux savons de cuivre p. 3-6

Normes et règlements parus récemment 6

VALIDATIONS AFNOR

Madame GOMY de l'AFNOR nous a informés des suites que l'AFNOR a données aux nouvelles demandes de validation de méthodes rapides ainsi qu'aux demandes d'extension du domaine d'application.

Les nouveautés concernent toutes des méthodes microbiologiques.

Nouvelles validations

★ Petrifilm *Escherichia coli* (3M) pour les produits carnés depuis septembre 1992

★ Test de détection de *Listeria spp.* (TRANSIA DIFFCHAMB) pour tous produits alimentaires, depuis novembre 1992.

Extensions du domaine d'application

Elles concernent essentiellement les domaines d'application des différents Petrifilm

★ Le Petrifilm Flore Totale, validé pour le lait cru, l'est également pour les végétaux et le beurre (septembre 1992) et pour le lait pasteurisé (novembre 1992).

★ Le Petrifilm coliformes, validé pour le lait cru l'est également pour le beurre (septembre 1992), le lait pasteurisé et les fromages à pâte molle (novembre 1992)

★ Le Petrifilm *E. coli* (voir ci-dessus) est de plus validé pour le beurre (septembre 1992), le lait pasteurisé et les fromages à pâte molle (novembre 1992).

Salmonella typhi et *S. paratyphi A* se développent cependant sous la forme de colonies incolores.

CARACTERISTIQUÉS ANALYTIQUES

★ spécificité :

- 3 faux négatifs sur 377 souches pures de salmonelles testées;

- 3 faux positifs sur 41 souches pures d'entérobactéries testées.

★ sélectivité :

Dans un mélange de souches de *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter freundii*, *Proteus vulgaris* et *Pseudomonas fluorescens*, seules des colonies bleues de *C. freundii* se sont développées de façon équivalente aux colonies rouges de *Salmonella spp.*

★ Sensibilité : de 1 à 10³ bactéries /25g d'aliment.

FIDELITE

Les résultats suivants ont été obtenus par 13 laboratoires, sur 6 types d'aliments, non contaminés ou contaminés artificiellement à des niveaux supérieur à 10 salmonelles/g et inférieur à 0,5 salmonelle/g.

Nous vous présentons ci-dessous quelques compléments d'information sur la gélose Rambach. Son attestation de validation a également été étendue, mais uniquement pour tenir compte des changements de site de fabrication, de distributeur (MERCK) et de références commerciales.

Informations complémentaires

GELOSE RAMBACH

Ce milieu est utilisable pour l'isolement des *Salmonella* dans tous les produits alimentaires.

PRINCIPE

Cette gélose permet une suspicion des *Salmonella* dès le premier isolement (24 h et 48 h). Elles peuvent en effet produire une acidification à partir du propylène glycol. Grâce à la présence de rouge neutre inclus dans le milieu, il y a alors apparition de colonies rouges. Celles-ci se différencient des *Enterobacteriaceae* lactose +, grâce à un substrat chromogène, qui colore en bleu les colonies β galactosidase +.

MILIEU D'ENRICHISSEMENT	ECHANTILLONS CONTAMINES (N = 168) TROUVES NEGATIFS (FAUX NEGATIFS)						ECHANTILLONS NON CONTAMINES (N = 84) TROUVES POSITIFS (FAUX POSITIFS)					
	Rappaport		Sélénite		Total		Rappaport		Sélénite		Total	
		en %		en %		en %		en %		en %		en %
RAMBACH	4	2,4	13	7,7	17	5	1	1,2	4	4,8	5	3
VB/RP	47	27,9	7	4,2	54	16	1	1,2	1	1,2	2	1,2

VB/RP : gélose au Vert Brillant/Rouge de Phérol

De façon générale, la lisibilité de la gélose a été appréciée par les utilisateurs.

source : attestation de validation de l'AFNOR : TEC 05/1 -04/92

LA LIPOLYSE

Monsieur VAN REUSEL de la Station Laitière de Gembloux en Belgique, spécialiste de la lipolyse, nous a fait parvenir une intéressante mise au point sur ce domaine.

Une grande partie de ce numéro est consacrée au deuxième volet de notre mise au point sur la mesure de la lipolyse dans le lait. Il nous a donc semblé tout indiqué de rappeler ci-dessous, grâce à cette contribution, l'origine, les caractéristiques et les conséquences de ce phénomène.

Dans le lait, la matière grasse (MG) se trouve sous forme de globules gras. Ces entités sont formées d'un noyau constitué de lipides insolubles dans l'eau et couvert d'une membrane faite principalement de phospholipides et de protéines. Cette membrane constitue une barrière naturelle contre l'accès de la lipoprotéine-lipase du lait (mLPL), une enzyme qui décompose les lipides en acides gras libres et en glycérides partiels. Ce phénomène est connu sous le nom de lipolyse.

Dans le lait natif, la mLPL se trouve associée aux micelles de caséine qui, dans le tissu mammaire, sont secrétées séparément de la matière grasse. Pour qu'il se produise effectivement de la lipolyse, la mLPL doit quitter cette association, migrer vers les globules gras, s'intégrer dans la membrane du globule gras et établir un contact opérationnel avec les lipides.

Le processus lipolytique est favorisé, notamment par une manipulation excessive du lait.

Une installation de traite mal conçue ou mal utilisée introduit une lipolyse importante. De même, des variations répétées de la température du lait font progresser la lipolyse.

La collecte du lait à la ferme peut y contribuer également; le matériel adhoc et son utilisation pourraient être optimisés.

Sur le parcours de la collecte, les transvasements d'une citerne à l'autre constituent aussi un élément défavorable.

Enfin, la réception en usine et le traitement de la matière première jusqu'à la pasteurisation, qui détruit la mLPL peuvent également faire progresser sensiblement le taux de lipolyse.

La lipolyse se traduit par une augmentation de la teneur en acides gras libres (AGL) dans le lait et les produits laitiers.

Lorsque la lipolyse prend trop d'extension, nous constatons deux choses :

① l'apparition d'une rancidité lipolytique : un défaut organoleptique dû à un excès d'AGL à courte chaîne (C4 - C12) dans le produit; un pH acide accentuant le défaut,

② un accroissement important de l'acidité de la matière grasse isolée en l'état; cet accroissement est dû aux AGL à chaîne plus longue (C10 - C18) qui se dissolvent dans la matière grasse lors de la désémulsification des globules gras

(que ce soit analytiquement au laboratoire ou par les processus technologiques en usine).

Dans plusieurs régions d'Europe, le taux de lipolyse est un critère pour la qualité des livraisons de lait à l'industrie et des pénalisations sont appliquées.

Et pour cause : les dispositions réglementaires actuelles imposent pour le butteroil une acidité inférieure à 1,06 millimoles par 100 g de MG (0,30% acide oléique)! Dans un avenir proche, un règlement CEE pourrait imposer pour le beurre, mis à l'intervention, une acidité de la MG inférieure à 1,2 millimoles par 100 g de MG; après une courte période de mise en application, ce taux pourrait être abaissé à 1,0 millimoles par 100 g de MG.

Pour la détermination du taux lipolytique dans le lait, principalement trois méthodes analytiques sont d'un usage courant en Europe :

- 1- la méthode dite BDI,
- 2- la méthode dite aux savons de cuivre,
- 3- le système analytique à flux continu.

Ces méthodes ont été décrites dans le Bulletin de la Fédération Internationale de Laiterie (FIL) N° 265 de 1991, sous la forme habituelle des normes internationales.

Ces méthodes comportent toutes deux étapes : l'extraction des AGL suivie de la détermination proprement dite.

Suite aux études menées dans les années 80, nous savons qu'aucune de ces méthodes ne parvient à extraire la totalité des AGL du lait. De plus, le profil des AGL extraits diffère selon la méthode mise en oeuvre. L'extraction complète des AGL n'a pas été entièrement résolue.

Cependant, les résultats de chacune de ces méthodes expriment parfaitement la progression lipolytique dans le lait. Il n'est donc pas étonnant de constater que les méthodes sont également bien corrélées entre elles. Jusqu'à maintenant, les trois méthodes en question n'ont pas fait l'objet d'une comparaison sur base d'analyses inter-laboratoires qui permettraient de préciser les écarts systématiques et proportionnels existant entre elles.

Une certitude cependant : la reproductibilité des résultats dépend dans une large mesure du respect des modes opératoires! Des variations apportées aux modes opératoires peuvent faire dévier considérablement les résultats, parfois de l'ordre de 20 à 30%, voire davantage. Ces méthodes semblent produire des résultats sur des échelles "élastiques", déformables à volonté!

Le respect rigoureux des prescriptions reprises dans les modes opératoires devrait donc contribuer à une meilleure harmonisation des résultats.

A. VAN REUSEL, Gembloux, 19/03/1993

MESURE DE LA LIPOLYSE DANS LE LAIT (II)

La méthode aux savons de cuivre (MSC)

INTRODUCTION

Suite à un premier article dans "La Lettre de CECALAIT" n° 4, (Octobre 1992) concernant la méthode BDI, nous décrivons, dans ce numéro, la méthode dite "aux savons de cuivre".

Cette méthode détermine par réaction colorimétrique, les acides gras libres (AGL) extraits du lait à l'aide d'un solvant organique. Rappelons que la méthode BDI détermine, par titration acido-basique les AGL dissous dans la matière grasse isolée en l'état.

Chacune des deux méthodes témoigne ainsi du degré de lipolyse dans le lait.

I HISTORIQUE

Mise au point dans le cadre de l'analyse médicale par AYERS (1958) pour doser les acides gras libres (AGL) dans le sang, la technique a été modifiée et adaptée au lait par KOOPS et KLOMP (1977).

Le laboratoire interprofessionnel URCIL, à Carhaix a simplifié la méthode, tout en augmentant la cadence horaire. Pour ce faire, il a regroupé en une seule suite d'opérations consécutives la prise de lait, l'ajout de réactifs auxiliaires, l'addition du solvant organique (CHM, chloroforme - heptane - méthanol) et l'introduction du réactif au cuivre (LAMY et GALAUP, 1986).

UTILISATION DE LA METHODE EN FRANCE

En 1993, deux tiers des laboratoires interprofessionnels français

utilisent la MSC. Néanmoins, une enquête récente fait apparaître quelques petites variantes de pratique susceptibles d'entraîner dans les résultats un biais plus ou moins important par rapport à la méthode initiale.

C'est pourquoi dans un souci de cohérence et d'harmonisation des résultats, il apparaît indispensable que les différents laboratoires utilisent tous une seule méthode normalisée.

Le Bulletin FIL (Fédération Internationale de Laiterie) n° 265/1991 fait le point sur la méthode aux savons de cuivre et propose un protocole opératoire qui répond à ce souci d'harmonisation. Nous vous proposons ci-dessous un rappel des points importants de la méthode, qui sont à même d'améliorer la reproductibilité des résultats.

II PRINCIPE DE LA METHODE

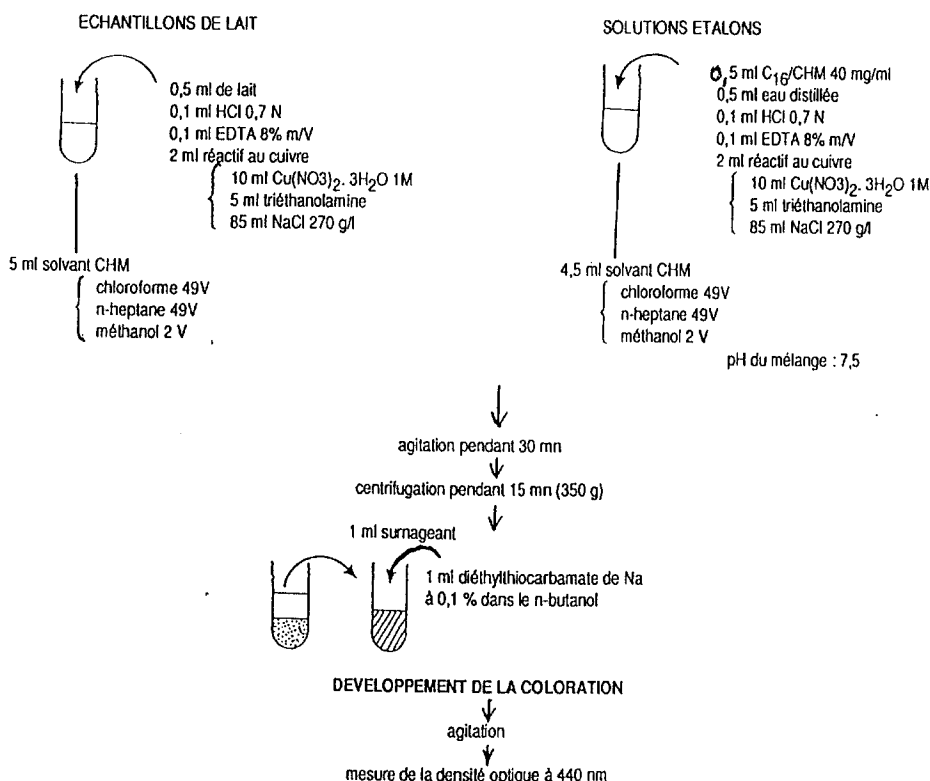
La MSC est une méthode de détermination globale des AGL dans le lait. Elle consiste en un transfert sélectif des AGL, sous forme de savons de cuivre, vers une phase organique, à base de chloroforme, que l'on sépare du lait.

La teneur en savons de cuivre est ensuite déterminée par analyse colorimétrique du cuivre associé aux AGL.

La relation linéaire entre la concentration en savons de cuivre et la densité optique du complexe coloré formé est établie à l'aide d'une équation d'étalonnage.

III RESUME DE LA METHODE

EXTRACTION ET FORMATION DE SAVONS DE CUIVRE COMBINEES



IV PRINCIPALES ETAPES

① FORMATION DES SAVONS DE CUIVRE ET LEUR EXTRACTION

➤ LA PRISE D'ESSAI DU LAIT

* Homogénéité de l'échantillon

La matière grasse doit être répartie de façon homogène dans le lait : il est nécessaire d'agiter tout en douceur ! Le réchauffement du lait est déconseillé si le lait n'est pas destiné à une analyse immédiate. Il y a, en effet, risque de développement rapide de la lipolyse à température ambiante et risque d'induction thermique de la lipolyse, en cas de report avec stockage au froid.

* volume de la prise d'essai

Toute erreur dans la prise d'essai du lait, tant systématique (justesse) qu' aléatoire (répétabilité) influence directement l'exactitude des résultats.

Le dispositif de prélèvement du lait doit donc être choisi avec discernement. Sa précision doit cependant être vérifiée périodiquement par pesée de la quantité de lait prélevée.

Certaines seringues peuvent comporter un volume "mort" important. Ce volume résiduel se mélange à la prise d'essai suivante et peut compromettre l'exactitude des résultats.

NB : Dans ce cas, il est indispensable de faire une purge et un rinçage entre deux échantillons soumis à essai.

➤ LE DOSAGE DES REACTIFS

* Qualité des produits

Il est impératif d'utiliser des produits "pour analyse"; le chloroforme doit, de plus, être exempt d'éthanol.

* Concentrations et volume des réactifs

Il est important de respecter quantités et concentrations de manière à maîtriser le pH final du mélange et les équilibres des réactions ultérieures.

Les systèmes de distribution doivent être choisis, à la fois, en fonction de leur précision, de leur sécurité et de leur facilité d'emploi. De plus, ils doivent être vérifiés périodiquement par pesée avec les produits prélevés; en effet, selon le système choisi, on peut observer des différences de volume liées à la fluidité et la densité des produits.

Le respect des proportions du mélange CHM 49:49:2 est un point essentiel. Il permet de maintenir les affinités respectives des savons pour le solvant et de limiter la saponification des phospholipides, dont l'extraction est favorisée par des proportions accrues de méthanol, et qui ne sont pas des produits de la lipolyse.

➤ EXTRACTION DES SAVONS DE CUIVRE

Le mélange du lait, des différents réactifs et du solvant d'extraction CHM doit subir une agitation suffisante pour augmenter la surface de contact, donc d'échange entre phase organique et phase aqueuse. Elle doit être suffisamment énergique (200 battements/mn) et prolongée (30 mn) de manière à obtenir une récupération maximale de savons.

La simplification apportée par l'URCIL, à la méthode de KOOPS et KLOMP (1977) ne paraît pas modifier substantiellement les résultats des analyses. Cette constatation soulève un certain nombre de questions sur le rôle et la fonction des réactifs, sur le processus de formation des savons de cuivre et leur extraction dans la phase organique séparée du lait.

D'un point de vue scientifique, le procédé analytique n'a pas été entièrement expliqué.

Nous indiquons cependant ci-dessous les fonctions généralement attribuées aux réactifs employés dans ce procédé analytique.

* L'acide chlorhydrique, en abaissant le pH, solubilise le calcium présent et accroît la solubilité des AGL dans la phase organique, en favorisant leur forme non dissociée (non ionique).

* L'EDTA (éthylène diamine tétraacétate) complexe le calcium et disperse les micelles de caséine.

* L'apport de cuivre sous forme de nitrate permet la formation de sels (ou savons) de cuivre.

* La triéthanolamine a pour but, d'une part, de remonter le pH du mélange et, d'autre part, de stabiliser le réactif au cuivre.

* L'apport de chlorure de sodium à saturation, en abaissant l'activité de l'eau et en augmentant la densité de la phase aqueuse, permet une meilleure séparation de la phase organique après l'extraction des savons.

* Le solvant CHM : 49V : 49V : 2V permet l'extraction sélective des AGL sous forme de savons de cuivre; le cuivre ionique restant dans la phase aqueuse. Ce procédé permet la détermination des AGL par dosage colorimétrique du cuivre qui leur est associé.

➤ Le chloroforme est le solvant dont l'affinité pour les savons de cuivre est la plus marquée.

➤ L'heptane a pour rôle de réduire la densité de la phase organique ($\rho = 0,68$ g/ml contre $\rho = 1,4$ g/ml pour le chloroforme) et de faciliter la séparation des deux phases. La phase organique, moins dense que la phase aqueuse suragère et pourra, de ce fait, être prélevée sans problème.

➤ Le méthanol, en agissant sur les membranes des globules gras, facilite la solubilisation de la matière grasse dans la phase organique.

② LA DETERMINATION DES AGL PAR DOSAGE COLORIMETRIQUE DU CUIVRE

Ce dosage, qui passe par celui du cuivre lié aux AGL, nécessite au préalable une parfaite séparation de la phase organique et de la phase aqueuse. En effet, le cuivre métallique en excès reste dans la phase aqueuse et le cuivre lié aux AGL passe en partie dans la phase organique (AGL à longues chaînes carbonées). Le cuivre lié aux AGL est mis en évidence par la formation d'un complexe coloré avec du diéthylthiocarbamate de sodium.

➤ CENTRIFUGATION

Temps et accélération centrifuge doivent permettre une parfaite séparation des deux phases afin de ne pas prélever du cuivre ionique non lié aux AGL, lors du prélèvement de la phase organique.

➤ PRELEVEMENT DE LA PHASE ORGANIQUE

* Manipulation :

Pour éviter toute pollution accidentelle, il est important d'effectuer le prélèvement de surnageant à mi-hauteur de la phase organique en centrant bien l'embout du dispositif de prélèvement. On évite ainsi tout contact avec les parois des tubes à essai et avec la phase aqueuse. Ces contacts seraient susceptibles d'entraîner du cuivre non lié aux AGL lors du prélèvement de la phase organique.

* Précision :

Le système doit permettre un prélèvement aussi fidèle que possible (répétabilité et stabilité dans le temps). Il doit également être contrôlé périodiquement par pesée avec un liquide de densité et de fluidité proches de celles du surnageant.

V ETALONNAGE

L'intensité de la coloration du complexe formé cuivre-diéthylthiocarbamate, mesurée à 440 nm, est proportionnelle à la concentration en cuivre de la phase organique surnageante et par conséquent à la concentration en AGL du lait.

La méthode nécessite un étalonnage au moyen d'une série de solutions à teneur croissante en acide palmitique afin d'exprimer le taux de lipolyse en millimoles d'AGL/l de lait.

➤ SOLUTIONS D'ETALONNAGE

* Les solutions d'acide palmitique doivent couvrir l'étendue des concentrations naturelles. On recommande au minimum trois concentrations : 0,2; 0,4 et 0,6 mmoles/l. Une attention particulière sera apportée à leur préparation : balance de précision, fiole jaugée étalonnée, température, pureté des produits...

* Les prises d'essai des solutions d'étalonnage doivent être de même volume que les prises d'essai de lait en routine.

➤ RESPECT DES PROPORTIONS PHASE ORGANIQUE/PHASE AQUEUSE

L'étalonnage utilise des solutions organiques (acide palmitique

dans du CHM) et les dosages de routine des prises d'essai de lait (solution aqueuse). Il convient donc de rétablir les proportions initiales phase organique / phase aqueuse pour respecter la distribution des AGL entre phases.

Pendant l'étape d'étalonnage, on remplacera donc les 5 ml de CHM par 4,5 ml de CHM et 0,5 ml d'eau distillée.

➤ REGLAGE DES PHOTOMETRES

* Il est conseillé de régler le zéro du photomètre, en absorbance nulle, avec un "blanc réactifs", c'est à dire en faisant l'ensemble du procédé opératoire avec une prise d'essai d'eau distillée. On peut ainsi disposer d'un point de gamme supplémentaire.

* Un réglage de zéro à l'aide d'une solution autre que le "blanc réactifs" (mélange CHM / diéthylthiocarbamate de sodium, eau...) est également possible, mais le point ne devra pas être pris en compte dans l'étalonnage.

* Les solutions d'étalonnage ("blanc réactifs" compris) devront être, au minimum, dosées en double et suivies tout au long des mesures selon un plan de contrôle qualité préétabli (contrôle de stabilité).

NB : D'une manière générale, on prendra soin d'amener tous les réactifs, étalons et échantillons à une même température, comprise entre 20 et 25°C.

VI EXPRESSION DES RESULTATS - REPETABILITE

* Les résultats sont exprimés en mmoles d'AGL / l de lait ou / 100 g de matière grasse.

* Ecart-type de répétabilité : $\sigma_r = 0,018$ mmoles AGL/l

Ecart admissible entre doubles : $r = 0,05$ mmoles AGL/l

VII CONCLUSION

La méthode aux savons de cuivre s'impose en France pour son adaptabilité à l'automatisation qui permet de l'inclure aisément au sein des analyses déjà nombreuses actuellement en place, dans le cadre du paiement du lait.

L'indice de lipolyse s'impose comme un critère additionnel de paiement, dans un nombre croissant de départements. L'estimation de sa valeur se doit d'être la plus juste possible et d'être reproductible en tout lieu en tout lieu.

Le respect des prescriptions énoncées par une méthode normalisée contribue largement à atteindre cet objectif.

Références citées dans ce texte

AYERS, C.W. *Analyt. Chim. Acta*, 1956, V. 15, p. 77.

BULLETIN DE LA FIL, 1991, N° 265.FIL-IDF, Bruxelles.

KOOPS, J., KLOMP, H. Rapid colorimetric determination of free fatty acids (lipolysis) in milk by the copper soap method. Neth. Milk Dairy J., 1977, V. 31, p. 56-74.

LAMY, F., GALAUP, F. In : Colloque et journée pratique sur la lipolyse du lait, Compte-rendu des communications, Carhaix, 20-21 Mars 1986. GIE Lait-Viande de Bretagne Ed. 1986, p. 9-12.

NORMES ET REGLEMENTS PARUS RECEMMENT

NORMES

Depuis le numéro 5 de la Lettre de CECALAIT, nous n'avons reçu qu'une seule norme nouvelle. Il s'agit de :

AFNOR VO4-217 Décembre 1992. LAIT ET PRODUITS LAITIERS. Détermination de la teneur en ammoniac et en urée (*méthode enzymatique*)

Pour l'AFNOR, toujours, saluons la parution -fort attendue- de la nouvelle édition du recueil de normes "**Contrôle de la qualité des produits alimentaires. Lait et produits laitiers**". (Ref. 3190441/1335, 1045 FF TTC).

Depuis la dernière édition du recueil, un nombre appréciable de normes avaient, en effet, été révisées et modifiées : ainsi dans la classe V 04, 30 normes rééditées sur 80 !

REGLEMENTATION

La Communauté Européenne vient d'édicter plusieurs textes concernant l'analyse du lait et des produits laitiers.

* **Décision du Conseil du 14/11/1992 (JOCE L407 du 31/12/1992)** : décision arrêtant certaines méthodes d'analyse et de test du lait traité thermiquement et destiné à la consommation humaine directe.

Ce texte fixe les méthodes pour la détermination de :

- la matière sèche
- la teneur en matière grasse
- la teneur en matière sèche non grasse
- la teneur en azote total
- la teneur en protéines
- la masse volumique

En fait, il reprend en gros les indications des normes FIL, sauf pour le dernier point (pas de norme FIL) qui correspondrait plutôt à la méthode usuelle, décrite par l'AFNOR (par aérométrie, V 04 204, 1969).

* **JOCE L399 du 31/12/1992** : Règlement 3942/92 fixant la méthode de référence pour la détermination du sitostérol et du stigmastérol dans le butteroil