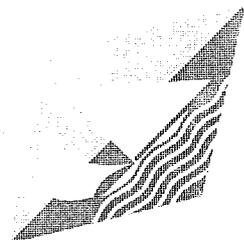


CENTRE D'ETUDES ET DE CONTROLE  
DES ANALYSES EN INDUSTRIE LAITIERE

juillet 1996

N°19



# LA LETTRE DE CECALAIT

BONNES  
VALEURS

CECALAIT INRA SRTAL BP 89 39801 Poligny TEL : 84.73.63.20 TELECOPIE : 84.37.37.81  
E-mail : bapt@poligny.inra.fr ou trossat@poligny.inra.fr

Rédaction achevée le 2 août 1996

Equipe rédactionnelle : A. BAPTISTE; O. LERAY

Relecture par : D. LEFIER; O. LERAY

## SOMMAIRE

Méthodes de détermination de la teneur en urée dans le lait

Nouveautés dans la réglementation

Note d'information aux participants aux chaînes d'analyse CECALAIT :  
traçabilité et valeurs de référence

Expression des résultats protéines en matière azotée totale : conséquences  
sur le travail des laboratoires

Normes et projets de normes parus récemment

Du côté de la biblio...

Dispositions qualité pour la production de matériaux de référence  
secondaire sur le lait

Rendez-vous

# METHODES DE DETERMINATION DE LA TENEUR EN UREE DANS LE LAIT

(Résumé de l'intervention de M. LEFIER de l'INRA Poligny lors de l'Assemblée Générale de CECALAIT)

**A** l'heure actuelle les producteurs et les transformateurs manifestent un intérêt croissant pour la détermination de la teneur en urée dans le lait. Or, les méthodes de dosage actuelles sont nombreuses, diverses et quasiment pas normalisées. Elles se divisent en trois catégories. Les méthodes directes, tout d'abord, sont des méthodes colorimétriques : DMAB, méthode manuelle et DAM, méthode automatisable. Les méthodes indirectes sont des méthodes enzymatiques. Enfin les méthodes physiques comprennent principalement la spectroscopie infra-rouge. Quelques caractéristiques de précision, de linéarité, de justesse ont pu être déterminées pour la plupart de ces méthodes. Mais, pour l'heure, elles n'ont pratiquement pas été comparées entre elles, si bien que les problèmes de dispersion des résultats restent préoccupants.

**L**e taux d'urée dans le lait peut varier de façon notable, en fonction principalement de l'alimentation de l'animal. Des valeurs anormales constituent alors un outil d'alerte à la nutrition azotée. Des teneurs trop élevées semblent également perturber la qualité fromagère des laits (cf l'Assemblée Générale de 1995 et La Lettre de CECALAIT, n° 15). C'est pourquoi la détermination de la teneur en urée devient d'un intérêt croissant, aussi bien pour les producteurs que les transformateurs.

Or à l'heure actuelle une multitude de méthodes coexistent et aucune d'entre elles n'a été normalisée au niveau international, en référence comme en routine. (Rappelons qu'en France, depuis 1992, l'AFNOR a normalisé une méthode enzymatique de référence). Il semble par conséquent utile de faire un tour d'horizon des principales méthodes employées et de leurs caractéristiques.

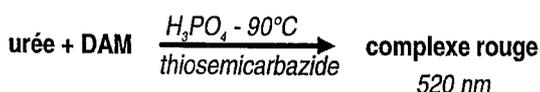
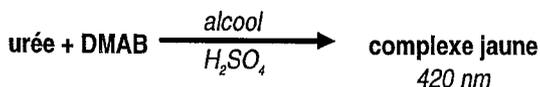
Elles se divisent en 3 grands groupes : les méthodes directes, les méthodes indirectes et les méthodes physiques.

Dans les méthodes directes, on dose, généralement par colorimétrie, le complexe, formé entre l'urée et le réactif employé. Les deux procédures principales sont la méthode au DMAB (paradiméthylaminobenzaldéhyde) et la méthode au DAM (diacétyle monoxime). Les méthodes indirectes, essentiellement enzymatiques, dosent un sous-produit formé par réaction entre un produit de dégradation de l'urée et le réactif. Enfin, l'infra-rouge et la pH-métrie par utilisation d'une électrode sélective de l'ion ammonium, correspondent aux méthodes physiques.

## ↳ METHODES COLORIMETRIQUES

Les conditions expérimentales des deux méthodes diffèrent, mais aucune étude ne les a comparées entre elles.

### → PRINCIPE



## → CARACTERISQUES

Elles sont résumées dans le tableau ci-dessous et proviennent de l'ensemble des sources bibliographiques actuellement disponibles.

	DMAB	DMA
<b>AUTOMATISATION ?</b>	manuelle	automatisable par SFA
<b>DEPROTEINISATION</b>	TCA	aucune
<b>LINEARITE</b> (mg urée / 100 ml lait)	de 0 à 100	de 5 à 75
<b>PRECISION</b> (mg urée / 100 ml lait) <b>CV, %</b>	1,5 0,23	0,6
<b>JUSTESSE</b> mg urée / 100 ml lait		1,7
<b>TAUX DE RECUPERATION</b>	100%	98,5%

SFA : segmented flow-analysis

Cv,% : coefficient de variation de répétabilité

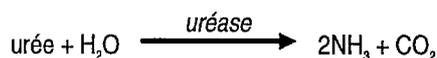
## ↳ METHODE ENZYMATIQUE

C'est la méthode la plus utilisée, pratiquée manuellement avec les kits enzymatiques et dans la norme AFNOR ou automatisée par FIA (Flow injection analysis) ou SFA.

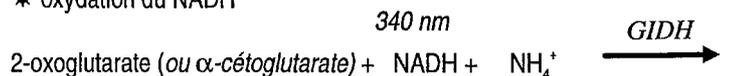
### → PRINCIPE

Le dosage se fait en deux étapes :

\* Hydrolyse de l'urée en ammoniac sous l'action de l'uréase



\* oxydation du NADH



En présence de glutamate-deshydrogénase (GIDH) et de nicotinamide-adénine-dinucléotide réduit (NADH), l'ammoniac réagit avec le 2-oxoglutarate pour donner du L-glutamate alors que le NADH s'oxyde en NAD<sup>+</sup>. Le NADH peut être suivi par spectrophotométrie à 340 nm. La diminution d'absorbance à cette longueur d'onde est alors proportionnelle stoechiométriquement au NADH oxydé, donc à l'ammoniac présent, c'est à dire à la moitié de l'urée présente.

#### → CONDITIONS

La préparation diffère légèrement selon que la détermination soit manuelle ou non.

Dans le premier cas, il est nécessaire d'intercaler une étape de déprotéination avant les deux étapes du dosage décrites ci-dessus. Celle-ci se fait, soit par ultrafiltration, soit par précipitation à l'acide trichloracétique (TCA à 4% ou 9,6%) ou selon la procédure de Rowland, développée pour l'extraction de l'azote soluble (procédure AFNOR).

En FIA, le lait est simplement dilué dans l'eau.

Dans tous les cas, la méthode requiert un double dosage de l'ammoniac. Le premier concerne l'ammoniac initialement présent dans le lait. Le second dose l'ammoniac initial et l'ammoniac produit par hydrolyse de l'urée par l'uréase.

#### → CARACTERISTIQUES

Elles sont résumées dans le tableau ci-dessous

CARACTERISTIQUES	procédure manuelle	procédure automatisée (FIA)
LIMITE DE DETECTION	1,4 mg/100 ml	2,4 mg/100 ml
LINEARITE	de 0 à 14 mg/100 ml	de 0 à 4,8 mg/100 ml
TAUX DE RECUPERATION	100% ± 3%	98% à 100%
FIDELITE CV <sub>v</sub> % CV <sub>r</sub> %	0,5 à 1,13 * 1,35 à 3,02 *	de 0,39 à 4,0 ** de 1,9 à 7,8 ***
JUSTESSE (par comparaison avec un kit enzymatique : méthode manuelle)		d <sub>x,v</sub> = - 0,48 mg d'urée pour 100 ml s <sub>x,v</sub> = 0,01 mg d'urée pour 100 ml

Cv<sub>v</sub>% : coefficient de variation de répétabilité

CV<sub>r</sub>% : coefficient de variation de reproductibilité

\* : une seule source bibliographique : norme AFNOR V 04-217, 1992

\*\* : valeurs émanant de plusieurs sources bibliographiques

\*\*\* : une seule source bibliographique : ANDERSON G., ANDERSSON L.; CARLSTROM G. J. Vet. Med. A. 1986, V. 33, p. 53-58. Les valeurs mentionnées dans le reste de la bibliographie sont toutes comprises dans cet intervalle.

#### ↳ METHODE IR

La teneur en urée du lait peut également être déterminée par spectroscopie infra-rouge. Le spectre IR de l'urée présente 4 bandes d'absorption vers 1690 cm<sup>-1</sup>, 1600 cm<sup>-1</sup>, 1472 cm<sup>-1</sup> et 1161 cm<sup>-1</sup>. Mais dans le lait, les deux premières bandes sont fortement perturbées par l'absorption de l'eau, alors que les suivantes se confondent avec les bandes d'absorption d'autres composés du lait, comme la MG ou le lactose. La zone la plus utilisable se situe finalement autour de 1600 cm<sup>-1</sup> - 1610 cm<sup>-1</sup>.

Dans ces conditions, la répétabilité de la méthode est de 2,5 mg d'urée pour 100 ml de lait. Quant à sa précision, avec une analyse des résultats par PLS (moindres carrés partiels), elle atteint :

- ♦ 6 mg d'urée pour 100 ml pour les laits individuels,
- ♦ 4,5 mg d'urée pour 100 ml dans les laits de troupeaux.

#### ↳ FACTEURS INFLUENÇANT LE DOSAGE

Il s'agit du mode de conservation des échantillons, de l'interférence d'autres composés du lait, d'effets liés à la saison, au pays...

L'ensemble des études effectuées montre que la conservation des échantillons par le Bronopol n'a pas d'effet sur le dosage de l'urée par les méthodes enzymatique et colorimétrique. Il en est de même lorsque ces échantillons additionnés de Bronopol sont stockés à 4°C -jusqu'à 14j-. En revanche, on observe un effet significatif sur la teneur en urée quand ils sont congelés.

Par contre, la conservation par le dichromate de potassium, teintant en jaune, demande une calibration spécifique dans le cadre de la méthode colorimétrique.

Il y a peu de composés du lait susceptibles d'interférer avec la détermination de l'urée. L'acide urique et l'uracile, très peu abondants dans le lait n'exercent que des effets mineurs. En revanche, ne pas tenir compte de l'ammoniac initial du lait, lors d'un dosage enzymatique, aboutit à une surestimation de l'urée de l'ordre de 1,7 mg pour 100 ml de lait.

#### Des sources de variation encore mal connues

L'étape de déprotéination présente dans la méthode enzymatique et la méthode au DMAB intervient vraisemblablement dans l'exactitude des résultats, mais n'a pas été étudiée pour l'heure.

En outre, des essais interlaboratoires internationaux ont montré des variations parfois importantes selon la saison ou selon le pays.

Ces mêmes essais ont également mis en évidence l'importante dispersion des résultats, qui sont en fait regroupés en petits ensembles correspondant à une méthode donnée. Il semblerait que les méthodes colorimétriques présentent un biais de départ par rapport à la méthode enzymatique. Mais aucune étude systématique n'a encore éclairci ces points à l'heure actuelle.

Or; il est certain que l'intérêt du dosage et l'utilisation effective des résultats, pour les producteurs et peut-être plus encore pour

pour les transformateurs dépend étroitement de l'amélioration de la fiabilité des résultats. Des études et essais supplémentaires sont donc clairement indispensables.

NB : La bibliographie est trop abondante pour être reproduite ici. Nous vous l'adresserons sur simple demande de votre part.

## NOUVEAUTES DANS LA REGLEMENTATION

### FRANCE

**Avis du 2/03/1996**, relatif aux appareils d'analyse utilisés dans le cadre du paiement du lait en fonction de sa composition et de sa

qualité. On y rappelle la liste des appareils d'analyse qui bénéficient d'une autorisation d'emploi dans ce cadre. Cette liste est reprise dans le tableau ci-dessous.

ANALYSE	FABRICANT ou DISTRIBUTEUR	APPAREIL	DATE autorisation
composition	Foss Electric	Milko-Scan 4000	5/2/1996
		Milko-Scan 203B	27/7/1982
		Milko-Scan 300	23/3/1977
	Berwind Perstorp	Milko-Scan 605 (A ou B)	30/9/1985
		Milko-Scan 255 (A ou B)	5/2/1996
		Multispec A et B	27/7/1982
germes totaux compteurs directs	Foss Electric	Bactoscan I et 8000	22/1/1986
		Cobra 2024	15/5/1991
	Biocom	Biomatic	30/9/1985
		Seuc CCZ 80	27/7/1982
		Foss Electric UTC	Fossomatic 180 -215 -250 -360
Somacount 150 -300 -500	8/3/1995		
compteurs de colonies	Foss Electric UTC		
leucocytes	Foss Electric Bentley-Aegys		

### EUROPE COMMUNAUTAIRE

**Directive 96/16 du Conseil, du 19/3/1996, concernant les enquêtes statistiques à effectuer dans le domaine du lait et des produits laitiers (JO CE L 78 du 28/3/1996)**

Ce texte stipule quelles enquêtes les états membres doivent effectuer auprès des entreprises achetant ou collectant du lait et/ou des produits laitiers. Il s'agit principalement de recueillir mensuellement et annuellement des données :

- ♦ sur les quantités de lait ou crème collectés,
- ♦ sur les quantités de produits laitiers frais traités et de certains produits fabriqués,
- ♦ sur la teneur en matière grasse du lait et de la crème,
- ♦ sur la teneur en protéines du lait.

Ces données doivent être transmises à l'Office Statistique des Communautés Européennes. La Commission communique ensuite l'ensemble des résultats aux Etats membres.

**Directive 96/33 du Conseil, du 21/5/1996, modifiant les annexes des directives 86/362 et 86/363 de la CEE concernant la fixation de teneurs maximales pour les résidus de pesticides sur et dans les céréales et les denrées alimentaires d'origine animale (JO CE L 144 du 18/6/1996)**

Ce texte complète la liste des pesticides et de leur teneur maximale en résidus dans le lait, en particulier.

**Décision de la Commission du 5/6/1996 autorisant l'Irlande à adapter la méthode de calcul de la teneur en cellules somatiques dans le lait de vache.** Ce texte autorise ce pays à pondérer du mois de novembre au mois de février les calculs qui permettent d'établir la teneur en cellules somatiques du lait afin de prendre en compte son très faible niveau de production laitière pendant cette période. L'absence d'une telle pondération dans ce cas entraîne en effet des dépassements systématiques des seuils fixés par la CEE.

**Règlement n° 1080/96 du 14/6/1996 de la Commission, établissant une méthode de référence pour la détection des coliformes dans le beurre, le lait écrémé en poudre, la caséine et les caséinates (JO CE L 142 du 15/6/1996)**

Ce texte préconise l'utilisation de la norme FIL 73A:1985 et précise simplement les modalités de prise d'essai, de préparation des échantillons et d'évaluation des résultats pour ces trois produits laitiers.

**Règlement n° 1081/96 du 14/6/1996 de la Commission, établissant une méthode de référence pour la détection du lait de vache et de caséinates dans les fromages à base de lait de brebis, de lait de chèvre ou de lait de bufflonne ou de**

mélanges de lait de brebis, de chèvre et de bufflonne et abrogeant le règlement CEE n°690/92 (JO CE L 142 du 15/6/1996)

Le principe de la méthode consiste toujours à détecter le lait de vache au moyen de la focalisation isoélectrique des caséines  $\gamma$ , après action de la plasmine. Mais cette version nouvelle utilise l'interprétation des profils de caséine  $\gamma_3$  et  $\gamma_2$  pour l'identification du lait de vache, alors qu'auparavant seules les  $\gamma_2$  étaient prises en compte.

**Règlement n° 1082/96 du 14/6/1996 de la Commission, portant établissement d'une méthode de référence pour déterminer la quantité d'ester éthylique de l'acide  $\beta$ -apo-8'-caroténique dans le beurre concentré et le beurre. (JO CE L 142 du 15/6/1996)**

Il s'agit d'une méthode spectrométrique qui permet de détecter ce traceur du beurre subventionné et du beurre concentré, afin de prévenir les risques d'utilisation illicite de ces produits.

Règlements n° 1140/96 et n° 1147/96 du 25/6/1996, n° 1311/96 et 1312/96 du 8/7/1996 et n° 1433/96 du 23/8/1996 de la Commission, modifiant les annexes I, II, III et/ou IV du règlement n° 2377/90 du Conseil établissant une procédure communautaire pour la fixation des limites maximales de résidus (LMRs) de médicaments vétérinaires dans les aliments d'origine animale. (JO CE L 151 du 26/6/1996, L 170 du 9/7/1996, L 184 du 23/7/1996)

Ces textes complètent la liste des substances non soumises à une limite maximale de résidus (annexe II). Il s'agit de différents composés inorganiques et organiques. Ils complètent également la liste des LMRs pour certains antibiotiques (benzylpénicilline, streptomycine, gentamycine, notamment) et médicaments du système nerveux (annexe III). Enfin ils rajoutent la colchicine dans la liste des substances pour lesquelles aucune LMR ne peut être fixée.

## **NOTE D'INFORMATION AUX PARTICIPANTS AUX CHAINES D'ANALYSE CECALAIT Traçabilité et valeurs de référence**

**D**epuis maintenant trois ans, les chaînes d'analyses de CECALAIT, dédiées au premier chef aux laboratoires français, se sont ouvertes aux laboratoires étrangers, avec la constitution d'un réseau international encore très informel de laboratoires laitiers adhérents de la FIL.

Jusqu'en fin 1995, ces participations parallèles ont donné lieu pour les critères concernés (Röse-Gottlieb, Kjeldahl, lactose, cryoscopie, matière sèche du lait) à des traitements statistiques parallèles, aboutissant pour chacun à la détermination de ses propres valeurs de référence.

De manière à fournir aux laboratoires les éléments de traçabilité, la position de ces valeurs de référence était indiquée de manière croisée (valeur française dans le traitement international, valeur internationale dans le traitement français), sous forme d'un laboratoire additionnel théorique en dernière position de traitement.

A compter de 1996, ce système de traitements parallèles aux références distinctes est remplacé par un traitement unique sur la base d'une référence commune calculée à partir des résultats de la totalité des participants quelle qu'en soit l'origine.

La traçabilité sera indiquée par le positionnement en laboratoires virtuels additionnels des valeurs de référence (ou moyennes expurgées des résultats anormaux) correspondant aux différents groupes en présence.

Les avantages découlant de ce nouveau système sont les suivants :

- ◆ des références plus robustes, car calculées à partir d'un nombre plus important de résultats, d'où une meilleure précision dans l'évaluation ;
- ◆ la possibilité, sans pour autant accroître le nombre des traitements, de positionner et de comparer plusieurs groupes de laboratoires, identifiés, par exemple :
  - par nationalité (français, internationaux),
  - par catégories (laboratoires interprofessionnels, réseau FIL, réseau contrôle laitier, etc...),
  - par méthodes dans le cadre de l'amélioration conjointe des techniques analytiques,

Un même traitement permet ainsi d'accéder à plus d'informations;

- ◆ un temps de retour des résultats de traitement plus court et donc une meilleure efficacité pour les laboratoires participants.

# EXPRESSION DES RESULTATS PROTEINES EN MATIERE AZOTEE TOTALE

## CONSEQUENCES SUR LE TRAVAIL DES LABORATOIRES

(Résumé de l'intervention de M. GRAPPIN de l'INRA Poligny lors de l'Assemblée Générale de CECALAIT)

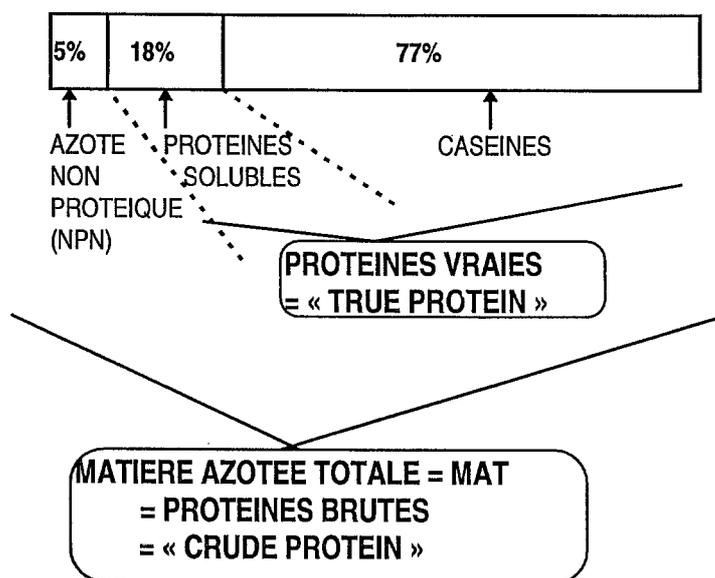
**L**a matière azotée du lait est divisée en une fraction protéique et une fraction non protéique (NPN). En France, la teneur protéique du lait s'exprime en protéines vraies et correspond donc précisément à la valeur de la fraction protéique. Dans les autres pays, en revanche, cette teneur protéique est donnée par la valeur de la matière azotée totale du lait (MAT).

L'expression en protéines vraies est plus juste d'un point de vue scientifique et permet de distinguer clairement les protéines à forte valeur économique et le NPN, sans valeur. D'un point de vue technique, elle simplifie également le calibrage des analyseurs infra-rouge et noir amido et améliore la justesse de leurs résultats. Elle défavorise cependant les producteurs dont les animaux ont artificiellement des taux protéiques plus faibles, par rapport aux autres pays. Passer à un mode d'expression en MAT dans un cadre international oblige admettre des incertitudes plus fortes sur les résultats et à des ajustements d'appareils plus fréquents, ainsi qu'à des ententes sur l'application de facteurs de correction moyens.

**E**n 1992, la FIL avait recommandé d'exprimer la teneur en protéines des laits en matière azotée totale plutôt qu'en protéines vraies pour les transactions internationales. Or la France est le seul pays où producteurs et transformateurs utilisent l'expression en protéines vraies, et ce depuis près de 20 ans. Il apparaît dès lors intéressant et bienvenu de faire le point sur les avantages et inconvénients de ce choix original, ainsi que sur les conséquences et perspectives d'un changement de mode d'expression.

### L'azote du lait : un mélange complexe !

Rappelons que la matière azotée du lait correspond à la juxtaposition des trois fractions ci-dessous.



L'azote total du lait (NT) est donné, par définition par le résultat du dosage de l'azote par la méthode Kjeldahl. La MAT en dérive par multiplication de la valeur d'azote total par le coefficient 6,38. Ce nombre 6,38 est lui-même le résultat d'un compromis entre les coefficients Kjeldahl des caséines, compris entre 6,12 et 6,37, et celui des protéines solubles, compris entre 5,88 et 6,54.

La teneur en protéines vraies est donnée par la formule  $(NT - NPN) \times 6,38$

les valeurs NT et NPN étant toutes les deux issues de la méthode Kjeldahl, appliquée au lait, et à la fraction NPN.

### Expression en MAT ou en protéines vraies : les enjeux

Le débat sur l'expression en protéines vraies ou brutes s'appuie sur trois considérations :

- ♦ le fait que l'azote total englobe l'azote non protéique, mais que le rapport NPN/NT est très variable,

Le pourcentage de NPN varie en fait de 3 à 7% dans le lait, ce qui correspond fidèlement aux variations de la teneur en urée. En effet, ce dernier composant représente près de 50% de la fraction NPN.

- ♦ la valeur économique élevée des protéines,

Elles prennent une part prépondérante dans le paiement du lait, alors que le NPN n'a aucune importance économique.

- ♦ la possibilité de mesurer les protéines vraies.

Or la méthode infra-rouge, comme la méthode noir amido répondent à cet objectif, puisqu'elles sont bien plus spécifiques que la méthode Kjeldahl pour doser les protéines. L'infra-rouge utilise en effet l'absorption des groupements amides secondaires des liaisons peptidiques. La méthode noir amido détecte, elle, les groupes aminés des protéines. En revanche, la méthode Kjeldahl donne un accès direct à la MAT, alors qu'elle doit être divisée en deux étapes pour donner un résultat en protéines vraies.

Le débat « protéines vraies » - « protéines brutes » ne peut cependant s'abstraire de ses implications économiques et analytiques.

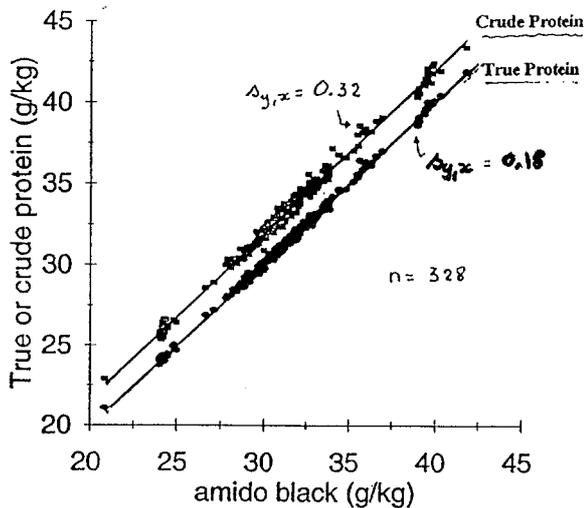
Les implications analytiques ont surtout trait au calibrage des appareils et au contrôle de la justesse.

Les implications économiques concernent le paiement du lait, la sélection des animaux et l'index, l'étiquetage nutritionnel et la standardisation des laits de consommation.

### IMPLICATIONS ANALYTIQUES

Les résultats fournis par les appareils Noir Amido et infra-rouges sont bien mieux ajustés aux valeurs de référence Kjeldahl si les appareils sont calibrés en protéines vraies. (voir, par exemple, la fig. 1)

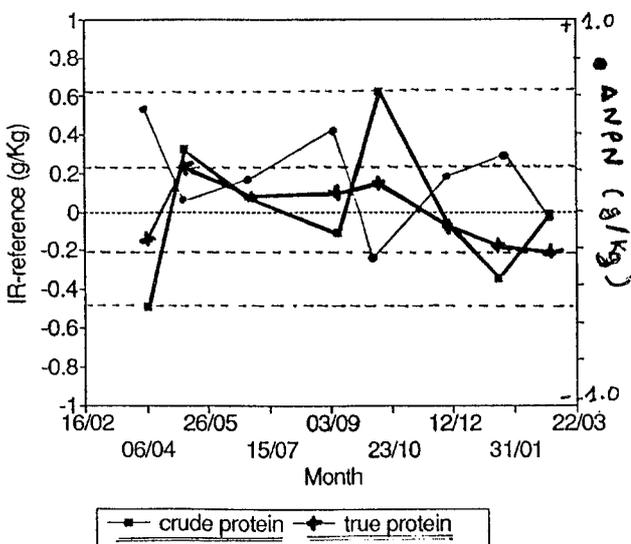
Fig 1 : justesse du dosage des protéines brutes ou vraies du lait par la méthode noir amido



Echantillons collectés pendant un an dans 15 pays européens, analysés sur un seul appareil, calibré avec des échantillons de référence.

Un calibrage en protéines brutes conduit en revanche à d'importantes variations saisonnières, qu'il sera nécessaire de corriger par des calibrages plus fréquents. (voir fig. 2)

Fig. 2 : Variations saisonnières de la différence IR - Kjeldahl sur un appareil calibré en protéines vraies (true protein) ou brutes (crude protein)



Chaque point correspond à la valeur moyenne de 30 échantillons de lait collectés dans 15 pays européens.  $\Delta NPN$  correspond à la différence moyenne entre la teneur en NPN des échantillons de lait destinés à l'étalonnage et celle des échantillons mesurés.

Pour le dosage des protéines par infra rouge, les différentes études menées permettent de dresser les conclusions suivantes :

- ♦ Au sein d'une même population d'échantillons, où les analyses sont effectuées sur un même appareil calibré avec des laits représentatifs de la population, on constate que :

- ↳ le mode de calibrage (protéines vraies ou MAT) sera sans influence sur les résultats provenant d'échantillons de même teneur en protéines vraies. Mais l'intervalle de confiance entre IR et référence sera 2 à 3 fois plus large si les résultats sont exprimés en MAT. En cas de contestation, l'incertitude à accepter sera plus élevée avec ce mode d'expression.

- ♦ Au sein de populations d'échantillons différentes, où les analyses sont :

- soit effectuées en même temps sur des appareils différents calibrés localement,
- soit effectuées à des périodes différentes sur le même appareil, recalibré à chaque période :

- ↳ Quand le calibrage est en MAT, il y a des différences systématiques entre échantillons de même teneur en protéines vraies si leur teneur en NPN diffère. Ce n'est quasiment pas le cas quand le calibrage est en protéines vraies.

Exprimer la teneur des protéines en MAT oblige donc, d'une part à admettre une incertitude plus grande sur les résultats, d'autre part à procéder à beaucoup plus d'ajustements en fonction des produits, des appareils, de la saison...

### IMPLICATIONS ECONOMIQUES

L'étiquetage nutritionnel et la standardisation des laits de consommation sont des points relativement mineurs qui pourraient être résolus assez simplement.

La sélection des animaux et le paiement du lait sont des points autrement plus complexes.

Ainsi les producteurs français sont défavorisés par un mode d'expression de la teneur protéique qui aboutit à des résultats inférieurs d'environ 5% aux résultats obtenus dans les pays où on utilise l'expression en MAT. Appliquer un facteur de correction est évidemment nécessaire.

De même, lors des transactions en particulier internationales, c'est le prix des protéines qui est déterminant. Selon que le résultat en protéines comprend une part de NPN ou non, il faudra d'évidence prévoir un taux de correction.

Or la détermination d'un facteur de correction exact est impossible sans analyses dans chaque cas de figure. Il faudra donc tendre vers l'utilisation d'un coefficient correcteur moyen pour pouvoir ajuster au moins mal les chiffres.

En conclusion, le mode d'expression en protéines vraies apparaît donc tout à fait justifié d'un point de vue scientifique et technique. Cependant, comme la France est seule à l'utiliser et qu'on ne peut entrevoir aucun espoir d'alignement de la part des autres pays laitiers, il sera nécessaire d'utiliser dans un cadre international le mode d'expression en MAT.

On a vu que d'un point de vue analytique, ce passage implique de tolérer plus d'incertitude sur les résultats et oblige à plus d'ajustements. D'un point de vue commercial, il suppose, de plus d'en arriver à la détermination d'un coefficient correcteur moyen. Ceci impliquera des négociations entre de nombreux partenaires aux intérêts parfois divergents et sera vraisemblablement plus d'ordre politique que scientifique et technique.

## **NORMES ET PROJETS DE NORMES PARUS RECEMMENT (reçus entre Avril et Juillet 1996)**

### **NORMES AFNOR**

**NF ISO 13681, V 04-507 Avril 1996 (ICS 07.100.30 ; 67.120.10)**  
VIANDE ET PRODUITS A BASE DE VIANDE. Dénombrement des levures et moisissures : technique par comptage des colonies.

**NF ISO 7218, V 08-002 Mai 1996 (ICS 07.100.00 ; 07.100.30)**  
MICROBIOLOGIE DES ALIMENTS. Règles générales pour les examens microbiologiques

De façon générale, par rapport à la précédente édition, cette version donne beaucoup plus de précisions sur les compétences du personnel, sur les spécifications, la tenue, l'agencement, le contrôle et l'entretien des locaux et du matériel. De la balance au four à micro-ondes en passant par le répartiteur de milieux et les dispositifs pour culture en atmosphère modifiée, cette norme donne de plus des indications sur des équipements de laboratoire qui n'avaient pas été évoqués jusqu'alors. Le paragraphe sur la stérilisation s'enrichit des techniques par filtration. En outre, tout ce qui concerne la réception et le stockage des échantillons se voit notablement développé. Il en est de même pour la partie consacrée au calcul et à l'interprétation des résultats, qui est plus détaillée notamment pour tout ce qui concerne les petits nombres.

Un nouveau paragraphe consacré au principe et aux indications de base sur les méthodes de recherche de microorganismes spécifiques se rajoute au texte. Enfin la partie de la norme

traitant de l'isolement et des cultures pures est complétée par le mode opératoire des premières étapes d'une identification : coloration de Gram, recherche de la catalase et de l'oxydase, utilisation de galeries.

### **NORMES FIL**

**93B:1995 LAIT ET PRODUITS LAITIERS.** Recherche des *Salmonella*

La norme a été très substantiellement modifiée par rapport à sa version précédente (93A 1985). Ainsi dans la phase d'enrichissement dans deux milieux liquides sélectifs, le milieu sélénite-cystine est certes toujours présent, mais l'ancien milieu au tétrathionate est remplacé par le milieu de Rappaport-Vassiliadis au chlorure de magnésium et au vert malachite.

De même dans la phase d'étalement sur gélose qui demande d'ensemencer deux milieux sélectifs solides, le premier milieu reste la gélose au vert brillant et au rouge de phénol. En revanche, la gélose au vert de bismuth est remplacée par un milieu sélectif solide convenable, laissé au choix des laboratoires.

Enfin la norme est complétée par une annexe détaillant les spécifications du vert brillant.

Cette nouvelle norme FIL se rapproche ainsi considérablement du mode opératoire décrit dans la norme AFNOR V 08-013 de décembre 1993.

## **DU COTE DE LA BIBLIO**

Cette fois, nous tentons l'expérience de vous fournir en annexe la liste complète des références intégrées dans notre base de données sur les techniques analytiques laitières au cours du dernier trimestre.

Si vous souhaitez obtenir des précisions sur ces références, n'hésitez pas à prendre contact avec nous...

Enfin, merci de nous faire savoir quelle formule vous préférez : liste complète ou sélection...

# DISPOSITIONS QUALITE POUR LA PRODUCTION DE MATERIAUX DE REFERENCE SECONDAIRES SUR LE LAIT

(Résumé de l'intervention de M. TROSSAT de CECALAIT lors de l'Assemblée Générale de CECALAIT)

**P**our mériter leur nom et remplir leur rôle, les matériaux de référence secondaire (ou échantillons à teneur garantie : ETG) doivent avoir été réalisés selon un ensemble de dispositions qualité strictes. Dès le départ, le lait prélevé doit être de bonne qualité bactériologique et préservé de toute altération physique. Lors du prétraitement du lait, les transferts par soutirage et les séparations par micro- ou ultra-filtration ont le même souci d'éviter l'altération du produit. La mise en flacons qui se fait sans à-coup, sans incorporation d'air respecte ce même principe grâce à un matériel adapté qui permet de plus de suivre le processus à tout moment. La détermination des valeurs de référence dépend du croisement de multiples résultats : résultats internes avec plusieurs opérateurs et/ou répétitions, résultats d'autres laboratoires, participation à des essais interlaboratoires, contrôles instrumentaux....L'expédition des ETG, enfin a lieu dans les meilleures conditions de protection et de rapidité.

**L**a production de matériaux de référence secondaire sur le lait, ou échantillons à teneur garantie (ETG) constitue l'un des deux volets majeurs de l'activité de CECALAIT. Ils se divisent :

- ◆ en ETG destinés au calibrage ou au précalibrage, à savoir les ETG « protéines - Noir Amido », « cellules somatiques », « lipolyse selon la méthode aux savons de cuivre - MSC- » et « moyen infra-rouge » ;
- ◆ en ETG destinés au contrôle de méthodes, à savoir les ETG « matière grasse Gerber », « matière grasse extraction », « azote », « cryoscopie », « matière sèche » et « lipolyse par la méthode BDI ».

Une utilisation en toute fiabilité de ces matériaux leur impose d'être d'une qualité infailible. C'est pourquoi ils sont soumis à un ensemble de dispositions qualité très strict pendant toutes les phases de leur réalisation.

On peut décomposer celle-ci en quatre grandes étapes :

- ◆ le prélèvement du lait et son prétraitement
- ◆ la mise en flacons et les contrôles afférents
- ◆ la détermination des valeurs de référence
- ◆ l'expédition des ETG finis.

## PRELEVEMENT ET PRETRAITEMENT DU LAIT

Le lait doit être de qualité dès le départ. Il est donc de bonne qualité bactériologique, d'une part, et d'autre part il ne doit avoir subi aucun traitement physique, susceptible de l'altérer, par exemple le pompage, le refroidissement, le réchauffage... Dans la pratique, il s'agira donc toujours de lait de petit mélange, d'une seule traite, non refroidi et prélevé directement à la fromagerie.

De même, le prétraitement ne doit pas altérer le lait ou ses composants. Un matériel adapté permet donc de procéder aux opérations de transfert par soutirage; puis de séparer les constituants par micro- ou ultra-filtration. Ainsi, par exemple, les ETG « cellules somatiques » sont réalisés à partir de rétentat, de filtrat de microfiltration et de crème (toujours à partir d'un lait de petit mélange). L'étape de microfiltration utilise une pompe à

membranes, non destructive, et des membranes filtrantes organiques sélectionnées pour leurs constituants et leur porosité.

Après avoir effectué les étapes de concentration puis les mélanges nécessaires, arrive l'étape de la mise en flacons.

## DISTRIBUTION EN FLACONS

Les principes directeurs en sont encore d'éviter toute altération, mais aussi de se donner les moyens de suivre l'ensemble de l'étape.

C'est pourquoi les mélanges sont distribués sans interruption, de façon régulière, sous agitation magnétique constante, et en l'absence de toute incorporation d'air, par soutirage naturel par gravité.

Le matériel nécessaire : flacons, barreaux, cannes, tuyaux de soutirage... est bien sûr de taille et de dimensions adaptées. De plus, les flacons de mélange en verre permettent de vérifier la régularité de l'agitation et de contrôler visuellement l'aspect du lait sur les parois. Enfin les flacons d'échantillon, étanches et robustes, sont remplis au maximum afin d'éviter toute altération pendant leur transport.

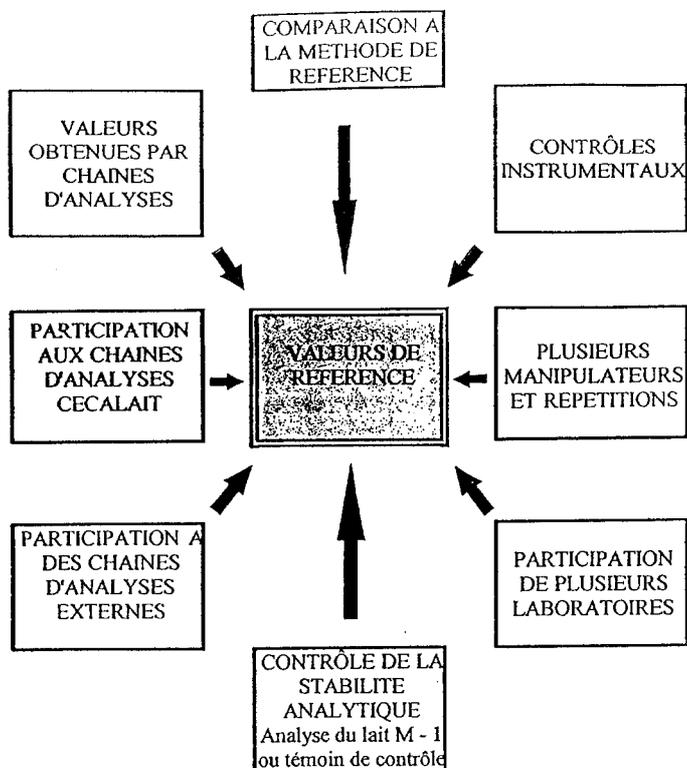
## → CONTROLES

Des tests d'homogénéité sur analyseurs infra-rouge permettent de contrôler cette phase de distribution. C'est notamment le cas pour les ETG « Gerber » et « Matière sèche » où 10% des flacons sont analysés en double et contrôlés sur le critère matière grasse.

## DETERMINATION DES VALEURS DE REFERENCE

C'est évidemment le point clé, qui obéit au schéma ci-après.

Les rubriques « plusieurs manipulateurs et répétitions », et « participation aux chaînes d'analyse CECALAIT » concernent tous les ETG. Il en est de même pour la rubrique « contrôle de la stabilité analytique », à l'exception des ETG « cellules somatiques ». Les possibilités supplémentaires de détermination des valeurs de référence s'appliquent selon les cas, à un ou quelques ETG.



Ainsi les valeurs de référence des ETG « matière sèche » sont, à l'heure actuelle, définies et garanties en :

- ♦ faisant déterminer la teneur en matière sèche selon la méthode normalisée, à un opérateur de CECALAIT sur 8 flacons, avec 2 répétitions,
- ♦ faisant faire la même détermination à un opérateur du LCHA sur 4 flacons, avec 1 répétition,
- ♦ en dosant conjointement le lait du mois et le lait du mois précédent (lait M et lait M - 1), selon la méthode normalisée, par un opérateur de CECALAIT sur 2 flacons et 2 répétitions.
- ♦ participant systématiquement aux chaînes nationales et internationales de CECALAIT

En ce qui concerne les ETG « cellules somatiques », la procédure est un peu plus longue, puisqu'elle comprend :

- ♦ un comptage optique des laits sur 8 laits, avec 2 opérateurs et 2 répétitions,
- ♦ un contrôle instrumental sur 4 appareils automatiques à CECALAIT et dans des laboratoires interprofessionnels et/ou de contrôle laitier,
- ♦ un suivi mensuel des modifications de calibration.
- ♦ un traitement mathématique sur les 9 points de la gamme, à l'aide d'une régression linéaire forcée par 0,
- ♦ la participation systématique chaînes nationales et internationales de CECALAIT,
- ♦ la participation régulière à d'autres chaînes internationales (KIEL),

## EXPEDITION DES COLIS

C'est la dernière étape où il faut s'assurer de l'exactitude du contenu des colis et de leur arrivée rapide à bon port et en bon état.

Les ETG sont donc disposés dans un contenant adapté, en taille et en solidité, bien rempli afin qu'ils ne puissent bouger. Ils sont protégés, si nécessaire, par de la glace. Dans le cadre des abonnements, le contenu de chaque colis est vérifié précisément grâce à des grilles de comptage préétablies. Ceci n'exclut toutefois pas la possibilité de commandes ponctuelles avec départ au jour même.

Enfin la livraison rapide, avant 12h le lendemain en France, est garantie par l'utilisation du service CHRONOPOST.

Dans certains cas, comme les ETG « cellules somatiques », par exemple, la bonne conservation des échantillons est régulièrement vérifiée dans les locaux de CECALAIT.

Il est clair que le respect scrupuleux de l'ensemble de ces dispositions permet seul de garantir une utilisation fiable et profitable aux laboratoires utilisateurs.

## RENDEZ-VOUS

### ⇒ RAPPEL

**20 - 24 OCTOBRE 1996 A SANDTON, TRANSVAAL (AFRIQUE DU SUD) : 80E ASSISES ANNUELLES DE LA FIL**

Pour tout renseignement, prendre contact avec les organismes suivants.

### FIL

C. Brooks  
41, square Vergote  
B 1040 BRUXELLES  
BELGIQUE  
TEL : +32.2.733.98.88  
FAX : +32.2.733.04.13  
E-mail : fil-idf@mail.interpac.be

ou

### ALF

34, rue de Saint Petersburg  
75382 PARIS CEDEX  
TEL : (1).49.70.71.11  
FAX: (1).42.80.63.45

**8 - 12 SEPTEMBRE 1996 : 110E RENCONTRES ANNUELLES ET EXPOSITION DE L'AOAC INTERNATIONAL A ORLANDO, ETATS-UNIS**

Pour tout renseignement, prendre contact avec :

**AOAC International**

481 North Frederick Avenue, suite 500

Gaithersburg, MD 20877-2504

USA

tel : +1/301.924.7077

fax : +1/301.924.7089

E-mail : [aoac@aoac.org](mailto:aoac@aoac.org)

Internet : <http://www.aoac.org>

**➔ AUTRES MANIFESTATIONS**

**2 - 3 SEPTEMBRE 1996 A COPENHAGUE, (DANEMARK) : SYMPOSIUM SUR LES LEVURES**

**6 - 7 SEPTEMBRE 1996 A DUSSELDORF (ALLEMAGNE) : SYMPOSIUM SUR LES CONSEQUENCES DES NORMES CODEX SUR LE COMMERCE INTERNATIONAL DES PRODUITS LAITIERS**

Pour tout renseignement sur ces différentes manifestations, prendre contact avec la FIL ou l'ALF

**3 - 4 OCTOBRE 1996 A NICE (FRANCE) : THE MEDITERRANEAN DAIRY CONFERENCE**

Symposium consacré au lait et aux produits laitiers, aux méthodes de contrôle de leur composition et de leurs propriétés, aux applications de la méthode infra-rouge à transformée de Fourier (IR-TF), à la calibration...

Pour tout renseignement, prendre contact avec :

l'organisateur,

**Figures libres**

24, rue Gounod

92210 SAINT-CLOUD

FRANCE

fax : +(33/1) 41.12.03.31

ou le partenaire officiel,

**Perstorp Analytical**

1, rue Jean Carasso

95870 BEZONS

FRANCE

**19 OCTOBRE 1996 A SANDTON, TRANSVAAL (AFRIQUE DU SUD) : SYMPOSIUM SUR LA STANDARDISATION DES PROTEINES DANS LE CAS DES LAITS LIQUIDES**

**9 - 10 DECEMBRE 1996 EN INDE : SYMPOSIUM SUR LES LAITS POUR LE SEVRAGE ET LES ALIMENTS POUR NOURRISSONS**

Pour tout renseignement sur ces différentes manifestations, prendre contact avec la FIL ou l'ALF