

EVALUATION DE L'ANALYSEUR AMALTHEYS®

L'analyseur Amaltheys® est un analyseur sous brevet fabriqué et commercialisé par la société Spectralys et fonctionnant selon le principe de la fluorescence conventionnelle. Il permet de quantifier les « protéines solubles » (protéines en solution dans la phase liquide non intégrées au système micellaire) du lait et des produits laitiers liquides en utilisant, d'une part le principe de la fluorescence du tryptophane (excitation 280 nm et émission 337 nm), et d'autre part la fluorescence des produits des réactions de Maillard selon le principe de calcul suivant : « indice Fast » = [fluorescence des produits de Maillard (excitation 340 nm et émission 430 nm)] / [Fluorescence du tryptophane (excitation 280 nm et émission 337 nm)] x 100.

Sur le plan technique, cet instrument est muni d'un logiciel interne qui permet le traitement du signal et la réalisation des étalonnages et ajustages. La méthode nécessite une phase de préparation des échantillons (précipitation sélective à l'aide d'un tampon fourni et filtration) et une phase de mesure sur le filtrat.

Les réactifs et consommables sont fournis par le constructeur sous forme de kits. Les étalons et témoins sont également fournis par le constructeur, sous forme lyophilisée à reconstituer extemporanément.

Les essais :

Les essais d'évaluation ont été menés au laboratoire de physico-chimie d'Actilait-Cecalait (analyses instrumentales et analyses de référence) d'avril à juillet 2012 à la demande de la société Spectralys. Après avoir effectué des essais préliminaires de stabilité, linéarité et limites de détection/quantification sur les paramètres « protéines solubles » (PS) et « indice Fast » (IF), la répétabilité (PS et IF) et la justesse (PS uniquement) sur le lait et le lactosérum concentré ont été évaluées.

Le calibrage de l'appareil pour le paramètre PS a été réalisé à l'aide d'un étalon lyophilisé sur la base d'une valeur de référence (azote non caséique: ANC – azote non protéique : ANP). Suite au calibrage, une vérification a été effectuée à l'aide d'un lait lyophilisé sur la base d'une valeur ANC-ANP. Une vérification a été effectuée en préliminaire à chaque série de mesures.

A- ESSAIS PRELIMINAIRES

A.1- Evaluation de la stabilité à court terme

16 séries de 3 échantillons de lait (cru, pasteurisé et UHT) ont été analysées, en double consécutifs, toutes les 15 minutes pendant 4 heures environ. Les paramètres PS et IF ont été relevés.

Pour le paramètre PS, on peut observer que les écarts-types de reproductibilité relatifs obtenus varient entre 2,9 et 5,0 % suivant le type de lait.

Pour le paramètre IF, les écarts-types de reproductibilité relatifs sont équivalents pour tous les types de lait traités thermiquement entre 4,1 et 4,3 %.

A.2- Evaluation de la linéarité pour le paramètre « protéines solubles »

Une gamme de 10 laits régulièrement répartis de 0 à 6 g/L environ a été réalisée par mélange de lait cru et de lait UHT. Les dilutions volume/volume ont été réalisées par pesées corrigées des masses volumiques. La gamme a été analysée en doublant consécutivement chaque échantillon.

Sur la base des résultats observés, on peut constater que la linéarité de l'instrument est satisfaisante de 0 à 6 g/L de PS.

A.3- Evaluation de la limite de détection et quantification

Des dilutions régulières de lait UHT et d'eau, en deçà de 50 mg/L de PS ont été réalisées, par pesées corrigées des masses volumiques. Les échantillons ont été analysés en quadruple. Les limites de détection et quantification ont été déterminées conformément à la norme NF V 03-110 : 1998.

Sur la base des résultats observés, les limites ont été calculées comme suit : Uld (détection) = 4 mg/L et Ulq (quantification) = 11 mg/L.

On observe que les limites de détection et de quantification de l'instrument Amaltheys sur le paramètre « protéines solubles » sont relativement faibles au regard des autres méthodes existantes sur le sujet.

B- LAIT

B.1- Echantillons

Les essais ont été réalisés à partir d'échantillons de lait cru, pasteurisé et UHT. Le lait cru était constitué de lait de citernes et de producteurs et le lait pasteurisé et UHT provenait de GMS. Les échantillons ont été additionnés de bronopol à 0,02 % final.

3 séries de 15 échantillons ont été constituées. Chaque série était réalisée à partir d'un type de lait (cru, pasteurisé ou UHT) et de lait de mélange correspondant (cru-pasteurisé, pasteurisé-UHT et UHT-pasteurisé) afin de générer une variabilité des taux.

B.2- Procédure

La répétabilité de l'appareil a été évaluée sur l'ensemble des échantillons de lait pour les 2 paramètres (PS et IF). La justesse, quant à elle, a été évaluée sur l'ensemble des échantillons de lait pour le paramètre PS. Les dosages ont été effectués en doublant consécutivement chaque échantillon et un lait de contrôle a été analysé au début et à la fin afin de vérifier la stabilité de l'appareil.

Les méthodes de référence : ISO 17997 / FIL 29 pour l'azote non caséique (ANC), NF EN ISO 8968-5 / FIL 20-5 pour l'azote non protéique (ANP) et méthode selon Rowland⁽¹⁾ (azote non caséique après dénaturation ANC_d) ont été utilisées pour l'évaluation de la justesse du paramètre PS.

Les valeurs de référence sont calculées comme suit : PS = (ANC – ANP) x 6,38 et fraction protéose-peptone (PP) = (ANC – ANC_d) x 6,38.

B.3- Résultats

Les tableaux et figures ci-après résument les résultats obtenus :

		n	min	max	M	Sx	Sr	Sr (%)	r
LAIT CRU	PS (g/L)	15	4,51	5,37	5,00	0,26	0,10	2,07	0,29
	IF	15	0,00	8,33	2,70	2,43	0,17	6,24	0,47
LAIT PASTEURISE	PS (g/L)	15	1,46	5,25	3,95	1,27	0,11	2,81	0,31
	IF	15	3,36	27,84	9,68	8,09	0,34	3,56	0,96
LAIT UHT	PS (g/L)	15	0,78	2,25	1,28	0,40	0,09	6,76	0,24
	IF	15	19,41	75,49	41,31	17,23	2,26	5,46	6,25
GLOBAL	PS (g/L)	45	0,78	5,37	3,41	1,76	0,10	2,95	0,28
	IF	45	0,00	75,49	17,90	20,14	1,32	7,38	3,66

Tableau 1 : critères de répétabilité de l'AMALTHEYS pour les paramètres PS et IF sur échantillons de lait.

n : nombre de résultats ; *min* et *max* : valeur minimum et maximum ; *M* et *Sx* : moyenne et écart-type des résultats ; *Sr* et *Sr%* : écart-type de répétabilité absolu et relatif ; *r* : écart maximal de répétabilité dans 95% des cas.

		n	min	max	Y	Sy	d	Sd	Sy,x	Sy,x%	b	a
LAIT CRU	PS (g/L)	15	4,87	6,12	5,67	0,38	-0,67	0,15	0,099	1,99	1,427	-1,46
LAIT PASTEURISE	PS (g/L)	15	1,77	5,40	4,12	1,21	-0,17	0,12	0,104	2,65	0,948	0,37
LAIT UHT	PS (g/L)	15	0,99	2,08	1,54	0,37	-0,26	0,15	0,140	10,96	0,858	0,44
GLOBAL	PS (g/L)	45	0,99	6,12	3,78	1,88	-0,37	0,26	0,241	7,08	1,059	0,17

Tableau 2 : critères de justesse de l'AMALTHEYS pour le paramètre PS sur échantillons de lait

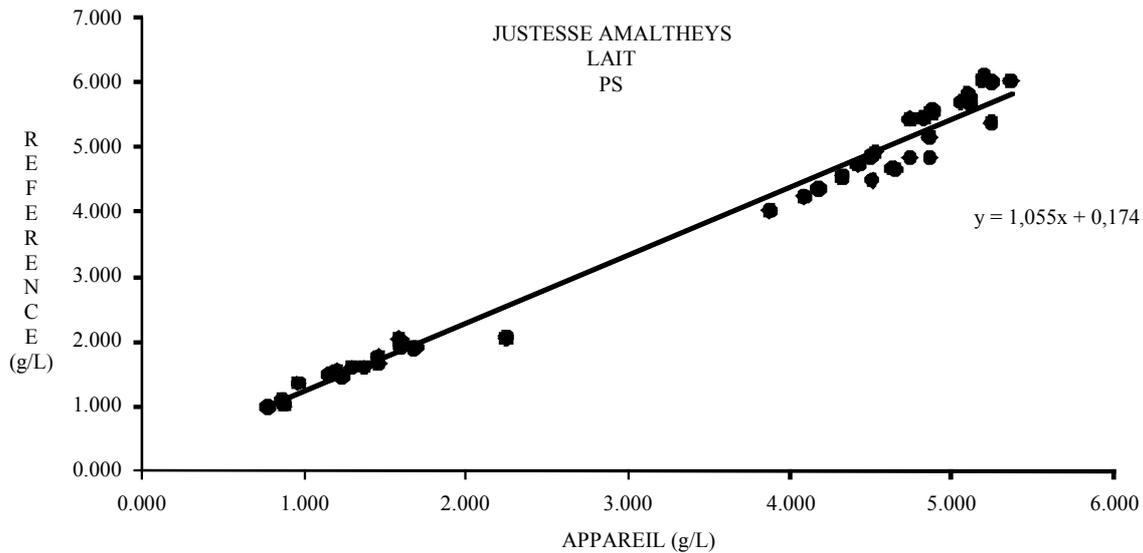


Figure 1 : Relation entre AMALTHEYS et référence pour le paramètre PS sur échantillons de lait

On remarque pour le paramètre PS, une pente de régression de 1,055 significativement différente de 1,00 au seuil de 5 % et une ordonnée à l'origine de +0,174 g/L (non significatif au seuil de 5 %). L'écart-type résiduel de régression est égal à 0,214 g/L. Une réflexion a été engagée sur les causes des écarts observés entre les deux méthodes (-0,17 à -0,67 g/L). Il est ainsi apparu qu'une des fractions significative des « protéines solubles », les protéoses peptones (issues de la protéolyse de la caséine β par la plasmine et se trouvant à un niveau d'environ 1 g/L dans un lait cru) ne comportent pas de résidu tryptophane et par conséquent ne sont pas dosés par l'appareil Amaltheys.

Une exploitation complémentaire des données a donc été effectuée pour comparer les résultats obtenus par l'instrument Amaltheys calibré sur la fraction ANC-ANP-PP (par application directe d'un coefficient calculé sur la base de la composition du calibrant aux résultats obtenus sur le calibrage ANC-ANP) et la teneur en « protéines solubles » obtenue par Kjeldahl diminuée de la concentration en protéoses peptones (soit ANC-ANP-PP).

Les résultats sont présentés dans le tableau et les figures ci-dessous :

	n	min	max	Y	Sy	d	Sd	Sy,x	Sy,x%	b	a
PS-PP (g/L)	45	0,99	6,12	3,78	1,88	0,36	0,23	0,142	5,61	1,139	-0,71

Tableau 3 : critères de justesse de l'AMALTHEYS pour le paramètre PS-PP sur échantillons de lait

n, min, max : nombre de résultats, valeur minimum et maximum ; *Y, X* : moyenne des résultats par méthode de référence et instrumentale ; *Sy* : écart-type des résultats par méthode de référence ; *d, Sd* : moyenne et écart-type des écarts ; *Sy,x* et *Sy,x%* : écart-type résiduel absolu et relatif ; *b, a* : pente et ordonnée à l'origine de la régression linéaire.

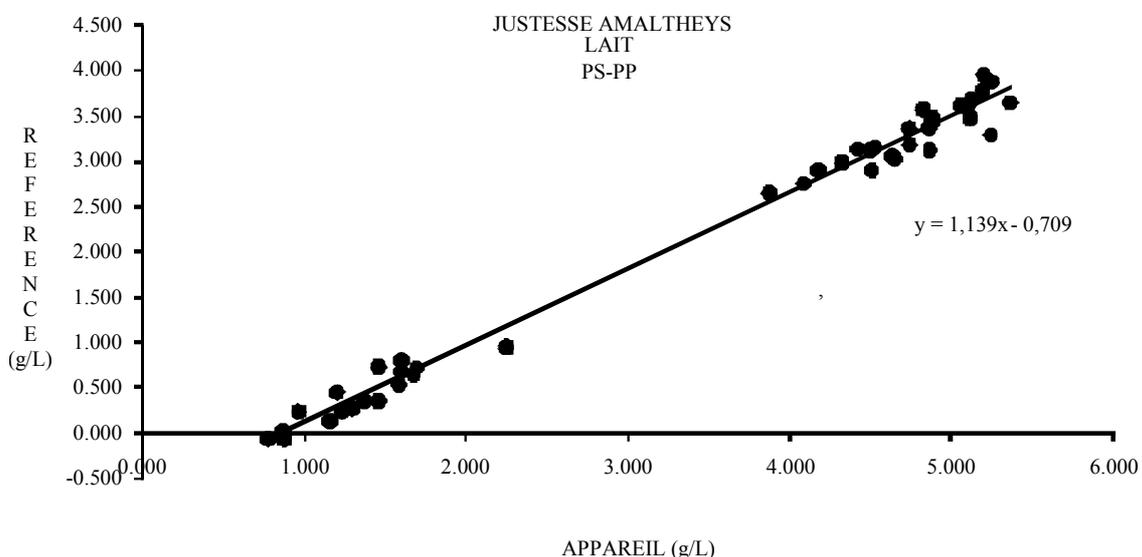


Figure 2 : Relation entre AMALTHEYS et référence pour le paramètre PS-PP sur échantillons de lait

On observe, pour le paramètre PS–PP, une pente de régression de 1,139 et une ordonnée à l'origine égale à -0,709 significativement différentes de 1,00 et 0,00 au seuil de 5 %. L'écart-type résiduel de cette régression est égal à 0,142 g/L.

B.4- Conclusion

Concernant les « protéines solubles », on remarque que les écarts-types de répétabilité obtenus sont similaires pour les 3 types de lait à un niveau d'environ 0,10 g/L. Les valeurs obtenues sont en concordance avec celles de la norme ISO 17997/FIL 29 : 2004 pour la détermination de la teneur en azote non caséique du lait ($S_r = 0,092$ g/L). Concernant l'« indice Fast », on peut remarquer que les écarts-types de répétabilité obtenus sont différents suivants les niveaux rencontrés dans les échantillons. L'écart-type relatif global (tous échantillons confondus) est égal à 7,4 %.

Pour le paramètre PS, on remarque que l'écart-type résiduel de régression linéaire (calculé sur les différents types de lait) est égal à 0,241 g/L d'où une précision d'estimation de cette méthode alternative de $\pm 0,482$ g/L sur ce paramètre. On peut également constater que si l'on s'intéresse au paramètre PS-PP, l'écart-type résiduel de régression diminue significativement pour atteindre 0,142 g/L (précision d'estimation de $\pm 0,28$ g/L) mais présente un défaut d'ajustement de pente important (de l'ordre de 14 %) et un biais moyen de 0,36 g/L sur les produits et la gamme de teneur étudiés.

C- LACTOSERUM

C.1- Echantillons

Les essais ont été réalisés à partir d'échantillons de lactosérum concentré. Trois lactosérums (fabrication fromage à pâte cuite, pâte pressée et pâte molle à croûte fleurie) ont été collectés puis concentrés par ultrafiltration sur membrane 10KD. Les échantillons ont été additionnés de bronopol à 0,02 % final.

Une série de 12 échantillons a été constituée par mélange des différents lactosérums concentrés afin de générer une variabilité des taux.

C.2- Procédure

La répétabilité et la justesse de l'appareil ont été évaluées sur l'ensemble des échantillons de lactosérum concentré pour le paramètre PS. Les déterminations ont été effectuées en doublant consécutivement chaque échantillon et un lait de contrôle a été analysé au début et à la fin afin de vérifier la stabilité de l'appareil.

Les méthodes de référence utilisées pour l'évaluation de la justesse étaient identiques à celles utilisées pour le lait avec des prises d'essai adaptées (cf B.2).

C.3- Résultats

Les tableaux et figures suivants récapitulent les résultats obtenus :

	n	min	max	M	Sx	Sr	Sr (%)	r
PS (g/L)	12	32,11	50,67	41,52	6,50	0,99	2,38	2,74

Tableau 4 : critères de répétabilité de l'AMALTHEYS pour le paramètre PS sur échantillons de lactosérum concentré

n : nombre de résultats ; *min* et *max* : valeur minimum et maximum ; *M* et *Sx* : moyenne et écart-type des résultats ; *Sr* et *Sr%* : écart-type de répétabilité absolu et relatif ; *r* : écart maximal de répétabilité dans 95% des cas.

	n	min	max	Y	Sy	d	Sd	Sy,x	Sy,x %	b	a
PS (g/L)	12	31,12	51,42	41,27	7,02	0,25	2,88	3,015	7,26	0,986	0,35

Tableau 5 : critères de justesse de l'AMALTHEYS pour le paramètre PS sur échantillons de lactosérum concentré
n, *min*, *max* : nombre de résultats, valeur minimum et maximum ; *Y*, *X* : moyenne des résultats par méthode de référence et instrumentale ; *Sy* : écart-type des résultats par méthode de référence ; *d*, *Sd* : moyenne et écart-type des écarts ; *Sy,x* et *Sy,x%* : écart-type résiduel absolu et relatif ; *b*, *a* : pente et ordonnée à l'origine de la régression linéaire.

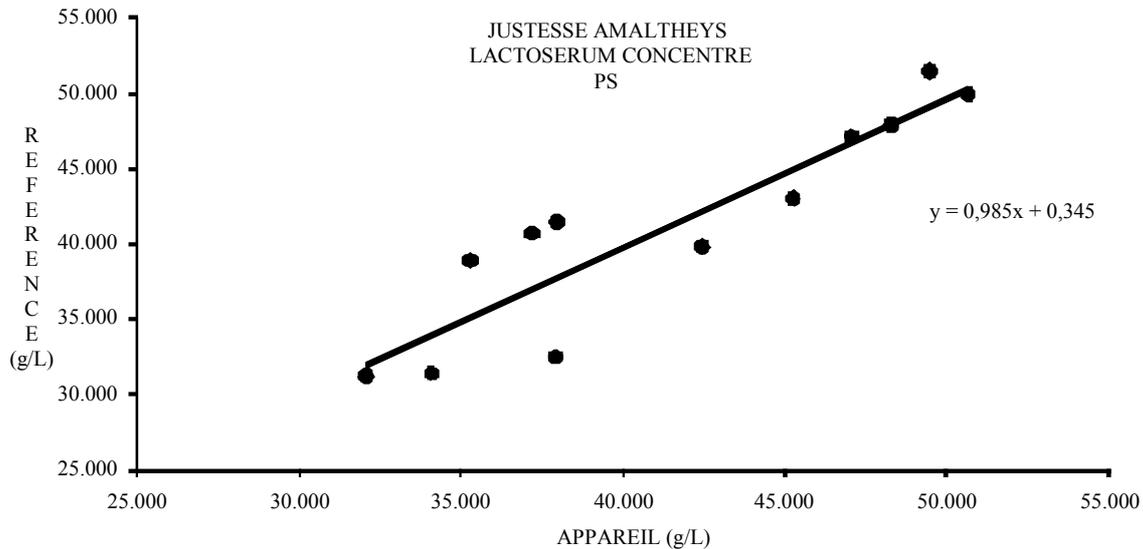


Figure 3 : Relation entre AMALTHEYS et référence pour le paramètre PS sur échantillons de lactosérum concentré

On observe, pour le paramètre PS, une pente de régression linéaire de 0,985 et une ordonnée à l'origine de +0,345, non significativement différentes respectivement de 1,00 et 0,00 (au seuil de 5 %). L'écart-type résiduel est égal à 3,015 g/L.

Une exploitation des données complémentaires a été réalisée en suivant la même approche que pour le lait. Les résultats sont présentés ci-après :

	n	min	max	Y	Sy	d	Sd	Sy,x	Sy,x %	b	a
PS-PP (g/L)	12	25,15	39,08	32,21	5,08	-1,45	0,75	0,759	2,47	1,043	0,12

Tableau 6 : critères de justesse de l'AMALTHEYS pour le paramètre PS-PP sur échantillons de lactosérum concentré

n, *min*, *max* : nombre de résultats, valeur minimum et maximum ; *Y*, *X* : moyenne des résultats par méthode de référence et instrumentale ; *Sy* : écart-type des résultats par méthode de référence ; *d*, *Sd* : moyenne et écart-type des écarts ; *Sy,x* et *Sy,x%* : écart-type résiduel absolu et relatif ; *b*, *a* : pente et ordonnée à l'origine de la régression linéaire.

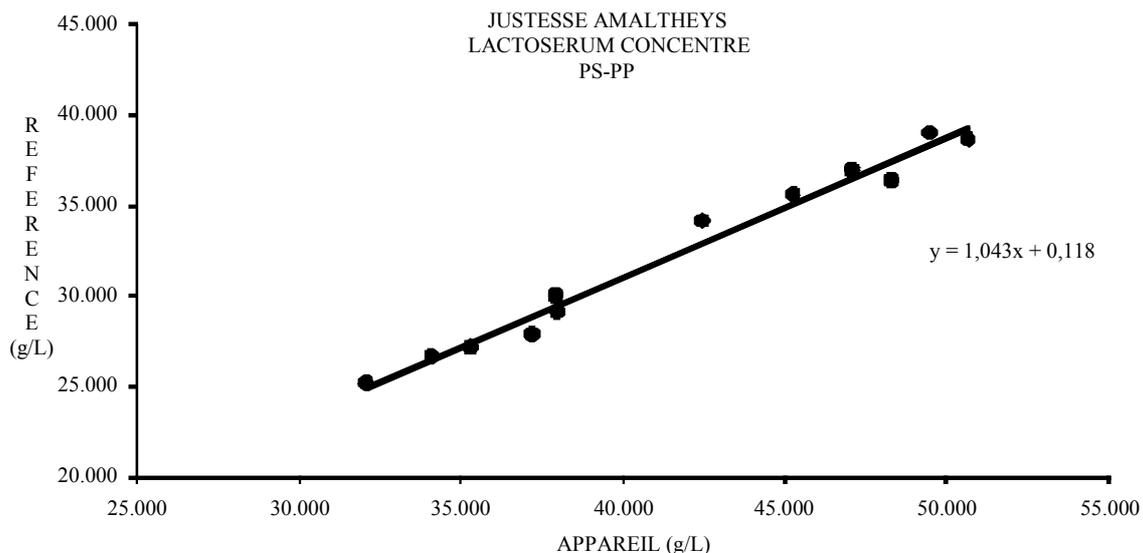


Figure 4 : Relation entre AMALTHEYS et référence pour le paramètre PS-PP sur échantillons de lactosérum concentré

On observe, pour le paramètre PS-PP, une pente de régression et une ordonnée à l'origine respectivement de 1,043 et -0,118. L'écart-type résiduel est égal à 0,759 g/L.

C.3- Conclusion

On remarque, pour le paramètre PS, que l'écart-type de répétabilité obtenu est égal à 0,99 g/L correspondant à 2,38 % en valeur relative.

La détermination du paramètre PS-PP avec le calibrage adapté permet d'obtenir une amélioration significative de la précision d'estimation de l'instrument ($\pm 6,030$ g/L à $\pm 1,518$ g/L) sur lactosérum concentré.

CONCLUSION GENERALE

On peut tout d'abord constater une bonne répétabilité de l'analyseur Amaltheys sur la détermination des « protéines solubles » et autres fractions mesurées au cours de l'exploitation complémentaire de données.

Au niveau de sa justesse sur ces paramètres, nous pouvons retenir plusieurs points de cette évaluation :

Il a été constaté une corrélation (pour les laits et les lactosérums concentrés) entre la méthode Amaltheys et la méthode de référence, et ce pour les deux paramètres PS et PS-PP (avec des précisions d'estimation différentes). En effet, la méthode Amaltheys ne permet pas de doser la fraction « protéose-peptone » du lait et des produits laitiers liquides du fait de l'absence de résidu tryptophane sur les peptides correspondants. De ce fait, la précision d'estimation (PE) de cette méthode sera améliorée significativement en s'intéressant au paramètre « protéines solubles » minorée de la fraction « protéose peptone » ($PS-PP = ANC-ANC_d$) plutôt qu'à la fraction protéine soluble seule ($PS = ANC-ANP$) et ce, pour les laits (PE respectivement de $\pm 0,48$ à $\pm 0,28$ g/L) et les lactosérums concentrés (PE respectivement de $\pm 6,03$ g/L à $\pm 1,52$ g/L).

Pour les échantillons de laits, nous avons constaté que la pente et l'ordonnée à l'origine de la régression linéaire Amaltheys vs méthode de référence sont significativement différentes respectivement de 1,00 et 0,00, et ce sur les paramètres PS ($b = 1,059$ et $a = +0,17$) et PS-PP ($b = 1,139$ et $a = -0,71$), indiquant un décalage entre les deux méthodes (décalage moyen respectivement de $-0,37$ et $+0,36$ g/L). Après étude, il s'avère que la fraction « protéoses peptones » déterminée selon Rowland contient une part d' α -lactalbumine non dénaturée (sur la base des tables de dénaturation de Dannenberg et Kessler⁽²⁾) qui présente un signal par la méthode Amaltheys. Ceci a également été confirmé par l'analyse qualitative par HPLC du filtrat PP (réalisée par Spectralys).

Dans ce cadre, si on affectait totalement cette fluorescence résiduelle à de l' α -lactalbumine non dénaturée, le biais de pente pourrait être significativement réduit en intégrant ce facteur, mais néanmoins, on conserverait une ordonnée à l'origine significativement différente de 0,00 du même ordre que celle de la régression initiale PS-PP. Ce constat devra bien entendu être confirmé par des analyses d' α -lactalbumine spécifiques sur l'étalon et des échantillons de lait.

Pour les échantillons de lactosérum concentré, on a pu remarquer que les écarts observés étaient moins importants (en % relatif) que sur le lait.

En conclusion sur ce point, il reste donc des investigations (et confirmations) à mener pour trouver une explication technique et scientifique aux écarts de justesse observés lors de cette évaluation sur les différents types d'échantillons testés. Plusieurs pistes pourront ainsi être étudiées (réactif de précipitation, processus de filtration, modèle de prédiction du capteur ou paramètre de composition du lait) pour une bonne compréhension de la mesure et un éventuel ajustage.

Enfin, la répétabilité obtenue pour l'« indice Fast » pour les laits de consommation (pasteurisé et UHT) est bonne (Sr % respectivement de 3,5 et 5,5 %). Il reste cependant à définir un descripteur pertinent pour une étude de justesse. En effet, les premiers essais par rapport à la furosine sur les laits UHT n'ont pas été jugés adaptés compte tenu que la teneur en furosine du lait a tendance à diminuer au cours du stockage⁽³⁾ et que ces premiers essais ont été réalisés sur des échantillons présentant une durée de stockage variable après production.

Bibliographie :

(1) - ROWLAND S.J. The determination of the nitrogen distribution in milk. Journal of Dairy Research, 1938, V. 9, p. 42-46.

(2) - DANNENBERG F. et KESSLER H.G. Application of reaction kinetics to the denaturation of whey proteins in heated milk. Milchwissenschaft, 1988, 43, 3-7

(3) - CORZO N., LOPEZ-FANDINO R., DELGADO T., RAMOS M., OLANO A. Changes in furosine and proteins of UHT treated milks stored at high ambient temperatures. Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung, 1994, 198, 302-306