

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

juillet 1994

# LA LETTRE

# N° 11

# DE

# CECALAIT

CECALAIT INRA SRTAL BP 89 39801 Poligny TEL : 84.73.63.20 TELECOPIE : 84.37.37.81  
MINICOM : 36 12, nom CECALAIT, n° d'appel 84.73.63.20

Rédaction achevée le 26 Juillet 1994

Equipe rédactionnelle :

O. LERAY, A. BAPTISTE

## SOMMAIRE

- Applications de la biologie moléculaire à l'industrie laitière p. 1-2
- Info. Validation p. 2
- Etiquetage des laits de consommation : indication de la teneur en protéines p. 2
- Analyse des fromages par spectrométrie infrarouge p. 3-4
- Essais interlaboratoires pour le contrôle qualité des analyses : les besoins des laboratoires laitiers en Europe p. 4
- Normes, projets de normes et règlements parus récemment p. 6
- Du côté de la biblio... p. 7

# APPLICATIONS DE LA BIOLOGIE MOLECULAIRE A L'INDUSTRIE LAITIERE

(Résumé de l'intervention de M. BRANGER - ENILBIO Poligny -

lors de l'Assemblée Générale de CECALAIT

## Des possibilités nouvelles pour la détection de flores spécifiques.

Les techniques de biologie moléculaire utilisent des marqueurs génomiques et accèdent ainsi au niveau de spécificité le plus fin, qui permet, par exemple, à l'intérieur d'une même espèce de distinguer les souches réellement pathogènes, des autres.

### NB

Acides nucléiques :

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

ARNm : ARN messager

ARNr : ARN ribosomal

PCR : polymerase chain reaction

multiplier la quantité d'acide nucléique détectable. Dans le deuxième cas, cette amplification s'est déjà faite naturellement puisque de multiples copies d'ARN sont présentes dans la cellule.

Après dissociation (dans certaines conditions de température ou de force ionique) des deux brins constituant les acides nucléiques, on cherchera à repérer la cible par hybridation (réassociation) avec une sonde nucléique, complémentaire de la cible recherchée. La sonde aura été synthétisée au préalable (synthétiseur d'oligonucléotides), multipliée et marquée par un isotope radioactif, par des antigènes susceptibles de donner des réactions colorées ou fluorescentes, ou par des réactifs bioluminescents... Un grand nombre de sondes sont déjà disponibles dans le commerce.

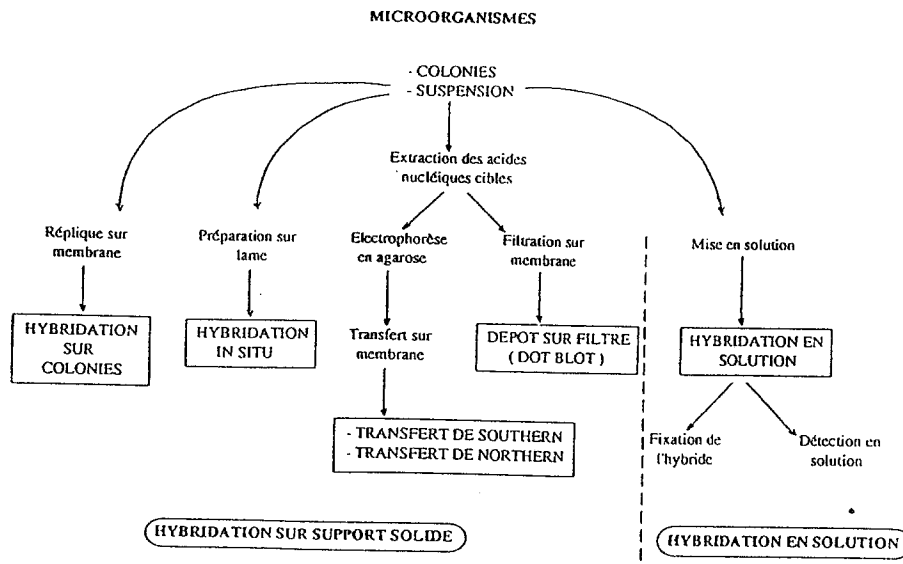
## PRINCIPE

Dans ces techniques, il s'agit de cibler un gène spécifique, soit au niveau de l'ADN, soit au niveau de l'ARN. Dans le premier cas, une amplification ultérieure par PCR sera nécessaire pour

## HYBRIDATION

La Figure 1 schématise les différentes techniques d'hybridation actuelles.

figure 1



Les techniques d'hybridation sur support solide sont d'un principe plus simple - en particulier pour la détection des produits hybridés -, mais nécessitent un grand nombre de manipulations assez délicates. Elles sont donc pour l'heure difficiles à automatiser et sont du domaine des laboratoires de recherche.

L'hybridation en solution est en revanche plus facilement automatisable et plus susceptible d'être utilisée en routine. C'est sur ce principe que reposent les kits de détection de *Listeria monocytogenes*, Gene-Trak™ et Gen-Probe™, dont la validation AFNOR est en cours.

## Des tests d'avenir...

Le tableau 1, ci-dessous, compare les différents types de détection microbienne : microbiologie "classique", techniques immunologiques, techniques de biologie moléculaire. Il montre nettement les avantages de ces dernières, à savoir leur spécificité, leur sensibilité et leur rapidité.

Cependant leurs limitations apparaissent également. Elles concernent essentiellement :

\* la détection de toxines; si les bactéries productrices les ont libérées dans les échantillons mais sont mortes, un test trop peu sensible sera négatif,

\* la possible détection, par des tests très sensibles, d'ADN

provenant de bactéries mortes,

\* la présence dans les aliments, d'agents inhibiteurs des réactions mises en jeu.

Tableau 1

	Détection de bactéries		Détection de toxines	Rapidité	Spécificité	Sensibilité	Possibilités d'amplification	Inhibitions
	Vi-vantes	Mortes						
Biologie moléculaire	+	+	- (sauf par gènes libres en solution)	+	+++	+	rapide par PCR	Par protéines et sels
Microbiologie classique	+	-	+ techniques particulière	-	+ --	-	par culture (lent)	Par flore secondaire
Sérologie	+	+ ou -	+ seulement les protéines	+	+	-	par culture (lent)	Par protéines

comparaison de trois types de techniques de détection microbienne.

La présence d'inhibiteurs et les prises d'essai très faibles utilisées dans ces tests interdisent, de fait, l'utilisation en direct des tests génétiques dans les aliments. Une étape de mise en culture de l'échantillon est nécessaire.

Il n'en reste pas moins que ces tests semblent appelés à remplacer avantageusement certains tests traditionnels, y compris au niveau industriel.

## INFO. VALIDATION

Une nouvelle méthode rapide d'analyse microbiologique a été validée récemment par l'AFNOR

Il s'agit du "système d'immuno-analyse Mini Vidas avec le kit VIDAS Salmonella", de BIOMERIEUX, validé en Avril 1994.

Applicable à tous les produits d'alimentation humaine ou animale, ce test repose sur l'utilisation d'un automate, le système VIDAS. Celui-ci est basé sur une réaction immuno enzymatique fluorescente qui a lieu en phase solide. Les présumés positifs doivent être confirmés par la voie classique d'un enrichissement suivi d'une isolation et d'une identification,

## ETIQUETAGE DES LAITS DE CONSOMMATION

### INDICATION DE LA TENEUR EN PROTEINES

Mme LAIRIE du laboratoire interrégional de la DGCCRF à Rennes nous informe de la position de la DGCCRF concernant l'indication de la teneur en protéines sur l'étiquetage des laits de consommation.

Cette information n'est pas exigée par la réglementation communautaire spécifique au lait. Lorsqu'elle est fournie, elle constitue donc une allégation nutritionnelle, au sens de la loi française (décret 93.1130 du 27.9.1993). Dès lors, cette indication ne peut figurer seule sur l'étiquetage. elle doit être accompagnée de la valeur énergétique, de la teneur en glucides et en lipides.

La teneur en protéines annoncée sur l'étiquetage est une valeur moyenne, qui doit être exprimée par 100 g ou 100 ml et calculée selon la formule "Azote total x 6,25".

La DGCCRF rappelle; en outre que les laits de consommation doivent répondre aux exigences suivantes :

\* teneur minimale de 28 g/l de MAT (Matières Azotées Totales = azote total x 6,38) pour les laits importés,

\* teneur en protéines de 31,5 g/l/protéines pour les laits produits et vendus en France (soit (azote total - azote non protéique) x 6,38).

# ANALYSE DES FROMAGES PAR SPECTROMETRIE PROCHE INFRAROUGE

(Résumé de l'intervention de M. MAZEROLLES - INRA Poligny -

lors de l'Assemblée Générale de CECALAIT

Depuis quelques mois, l'INRA de Poligny a entamé des travaux en vue d'une détermination rapide des taux d'humidité et de matière grasse dans les fromages.

Cette étude s'est faite à l'aide d'un spectrophotomètre dispersif - prêté par la société américaine NIR System / Perstorp SA, qui le fabrique. Cet appareil permet des analyses quantitatives dans le domaine spectral du proche infrarouge (PIR), l'absorption des échantillons étant mesurée en mode transmittance. Les dosages ont été effectués sur des fromages de type pâte pressée et pâte pressée cuite, au démoulage.

## Un vaste domaine de variation en eau et en MG pour la calibration

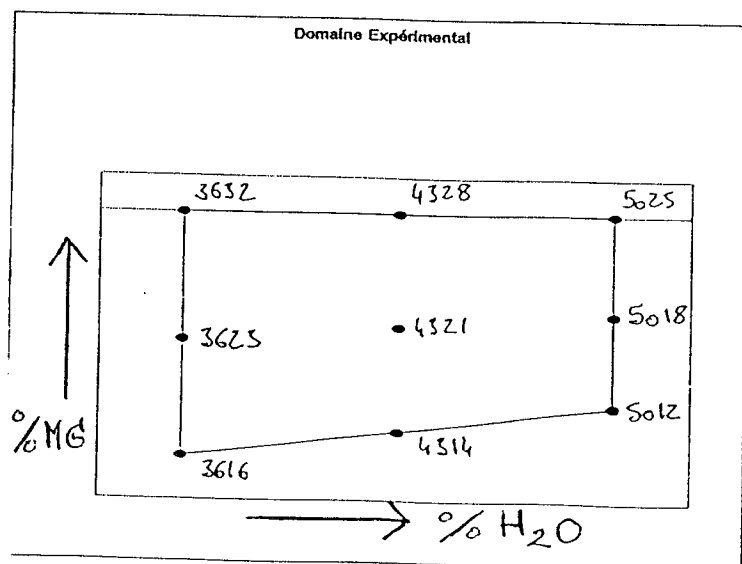
La première étape de l'étude a consisté à calibrer l'appareil, c'est à dire à établir, à l'aide de fromages expérimentaux, des relations entre :

- > la teneur en eau, respectivement en MG,
- > leurs absorbances caractéristiques.

Cette calibration devra ensuite être validée sur des fromages réels dans un deuxième temps.

Pour bien mettre en évidence les bandes d'absorption et mieux estimer les coefficients des modèles de calibration, c'est un vaste domaine de variation en MG et extrait sec qui a été couvert. La **Figure 2** montre les limites et les points centraux du domaine expérimental défini dans l'étude. Les nombres indiquent la composition du fromage : les deux chiffres de gauche correspondent au pourcentage d'humidité du fromage; les deux chiffres de droite à la MG.

Figure 2



Ce domaine a été ensuite l'objet d'un maillage régulier, mais déséquilibré afin d'obtenir un maximum de points de mesure dans les régions correspondant aux fromages réellement fabriqués en milieu industriel.

24 fromages pilotes ayant en gros les teneurs demandées ont ensuite été fabriqués à la mini-fromagerie de l'INRA et ont été soumis aux mesures IR et aux dosages de l'eau et de la MG par des méthodes chimiques (étuve et méthode de Heiss, respectivement).

La mesure IR correspond à la moyenne de 32 mesures spectrales effectuées en des points différents de l'échantillon de fromage broyé. Celui-ci est introduit dans un sac de polyéthylène et placé dans un module de transport, à savoir une cellule rectangulaire d'épaisseur constante qui se déplace devant la source lumineuse, de façon linéaire, perpendiculairement au rayon infra rouge.

## Des corrections mathématiques sont nécessaires

Les spectres bruts obtenus doivent nécessairement être corrigés pour être exploités. En effet, on observe des phénomènes de décalage des bandes d'absorption et des lignes de base. L'utilisation de la dérivée seconde des courbes permet la correction de ces phénomènes gênants.

Pour arriver ensuite à une exploitation satisfaisante des résultats, permettant de relier absorbance et teneur, le traitement statistique le plus approprié a été le PLS (régression selon les moindres carrés partiels). Cette approche permet de bâtir un modèle mathématique en prenant en compte l'ensemble des longueurs d'onde balayées - alors que d'autres techniques statistiques obligent à une sélection préalable de longueurs d'onde.

Les résultats ainsi obtenus permettent d'obtenir une bonne corrélation entre les absorbances mesurées et les teneurs en eau, respectivement en MG.

On obtient ainsi  $S_{y,x} = 0,286$  pour la courbe "teneur en eau en fonction de l'absorbance" (cf courbe Figure 3)

et  
 $S_{y,x} = 0,438$  pour la courbe "MG en fonction de l'absorbance" (cf courbe Figure 4).

avec

y : valeur obtenue par la méthode de référence  
x : valeur donnée par l'appareil

Fig. 3 : relation teneur en eau -absorbance

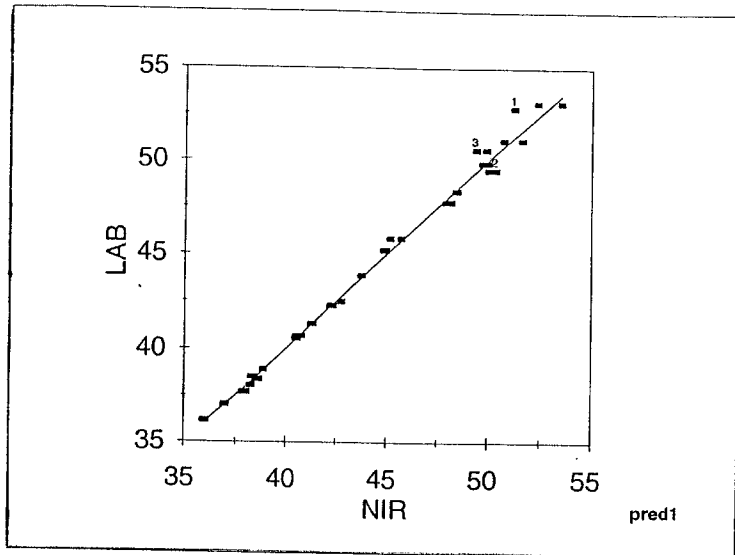
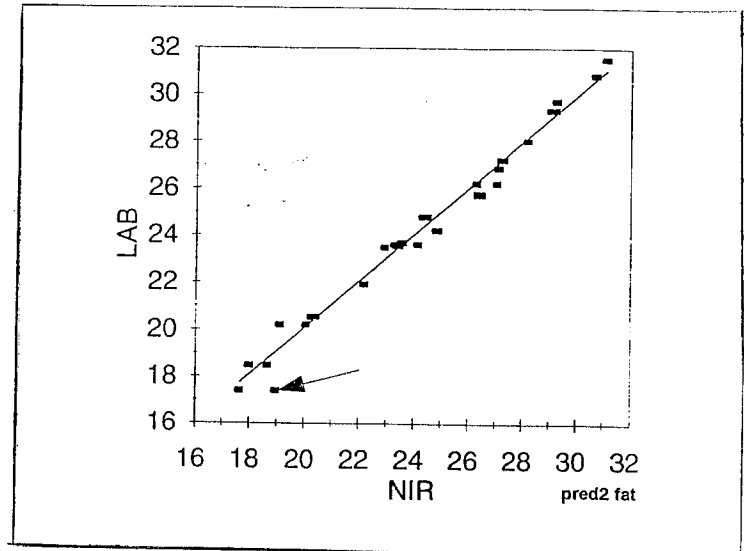


Fig. 4 : relation teneur en MG -absorbance



Les prédictions sur la composition en eau et en MG semblent donc correctes dans un large domaine, grâce à l'utilisation de ces techniques mathématiques de correction.

La validation de cette calibration sur des fromages "réels", fabriqués en milieu industriel est en cours actuellement. L'ensemble de ces travaux fera l'objet d'une publication.

## ESSAIS INTERLABORATOIRES POUR

### LE CONTROLE QUALITE DES ANALYSES :

## LES BESOINS DES LABORATOIRES LAITIERS EN EUROPE

Nous résumons ici une partie de l'intervention de M. GRAPPIN, lors de l'Assemblée Générale de CECALAIT en Juin 1994, intervention consacrée au contrôle qualité des analyses au niveau international.

Une partie de cet exposé reprenait les principales conclusions d'une enquête effectuée auprès des principaux laboratoires Européens (+ 1 laboratoire néo-zélandais) sur leurs réalisations et leurs besoins en matière d'essais interlaboratoires et d'échantillons à teneur garantie (ETG). Ce questionnaire avait été adressé fin 1992 - début 1993 aux Comités Nationaux de la FIL (via la FIL) et aux plus importants laboratoires européens.

### Des réalisations, mais encore de grands besoins à satisfaire !

L'enquête montre l'existence, à l'heure actuelle, d'un grand

nombre de chaînes d'analyses d'intercomparaison de laboratoires, surtout pour les éléments majeurs du lait cru. Cependant nombre de besoins concernant d'autres analytes et d'autres matrices se sont exprimés. Les résultats présentés ci-dessous n'ont retenu que les demandes considérées comme les plus pressantes, c'est à dire celles qui ont été émises par plus de 20% des laboratoires ayant répondu au questionnaire.

Les demandes concernant les analyses physico-chimiques ont été regroupées dans le **tableau 2** (NB : certains des critères évoqués dans ce tableau font déjà l'objet d'essais interlaboratoires en France et en Europe).

D'autres matrices : caséinates, lait UHT ou pasteurisé, lait homogénéisé... et d'autres analytes : phosphatase, mycotoxines, pesticides... ont également été mentionnés dans les réponses, mais de façon beaucoup plus sporadique.

**Tableau 2 Essais interlaboratoires physico-chimiques jugés les plus intéressants  
d'après le nombre de demandes mentionnées**  
(en % de demandes par rapport au nombre de laboratoires ayant répondu au questionnaire)

	MG	protéines	lactose	MS	autres
lait cru	89 %	89 %	79 %	53 %	point de congélation : 68 % AGL : 47 % AGT : 26% inhibiteurs : 42 % cellules somatiques : 26 %
lait en poudre	37 %	37 %	21 %	42 %	NO <sub>2</sub> - NO <sub>3</sub> : 21 %
crème	26 %				
beurre	31 %			31 %	NaCl : 21 %
fromage	68 %	37 %		68 %	NO <sub>2</sub> - NO <sub>3</sub> : 26 % Ca : 26 % Na Cl : 68 % détection lait vache : 16 % ★

AGL : acides gras libres

AGT : acides gras totaux

MS : matière sèche

★ détection du lait de vache dans les fromages de chèvre ou de brebis : cité parce que très important dans certaines économies

Les demandes concernant les analyses microbiologiques ont été regroupées dans le tableau 3 (NB : certains des critères évoqués dans ce tableau font déjà l'objet d'essais interlaboratoires en France et en Europe).

Dans ce domaine ont également été mentionnés d'autres matrices et d'autres micro-organismes, notamment : *Bacillus cereus*, les levures et moisissures...

**Tableau 3 Essais interlaboratoires microbiologiques jugés les plus intéressants  
d'après le nombre de demandes mentionnées**  
(en % de demandes par rapport au nombre de laboratoires ayant répondu au questionnaire)

	lait cru	lait en poudre	fromage
flore totale	76 %	47 %	
psychrotrophes	41 %		
coliformes	59 %	24 %	24 %
<i>Escherichia coli</i>	42 %	35 %	47 %
<i>Staphylococcus aureus</i>	35 %	42 %	47 %
<i>Salmonella</i>		35 %	
<i>Listeria monocytogenes</i>	35 %		59 %
<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	42 %		35 %

Le domaine des échantillons à teneur garantie apparaît beaucoup moins diversifié. Les secteurs où ils sont les plus répandus sont le calibrage d'analyseurs infrarouge et de compteurs de cellules somatiques pour l'analyse du lait cru.

Leur utilisation semble néanmoins appelée à se développer, si l'on en croit les résultats d'une enquête récemment publiée par la

FIL (Bulletin de la FIL, n° 285 de 1993, pages 3 à 5)

Le contrôle de la qualité des analyses, l'évaluation des performances analytiques est clairement une préoccupation de l'ensemble des laboratoires. La mise au point, le développement et l'utilisation d'autres essais interlaboratoires reste un souhait très largement partagé.

# NORMES, PROJETS DE NORMES ET REGLEMENTS PARUS RECEMMENT

## Liste des normes ou projets de normes FIL ou AFNOR reçus entre Avril et Juillet 1994

(10/6/1993, cf Lettre de CECALAIT n° 9)

### NORMES FIL

**LAIT ET LAIT EN POUDRE : 167:1994** (équivalente à ISO/CD 14378) Détermination de la teneur en iode (*méthode par chromatographie liquide à haute performance*)

### NORMES AFNOR

**X 06-049 octobre 1993** Recommandations pour l'organisation des essais d'aptitude des laboratoires dans le domaine de l'agroalimentaire

### METROLOGIE - ESSAIS

**X 07-015 décembre 1993:** Métrologie dans l'entreprise . Raccordement des résultats de mesure aux étalons

**X 07-016 décembre 1993:** Métrologie dans l'entreprise . Modalités pratiques pour l'établissement des procédures d'étalonnage et de vérification des moyens de mesure.

**X 07-143 décembre 1993:** Conception et réalisation des essais. Pertinence et représentativité des essais.

## Règlementation

### FRANCE

**Décret n° 93-1239 du 15/11/1993 (JO France du 17/11/1993)** relatif à l'agrément des produits laitiers d'appellation d'origine contrôlée.

Il définit le cadre et les modalités d'application et de contrôle d'un "déclaration d'aptitude AOC" pour les exploitations laitières et les ateliers de transformation ou d'affinage concernés.

**JO France du 24/11/1963.** Avis aux professionnels de l'alimentation relatif à l'élaboration de guides de bonnes pratiques hygiéniques.

Cet avis recommande aux professionnels d'élaborer de tels guides et en décrit les grandes lignes.

**JO France du 2/12/1963.** Avis relatif à la production de laits traités thermiquement en vue de leur mise sur le marché communautaire.

C'est la nouvelle liste des établissements producteurs, titulaires de la marque de salubrité, prévue par l'arrêté du 12/03/1993. Cette liste annule et remplace l'avis précédent

**Arrêté du 30/3/1994 (JO France du 21/4/1994)** relatif aux critères microbiologiques auxquels doivent satisfaire les laits de consommation et les produits à base de lait lors de leur mise sur le marché. à l'hygiène de la production et de la collecte du lait.

C'est l'incorporation dans la réglementation française des critères fixés pour ces produits par les textes européens. La même chose avait déjà été faite pour le lait cru à la production et à la collecte (arrêté du 18/3/1994, cf Lettre de CECALAIT n° 10). L'ensemble des critères microbiologiques définis par la directive CEE 92/46 du 16/6/1992 (cf Lettre de CECALAIT n° 5) a donc été intégré aux textes de loi français.

**JO France du 17/5/1994.** Avis relatif aux méthodes et normes utilisables pour la détermination des critères microbiologiques auxquels doivent satisfaire les laits de consommation et les produits à base de lait lors de leur mise sur le marché.

C'est une liste indiquant les références normatives (FIL, ISO ou AFNOR) des méthodes de référence et des méthodes de routine applicables dans ce cas. Seule la méthode de recherche de *Listeria monocytogenes* est intégralement développée et reprend la norme AFNOR V 08 055 de décembre 1993.

### CEE

**Règlements CEE n° 2901/93, 3425/93, 3426/93 et 955/94 de la Commission, respectivement des 23/10/1993, 15/12/1993, 15/12/1993 et 29/4/1994** modifiant les annexes I et II ou III et IV du règlement CEE n° 2377/90 établissant une procédure communautaire pour la fixation des limites maximales de résidus des médicaments vétérinaires dans les aliments d'origine animale.

A nouveau, il s'agit de compléter les listes:

- des substances pharmacologiquement actives pour lesquelles des limites maximales provisoires de résidus ont été fixées, en annexe I.
- des substances non soumises à une LMR, en annexe II.
- des substances pharmacologiquement actives utilisées dans les médicaments vétérinaires pour lesquelles des limites maximales provisoires ont été fixées, en annexe III.

Pour le lait, ces règlements fixent des LMR pour les sulfamides et les tétracyclines (100 µg/kg).

- des substances pharmacologiquement actives pour lesquelles aucune LMR ne peut être fixée, en annexe IV

## DU COTE DE LA BIBLIO...

Une petite rubrique pour donner rapidement les thèmes dominants qui ressortent d'un dépouillement régulier de la littérature scientifique et technique dans notre domaine!

En physico-chimie, on observe une floraison de travaux sur le dosage des traces de métaux. La détection des résidus de pesticides, des vitamines mais aussi la mesure du point de congélation du lait sont d'autres thèmes souvent traités.

En microbiologie, ce sont les études portant sur la détection des antibiotiques et sulfamides qui sont de loin les plus nombreuses ! Les travaux sur *Listeria* et *Salmonella* sont également très fréquents...sans surprise !

S'adresser à CECALAIT pour tout renseignement complémentaire...