

LA DETERMINATION DE LA TENEUR EN PROTEINES VRAIES PAR LA METHODE AU NOIR AMIDO

Description et points critiques

La méthode au noir amido est une méthode pratique permettant de déterminer la teneur en protéines vraies du lait [(NT-NPN) x 6,38], normalisée au niveau d'AFNOR sous le numéro NF V 04-216.

Cette méthode est applicable au lait cru de vache, de chèvre et de brebis, mais également au lait de process des précédentes espèces pour autant que la composition en protéine (rapport caséines – protéines sériques) n'ait pas été modifiée.

***Note :** La norme NF V 04-216 comprend également des annexes informatives pour déterminer la teneur en protéines vraies sur des produits à des teneurs différentes de celles du lait et également pour une composition différente en protéines.*

Principe analytique :

Le principe général de cette méthode est l'addition d'une solution de noir amido à une prise d'essai de lait. Cette opération va conduire à la formation d'un complexe insoluble entre les protéines de l'échantillon et le noir amido. Le complexe est ensuite éliminé par centrifugation (ou filtration) et la densité optique de la solution de noir amido surnageante est mesurée à l'aide d'un colorimètre (à une λ de 578 ou 620 nm), puis transformée en concentration en protéines vraies à l'aide d'une équation de calibrage.

Le réactif : la solution de noir amido

La solution de noir amido est constituée de :

- Colorant noir amido 10 B
- Hydrogène-orthophosphate de sodium (di-hydraté)
- Acide citrique (monohydraté)

Cette solution peut être achetée en solution prête à l'emploi (PAE) ou réalisée par le laboratoire conformément au protocole défini en § 5.2.1 de la norme.

Dans les deux cas, cette solution doit être vérifiée sur deux points par le laboratoire :

- Le pH qui devra être de $2,4 \pm 0,1$. Cette caractéristique a une importance sur la formation du complexe insoluble lors de l'addition de la solution à une prise d'essai de lait. On prendra soin d'ajuster le pH-mètre sur la plage de mesure (de pH 2 à pH 7 par exemple) pour réaliser cette vérification.
- La densité optique à 620 nm ($c = 10$ mm) d'une solution à 1 % qui devra être comprise entre 0,695 et 0,735. La justesse de la dilution est bien sûr un élément à maîtriser pour avoir une mesure correcte (on pourra utiliser le distributeur utilisé pour la prise d'essai de lait pour délivrer exactement 1 ml de la solution de noir amido dans une fiole jaugée de 100 ml).

La mesure devra être effectuée avec un trajet optique de 10 mm ($\pm 0,1$ mm), de ce fait, seule une cuve de type VOS (verre optique spécial) présente l'assurance de cette dimension. Une cuve à usage unique en plastique ne permet pas de garantir ce type de spécification (sa mesure est également très compliquée du fait des caractéristiques du plastique utilisé).

Ce trajet optique impacte directement la mesure de densité optique et cette vérification est nécessaire pour assurer que les mesures se feront dans le domaine de linéarité du colorimètre.

Le matériel :

La méthode au noir amido utilise différents types de matériel qui, pour la majorité, doivent répondre à des spécifications normatives ou non :

- **Tubes** permettant de distribuer le lait et la solution de noir amido : Il n'y a pas de réelles spécifications pour les tubes. Néanmoins, leurs dimensions doivent permettre après distribution du lait et du noir amido d'avoir un "volume vide" significatif rendant possible une bonne agitation du mélange.
- **Un ou des système(s) de distribution**
Le(s) système(s) de distribution doit (vent) répondre aux spécifications de la norme NF V 04 216, soit :

- 1 ml ± 0,02 avec un CV % < 0,15 % pour le système de distribution du lait
- 20 ml ± 0,05 avec un CV % < 0,20 % pour le système de distribution de la solution de noir amido

Il est entendu que cette procédure de vérification se fera conformément aux spécifications de la norme ISO 8655-6 : Appareils volumétriques à piston : Méthodes gravimétriques pour la détermination de l'erreur de mesure (sur 10 mesures).

Un défaut à ces spécifications pourrait engendrer, soit des problèmes de répétabilité (CV %), soit une zone de mesure à l'extérieure de la zone de linéarité du colorimètre (volume moyen).

Différents systèmes existent et peuvent être utilisés pour distribuer le lait et la solution de noir amido (seul ou en combiné) pour autant qu'il satisfasse aux prescriptions ci-dessus : distributeur automatique pour une distribution du lait et du noir amido, pipette à déplacement positif pour le lait ou distributeurs à piston pour le noir amido.

○ Un système d'agitation

Le système d'agitation a pour objectif de permettre le mélange des tubes et ainsi la fixation du noir amido sur les protéines, un système par retournements est approprié (roues, système mécanique, ...).

Les tubes devront être agités 10 minutes pour assurer une fixation optimale du colorant sur les protéines.

NB : le nombre de « places » disponibles sur l'agitateur étant limité, on prendra soin de distribuer le noir amido (ou le mélange lait-noir amido) uniquement dans les tubes pouvant être agités immédiatement après la distribution.

○ Une centrifugeuse

La centrifugation a pour objectif de séparer le culot (protéines et noir amido) et le surnageant (solution de noir amido résiduelle) afin de mesurer l'absorbance (concentration) de cette dernière à l'aide du colorimètre. La seule spécification de cet instrument est de produire une accélération d'environ 350 g de manière à permettre la séparation du précipité et du surnageant qui est obtenue après un temps de 5 min. En pratique, les laboratoires utilisent majoritairement les centrifugeuses utilisées pour la méthode « Gerber ».

○ Un photomètre

Celui-ci doit être équipé d'une cuve de mesure avec un trajet optique de 0,2 à 1 mm (en pratique, nous rencontrons exclusivement des cuves de 1 mm). Il doit permettre de travailler à des longueurs d'ondes comprises entre 550 et 620 nm (en pratique, les longueurs d'onde utilisées correspondant au maximum de sensibilité du noir amido sont 578 et 620 nm).

Au niveau fluïdique, on prendra soin de limiter au maximum la longueur du tuyau entrant dans la cuve, étant générateur de traçage (qui se matérialise par une valeur du 1^{er} tube différente des autres tubes du même échantillon)

Les appareils, pouvant être pilotés par un PC, doivent permettre une opération d'ajustage de l'instrument.

NB : 2 appareils sont autorisés d'emploi pour les analyses dans le cadre du paiement du lait à la qualité : ATL33 et CECIL 2031/2041

- **Le calibrage (ajustage) et la vérification :**

Afin de prédire des résultats en g de protéines vraies par litre ou par kg de lait, le photomètre doit être calibré à l'aide de laits étalons (réalisés à partir de lait en poudre) encadrant les mesures (3 étalons par gamme : Riche (R), Moyen (M) et Pauvre (P) sont disponibles).

A l'aide du logiciel de l'instrument, un modèle de prédiction est réalisé entre l'absorbance de la solution surnageante et la concentration en protéines de l'étalon.

Suivant les instruments, différents modèles mathématiques sont possibles : le modèle curviligne est le plus adapté (étant plus proche de la réponse instrumentale), en cas d'impossibilité, un modèle linéaire peut convenir (on pourra ensuite recalculer le modèle en externe (Excel) à partir des absorbances obtenues pour les étalons et leurs concentrations respectives en protéines)

Au niveau du mode opératoire : après avoir réalisé un blanc à partir d'une dilution de la solution de noir amido (prédiction en « équivalent protéines de l'ordre de 40 à 42 g/litre pour une gamme type lait de vache), analyser au minimum 3 échantillons par étalon pour calculer la fonction d'étalonnage.

Une vérification doit ensuite être réalisée par l'analyse du lait de contrôle (lait de vache cru entier) dont la valeur obtenue en protéines (3 échantillons au minimum) doit être en concordance avec la valeur de référence du lait de contrôle (limite au maximum de ± 0,15 g/litre). La non concordance de la valeur du lait de contrôle à l'intérieur de cette limite ne permet pas de valider l'ajustage initial.

Le suivi de stabilité :

Lors de chaque série analytique, il est nécessaire de vérifier la stabilité de la mesure. En effet, plusieurs facteurs peuvent venir influencer les prédictions en utilisant la fonction d'étalonnage initiale : température des échantillons et de la solution du noir amido (impactant le volume distribué), évolution des distributeurs, valeur intrinsèque du zéro, dérive du photomètre, ...).

Cette vérification peut être réalisée avec des laits de transferts ⁽¹⁾ (3 échantillons à des teneurs avoisinant les teneurs des étalons réalisés à partir de lait en poudre et un lait témoin entier définis immédiatement après calibrage) ou des laits étalons et le lait de contrôle.

En pratique, ces laits sont analysés au minimum en double dans chaque série analytique et les valeurs observées sont confrontés aux valeurs cibles définies après l'ajustage initial :

- Si les valeurs observées sur les laits de transfert restent dans une limite de $\pm 0,15$ g/litre par rapport aux valeurs cibles, la stabilité de la mesure est confirmée.
- Si les écarts entre valeurs observées sur un ou plusieurs laits de transfert et valeurs cibles sont supérieures à $\pm 0,15$ g/litre, calculer une correction mathématique des résultats, soit à l'aide d'une équation de correction curviligne, soit à l'aide d'un facteur moyen de correction (sur la base de valeurs observées des laits de transferts). Cette correction mathématique est tout d'abord appliquée à la valeur « brute » du lait témoin : le fait de retrouver la valeur cible avec une tolérance de $\pm 0,15$ g/litre sur le lait témoin permettra de valider la correction mathématique établie à partir des valeurs des laits de transferts.
- Une fois la correction validée, celle-ci est ensuite appliquée aux valeurs « brutes » des autres laits de la série analytique.

⁽¹⁾ *On prendra soin de vérifier la stabilité des laits de transferts sur la période d'utilisation*

Conclusion :

La méthode au noir amido est une méthode pratique et rapide permettant de prédire des résultats sur le lait équivalents à ceux obtenus par la méthode Kjeldahl.

Sa mise en œuvre est relativement aisée mais son processus opératoire et notamment les opérations d'ajustage et de vérification de stabilité doit être suivi précisément pour assurer la qualité des résultats.