

- [4] MOHR : *Deut. Molkerei Zeitung*, 1937, 58, 782.
[5] Pien : *Le lait*, 1949, 29, 461.
[6] E. E. VAN DE GEHUCHTE : *Zuivelgids*, p. 257 (Vyncke-Gent).
[7] E. E. VAN DE GEHUCHTE : *Zuivelgids*, p. 260-261 (Vyncke-Gent).
[8] E. E. VAN DE GEHUCHTE : *Zuivelgids*, p. 290 (Vyncke-Gent).

SUPPLEMENT TECHNIQUE

LE PAIEMENT DU LAIT D'APRÈS SA TENEUR EN PROTÉINES ET LE DOSAGE DE CETTE DERNIÈRE

par

G. GÉNIN

Ingénieur E.P.C.I.

On a reconnu depuis déjà longtemps qu'il est profondément anormal de payer le lait, bien entendu non seulement d'après son poids, mais essentiellement d'après sa teneur en graisse alors que dans beaucoup de cas ce lait est transformé en produits qui, tels que le fromage, contiennent essentiellement les graisses et les protéines du lait sous une forme concentrée.

Si, pendant de nombreuses années, cette situation s'est maintenue, ce n'est pas par le désir de conserver une façon de faire défectueuse, mais plutôt par suite du fait qu'on ne disposait pas de méthode simple, rapide et précise permettant d'effectuer un contrôle journalier et portant sur des centaines d'échantillons, de la teneur en protéines ou de l'extrait sec dégraissé du lait.

C'est devant l'importance toujours plus grande que l'on reconnaît aujourd'hui aux protéines du lait dans la nourriture de l'homme que les chercheurs de laboratoire se sont attachés à la question et sont parvenus à mettre au point des méthodes plus rapides et cependant suffisamment précises pour permettre la détermination de la teneur en protéines du lait.

Il n'est pas étonnant que l'application de ces méthodes se soit rapidement généralisée dans les pays importants producteurs de fromage, comme par exemple les Pays-Bas, et deux grandes Associations coopératives laitières ont dès à présent adopté ces méthodes permettant le paiement du lait en fonction de sa teneur en protéines.

La première des Associations à établir un programme d'analyse en série d'échantillons de lait a été celle de la Frise qui a fait appel à la méthode d'entraînement par la vapeur de Kofranyi. Plus récemment, le Laboratoire central de l'Association des Coopératives laitières de Gelderland Overijssel a suivi l'exemple, mais en utilisant cependant une méthode basée sur la fixation de certaines matières colorantes par les protéines, méthode estimée se prêtant mieux à l'analyse de nombreux échantillons. Il est probable que cette façon de faire sera prochainement imitée par d'autres associations néerlandaises, ainsi que par d'autres pays producteurs de lait [1].

Nous allons donc donner dans ce qui suit une analyse des principales méthodes dont on dispose aujourd'hui pour le dosage des protéines dans le lait, en insistant bien entendu plus particulièrement sur celles qui sont aujourd'hui adoptées industriellement et qui permettent d'effectuer par exemple plusieurs centaines, sinon plusieurs milliers d'analyses par jour.

On a constaté d'ailleurs que ce procédé de contrôle, outre qu'il a permis de rétribuer plus rationnellement les producteurs de lait d'après la valeur industrielle de ce produit, a permis également aux éleveurs de réaliser des progrès dans la voie de la fourniture aux laiteries d'un lait plus riche en protéines :

1° En procédant à un contrôle régulier de la teneur en protéines du lait fourni par chaque animal. Les fermiers ont pu ainsi sélectionner les vaches produisant un lait riche en protéines, procéder à des croisements convenables et choisir la nourriture et les conditions d'élevage favorisant la production d'un lait riche en protéines.

2° En déterminant la teneur moyenne en protéines du lait fourni par un fermier. Ce contrôle a donc permis de rétribuer celui-ci en fonction des efforts entrepris pour améliorer la qualité du lait.

Aux Pays-Bas où ce contrôle est désormais réalisé par les deux coopératives que nous avons indiquées ci-dessus, le prix du lait est fixé en tenant compte de trois facteurs : la quantité livrée, la teneur en graisse et la teneur en protéines. Le prix payé pour 100 kg de lait varie de 5 à 6,5 guilders suivant l'époque de l'année, la graisse est rétribuée au tarif de 3,05 à 3,55 guilders pour chaque pourcentage de graisse contenu dans 100 kg de lait, et la teneur en protéine est rétribuée d'après un tarif qui varie de 1,30 à 2,35 guilders pour 1 p. 100 de protéines contenues dans 100 kg de lait. On détermine chaque quinzaine les moyennes des teneurs en graisse et en protéines du lait fourni et le prix d'achat est fixé périodiquement.

MÉTHODE DE KOFRANYI

Cette méthode repose sur un principe signalé par KOFRANYI ; décrit par cet auteur en 1950 [2] et consiste à effectuer un entraînement en milieu alcalin au moyen de vapeur d'eau afin de recueillir l'ammoniac fourni par les protéines. Cette méthode a fait récemment l'objet d'une étude approfondie de H. LOLKEMA, et A. J. VAN DER HAVE [3] qui ont décrit le mode opératoire adopté, l'appareillage nécessaire à l'exécution de ce dosage, et les différents facteurs qui sont susceptibles d'intervenir dans la précision de la méthode. Les résultats obtenus au cours d'une longue période d'essai ont montré que la reproductibilité des résultats fournis par la méthode Kofranyi est égale à celle des résultats que l'on obtient avec la méthode Kjeldahl. La déviation standard des différences observées entre les résultats fournis par ces deux méthodes s'élève à 0,040 p. 100. Nous avons indiqué dans le tableau ci-dessous l'évolution de la teneur en graisse et en protéine du lait livré par des fermiers à une laiterie hollandaise de 1957 à 1958, les indications se rapportant à des périodes successives de 4 semaines, le début des essais ayant été fixé au 12 mai 1957.

TENEUR MOYENNE EN GRAISSE ET EN PROTÉINE
DU LAIT FOURNI PAR DES FERMIERS EN 1957 ET 1958

Périodes de 4 semaines	Teneur moyenne		Déviation standard		Variance	
	graisse	protéine	graisse	protéine	graisse	protéine
	%	%	%	%	%	%
1	3,71	3,22	0,22	0,22	5,9	6,8
2	3,68	3,33	0,20	0,20	5,4	6,0
3	3,63	3,19	0,21	0,15	5,8	4,1
4	3,80	3,21	0,21	0,15	5,5	4,7
5	4,00	3,37	0,24	0,17	6,0	5,0
6	4,37	3,59	0,27	0,19	6,2	5,3
7	4,48	3,63	0,34	0,26	7,6	7,2
8	4,27	3,55	0,29	0,21	6,8	5,9
9	4,25	3,52	0,28	0,22	6,6	6,3
10	4,16	3,45	0,29	0,25	7,0	7,3
11	3,98	3,37	0,32	0,24	8,0	7,1
12	3,75	3,26	0,22	0,20	5,9	6,1
13	3,67	3,14	0,23	0,21	6,3	6,7

Les mêmes auteurs ont également procédé à des études statistiques sur la composition du lait en fonction de la nature des terrains où sont élevés les troupeaux, et en procédant à des comparaisons d'une année à une autre, afin de mettre en évidence les causes de variation pouvant être attribuées au temps.

On peut dire que la nature de l'alimentation a une influence sensible, en particulier pendant la période où les animaux sont nourris à l'étable, et cette influence se manifeste non seulement sur la composition du lait, mais également sur le rendement en lait. On a également observé de légères variations de la teneur en protéines et en graisse entre le lait du matin et le lait du soir.

On a cherché évidemment, en partant de ces renseignements statistiques, à établir différentes formules permettant de relier la teneur en graisse à la teneur en protéines. Si certaines de ces formules peuvent être valables dans des circonstances particulières, il semble que dans l'état actuel des choses, il soit impossible de prévoir la teneur en protéines, d'après la teneur en graisse.

Sur le plan technique, il peut être intéressant de rappeler que la méthode de KOFRANYI repose sur le fait qu'en ajoutant un alcali à une solution de protéines, et en chauffant le mélange, il y a production d'ammoniac à partir des chaînes latérales de la glutamine et de l'asparagine. Etant donné que la quantité d'azote libéré dans ces conditions est en relation constante avec la quantité totale d'azote contenu dans la solution de protéines, il devient donc possible de déterminer cette dernière par une mesure de la quantité d'ammoniac dégagé.

Dans ce but, le gaz ammoniac est entraîné par un courant de vapeur d'eau et absorbé dans un volume connu d'acide comme dans la méthode Kjeldahl. Dans des séries d'essai, il est indispensable, pour obtenir des résultats concordants ou reproductibles, d'opérer dans des conditions toujours constantes en ce qui concerne en particulier la concentration en alcali et la pression de la vapeur d'eau.

On a essayé d'apporter certaines modifications à ce mode opératoire en appliquant par exemple la méthode de diffusion de CONWAY. Les premiers essais n'ont pas été couronnés de succès, par suite des différences de température aux divers endroits de l'appareil utilisé et c'est dans ce but que B. M. KROL [4] a réalisé un petit appareil de diffusion que l'on peut facilement chauffer au bain-marie et qui permet d'obtenir des résultats plus précis.

MÉTHODE DE KJELDAHL

La précision d'une détermination de teneur en protéines d'après la mesure de la teneur totale en azote d'un échantillon repose entièrement sur l'exactitude du facteur par lequel il faut multiplier la valeur obtenue pour la teneur en azote total, afin de calculer la teneur en protéines. D'après les nombreuses publications qui ont été faites sur la question, il apparaît que la teneur en azote de la fraction protéinique du lait normal est un nombre pratiquement constant égal à 15,6 p. 100. En ce qui concerne l'azote non protéinique, il varie dans des limites étroites et est de l'ordre de 21 mg à 33 mg p. 100 dans le lait normal fourni par des animaux en bonne santé.

Ce sont ces constatations qui ont conduit les spécialistes à estimer que la teneur en protéines du lait pouvait être calculée par un dosage Kjeldahl en multipliant la valeur trouvée par le facteur $100/15,6 = 6,40$. Les valeurs que l'on obtient ainsi donnent la teneur en protéines du lait avec généralement un excès de l'ordre de 0,13 à 0,22 p. 100.

Depuis la généralisation de cette méthode, de nombreuses modifications ont été apportées au mode opératoire initial, et il semble, d'après J. EISSES [5] que seul l'emploi d'oxyde mercurique d'après WILLFARHT comme catalyseur et de sulfate de potassium (d'après GUNNING) permet l'extraction totale de l'azote. C'est d'ailleurs ce procédé qui est décrit dans les normes néerlandaises qui ont été également commentées par le même auteur.

On sait que dans cette méthode les protéines se trouvent également converties en ammoniac comme dans la précédente par destruction par l'acide sulfurique. Cependant, au cours de cette opération, qui porte sur des matières organiques, l'acide sulfurique se trouve réduit à l'état d'eau et d'anhydride sulfureux. Ce point est important, car le rapport qui doit exister entre l'acide sulfurique et le sulfate de potassium ajouté pour augmenter le point d'ébullition du mélange ne doit pas s'abaisser au-dessous d'environ 1,8 si on veut éviter la volatilisation du sulfate d'ammonium.

C'est l'oxyde mercurique qui s'est donc révélé le catalyseur le plus actif pour assurer la décomposition des protéines et une fois que la destruction est complète et que le mélange a été rendu alcalin, il faut prendre soin de prolonger la distillation de l'ammoniac pendant un temps suffisant pour que la totalité de ce composé soit entraînée. Il est préférable d'absorber l'ammoniac dans une solution d'acide borique contenant un mélange d'indicateurs et

on procède ensuite à un titrage au moyen d'acide chlorhydrique en solution étalonnée.

La méthode Kjeldahl a comme grave inconvénient d'exiger un temps assez long et elle ne se prête pas à des déterminations effectuées en série et portant sur un grand nombre d'échantillons. On a essayé de la modifier et d'en déduire une méthode de micro-analyse ou de semi-microanalyse qui permettrait paraît-il d'économiser un temps précieux.

La présence de substances contenant de l'azote et qui ne sont pas des protéines (le lait peut contenir par exemple de l'urée, de l'acide urique, de la créatine) entraîne de légères erreurs et nous avons vu que par l'emploi des facteurs généralement admis, le résultat obtenu est légèrement en excès.

MÉTHODE PAR FIXATION D'UN COLORANT

Lorsqu'un liquide contenant une protéine est mélangé à un excès d'une solution acide d'un colorant, la protéine fixe ce colorant dans un rapport constant et forme un précipité. On explique cette réaction de la façon suivante : à un pH de 2,4, valeur à laquelle on opère habituellement, les micelles de protéines se trouvent chargées électropositivement, puisque les groupes acides des chaînes polypeptidiques ne sont pas dissociés, tandis que les groupes basiques sont positivement chargés et en équilibre avec les petits anions négatifs de la solution.

Les colorants que l'on utilise généralement, comme le noir Amido 10 B et l'Orangé G contiennent des groupes acide sulfonique et il se forme par conséquent des anions colorés négativement chargés dans la solution, susceptibles de remplacer les petits anions présents à la surface des protéines. Les complexes ainsi formés sont moins dissociés et pour cette raison ils tendent à s'agglomérer et à précipiter. Lorsqu'on opère avec du lait comme liquide contenant une protéine, les globules de graisse sont également entraînés dans le précipité.

Les conditions qui définissent cette réaction ont été étudiées par SCHÖBER et HETZEL [6] et par UDY [7] et STEINSHOLT [8] qui furent les premiers à utiliser ce principe pour le dosage de la teneur en protéines du lait. Le procédé de STEINSHOLT était relativement compliqué et demandait beaucoup de temps, il fut simplifié par RAADSVELD [9] et par POSTHUMUS [10] qui en ont fait un procédé susceptible d'être appliqué à l'analyse de nombreuses séries d'échantillons.

Une description de la méthode utilisée par la Coopérative de Zutphen pour la détermination de la teneur en protéines du lait par la méthode colorimétrique reposant sur l'emploi du noir Amido a été récemment donnée par POSTHUMUS [11]. Ce mode opératoire est le suivant : on introduit dans un tube à essai 0,95 cm³ de lait en utilisant à cet effet une installation automatique qui permet d'effectuer simultanément un grand nombre de mesures. Au moyen d'un appareil distributeur Struer, on introduit dans le lait 19 cm³ de la solution de noir Amido constituée par la dissolution de 0,8 à 0,9 g de noir Amido 10 B de Merck, 2,08 g de phosphate disodique PO₄HNa₂.2 H₂O et 15,8 g d'acide citrique dans 1 litre d'eau distillée. Le pH de cette solution est de 2,35 et après mélange avec le lait par passage de bulles d'air, le précipité constitué de protéines et de noir Amido, est séparé par centrifugation d'une durée de 5 minutes à 1 500 tours par minute. On mesure l'intensité de la coloration de la solution limpide surnageante dans un colorimètre Kipp en opérant avec une lumière filtrée de longueur d'onde de 550 mμ. Comme la relation entre la teneur en protéines du lait et l'extinction est linéaire, il est possible d'établir une échelle permettant de lire rapidement la teneur en protéines.

Dans le laboratoire créé par la Coopérative hollandaise, 70 000 échantillons, à raison de 1 échantillon par animal, sont contrôlés toutes les 3 ou 4 semaines, ce qui permet d'établir les bases du prix d'achat du lait. Le Laboratoire occupe 14 personnes qui consacrent la totalité de leur temps aux mesures, plus 3 personnes chargées de la surveillance, 4 personnes administrant l'établissement et des aides chargés de la préparation des solutions, du nettoyage et du prélèvement des échantillons. La précision de la méthode, lorsqu'on l'applique à des échantillons fournis par des animaux pris individuellement, correspond à un écart entre les résultats de la méthode Kjeldahl et ceux que donne la méthode colorimétrique de $\pm 0,05$ p. 100.

U. S. ASHWORTH, du State College of Washington a présenté [12] à l'occasion du 54^e Congrès annuel de l'American Dairy Science Association, une modification à la méthode de Udy reposant sur l'emploi d'une solution colorée contenant de l'Orangé G (0,32 mg d'Orangé par cm³). Pour un examen fait à une longueur d'onde de 0,475 mμ, il existe une relation linéaire entre l'absorbance du colorant qui n'a pas réagi et la proportion de protéines contenue dans l'échantillon qui permet, comme dans le cas précédent, d'établir une échelle graduée, permettant d'effectuer des mesures en série.

MÉTHODE DE DOSAGE AU FORMOL

Le principe de la méthode de dosage au formol repose sur le fait que lorsqu'on ajoute du formaldéhyde à une solution neutralisée d'une protéine, certains des groupes aminés libres des chaînes de polypeptide réagissent pour former des amino-alcools substitués. Il en résulte que la solution devient acide, et qu'il faut donc lui ajouter une certaine quantité d'alcali pour la ramener à la neutralité. Ce dosage permet une détermination de la teneur en protéines.

Les groupes aminés qui réagissent avec le formaldéhyde sont constitués essentiellement du groupe amino ϵ de la lysine et dans de plus faibles proportions le groupe aminé du groupement guanidine de l'arginine.

La difficulté principale à laquelle on se heurte dans cette méthode est que la neutralisation ne s'accompagne pas d'un changement net de la coloration de la phénolphthaléine employée comme indicateur. Cet inconvénient apparaît plus particulièrement dans le lait par suite de la présence de phosphate de calcium.

Cette dernière difficulté a pu être surmontée en éliminant le calcium de la solution par précipitation sous forme d'oxalate comme l'a suggéré PYNÉ [13]. D'autre part, le virage peut être facilité en opérant comparativement avec un lait contenant un colorant approprié. La méthode de dosage des protéines proposée par SCHULZ et ses collaborateurs [14] tient compte de ces perfectionnements et précise le mode opératoire à utiliser.

SUMMARY

In the Netherlands there is a considerable interest in the protein fraction of the milk used for the production of cheese. Description of some rapid methods for the determination of protein : the Kjeldhal method, the Kofranyi method and the dije binding methods with amido black and orange G.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] E. J. MANN, *Dairy Ind.*, 1959, **24**, n° 12, p. 990.
- [2] E. KOFRANYI, *Milchwissenschaft*, 1950, **5**, p. 51.
- [3] H. LOLKEMA et A. J. VAN DER HAVE, *The Netherl. Milk Dairy J.*, 1960, **14**, p. 277.
- [4] B. M. KROL, *The Netherl. Milk Dairy J.*, 1960, **14**, p. 274.
- [5] J. EISSES, *The Netherl. Milk Dairy J.*, 1960, **14**, p. 352.
- [6] R. SCHOBER et H. F. HETZEL, *Milchwissenschaft*, 1956, **11**, p. 123.

- [7] D. C. UDY, *Cereal Chem.*, 1954, **31**, p. 38 et 1956, **33**, p. 190.
- [8] K. STEINSHOLT, *Meieriposten*, 1957, **46**, pp. 259 et 279.
- [9] C. W. RAADSVELD, Off. Org., 1957, **49**, p. 823, et 1958, **50**, p. 146. *Alg. Zuivelblad*, 1957, **50**, p. 482, et 1958, **51**, p. 70. *Misset's Zuivel*, 1957, **63**, p. 901 et 1958, **64**, p. 147. *Proc. 15 th Int. Dairy Congr. London III*, 1959, p. 1638.
- [10] G. POSTHUMUS, Off. Org., 1958, **50**, p. 121.
- [11] G. POSTHUMUS, *The Netherl. Milk Dairy J.*, 1960, **14**, p. 319.
- [12] U. S. ASHWORTH, *J. Dairy Sci.*, 1959, **42**, p. 900.
- [13] G. T. PYNE, *Biochem. J.*, 1932, **26**, p. 1006 et 1933, **27**, p. 915.
- [14] M. E. SCHULZ, E. VOSS, G. MROWETZ, K. N. LEDER et E. WARNECKE, *Kielermilchwirtsch. Forschungsber.*, 1953, **5**, p. 273.

Bulletin analytique

(Revue)

Colles et peintures

Alekseev (S. N.) et Rozenfeld (L. M.). — Emploi de la caséine dans la protection des fers pour béton armé. Beton i Zhelezobeton, 1958, n° 10, p. 988.

Afin de protéger la corrosion des tiges de fer utilisées dans les constructions en béton armé, il est recommandé de les recouvrir d'une peinture constituée par une suspension de caséine et de ciment additionnée d'agents passivants, par exemple du nitrite de sodium. Il est, en outre, recommandé d'éviter le mouillage du ciment par la pluie en le recouvrant d'une substance hydrophobe ou d'une peinture filmogène évitant la pénétration de l'humidité.

Cobb (R. M. K.). — Emploi des caséines dans les produits pour couchage du papier. II. Essais permettant de déterminer la proportion de pigment à ajouter à l'adhésif. Tappi, 1958, t. 41, p. 581.

La quantité de liquide (eau ou pétrole) nécessaire pour remplir les vides dans un pigment de couchage utilisé par l'industrie du papier est déterminée en ajoutant successivement de petites quantités du liquide à un poids connu de pigment jusqu'à ce que le mélange passe de l'état d'une masse grumelleuse à une masse cohérente et collante. On calcule à ce moment le poids de liquide utilisé.