

## **Essais de l'appareil Milko-Scan 300 utilisé pour le dosage en série de la matière grasse et des protéines du lait**

par

R. GRAPPIN et R. JEUNET

*I.N.R.A., Station Expérimentale Laitière - 39800 Poligny (France)*

Les méthodes de routine utilisées pour le dosage de la matière grasse et des protéines du lait connaissent depuis quelques années une évolution considérable. On constate que les techniques chimiques classiques, manuelles ou mécanisées (méthode Gerber pour le dosage de la matière grasse et méthode au noir amido pour le dosage des protéines), tendent à être de moins en moins utilisées au profit des appareils automatiques : combiné Milko-Tester, Pro-Milk ou Infra-Red Milk Analyser (IRMA).

Depuis 1976, la Société danoise A/S N Foss-Electric met sur le marché un nouvel appareil automatique, le Milko-Scan 300, basé sur le même principe de mesure que l'appareil IRMA (spectrophotométrie infra-rouge) mais conçu et réalisé de manière originale.

Dans le cadre des travaux sur les appareils automatiques d'analyse du lait effectués habituellement par notre laboratoire, nous avons entrepris d'étudier la valeur analytique et les conditions d'utilisation du Milko-Scan 300. Après une brève description du principe et du fonctionnement du Milko-Scan 300, nous donnons dans ce rapport les résultats des premiers essais de l'appareil.

### **PRINCIPE ET FONCTIONNEMENT DE L'APPAREIL**

#### **1. Rappel du principe de l'analyse du lait par spectrophotométrie infra-rouge**

En 1964, Goulden décrit une méthode permettant d'effectuer le dosage des matières grasses, des protéines et du lactose dans le lait par spectrophotométrie infra-rouge (I.R.).

Le spectre d'absorption I.R. du lait établi à l'aide d'un spectrophotomètre à double faisceau muni de deux cuves — l'une contenant

le liquide de référence (eau) et l'autre l'échantillon à analyser (lait) — montre un premier pic d'absorption à  $5,73 \mu\text{m}$  caractéristique du groupe carbonyle ( $> \text{C} = \text{O}$ ) des liaisons ester des triglycérides, un deuxième pic à  $6,46 \mu\text{m}$  caractéristique de la liaison amide II ( $-\text{CONH}-$ ) des protéines et enfin une zone d'absorption à  $9,6 \mu\text{m}$  correspondant aux groupements hydroxyle ( $-\text{OH}$ ) du lactose (fig. 1).

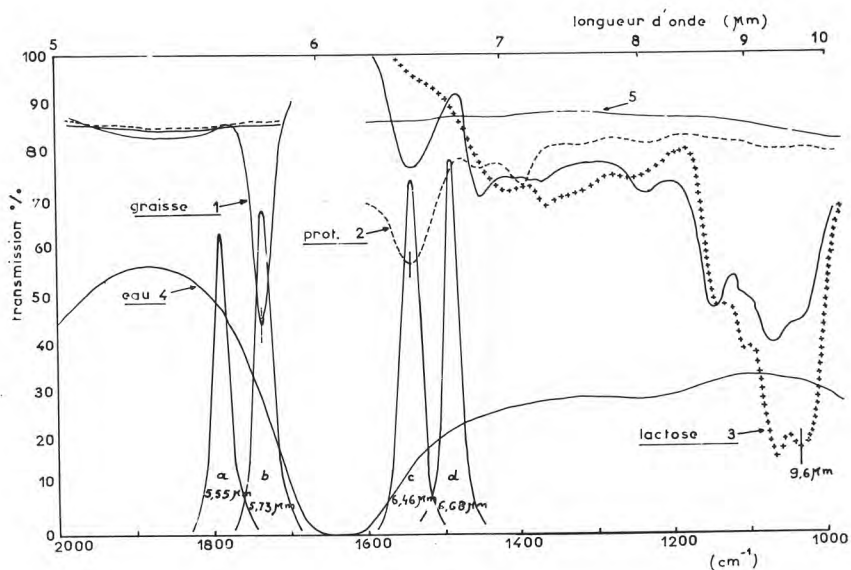


fig. 1

Spectres d'absorption des différents éléments du lait obtenus avec un spectrophotomètre à double faisceau et deux cuves (Shields, 1975)

Courbe 1 : lait enrichi en matière grasse par référence à l'eau.

Courbe 2 : solution à 4 p. 100 de protéines solubles par référence à l'eau.

Courbe 3 : solution à 5 p. 100 de lactose monohydraté par référence à l'eau.

Courbe 4 : eau par référence à l'air.

Courbe 5 : eau dans les deux cuves (ligne de base).

Bandes de transmission des filtres interférentiels utilisés dans le Milko-Scan 300 :

- a) filtre de référence de la matière grasse.
- b) filtre de mesure de la matière grasse.
- c) filtre de mesure des protéines.
- d) filtre de référence des protéines.

Pour obtenir à chacune des longueurs d'onde une absorption I.R. qui soit exactement proportionnelle à la teneur du lait en matière

grasse, en protéines et en lactose, il faut tenir compte des éléments suivants :

1) La dimension des plus gros globules gras étant du même ordre de grandeur que les longueurs d'onde utilisées, il est nécessaire de procéder à une homogénéisation des globules gras du lait (diamètre inférieur à 3  $\mu\text{m}$ ) pour diminuer sinon éliminer le phénomène de diffusion de la lumière par les globules gras.

2) Dans un système à trois composants principaux, comme c'est le cas du lait, l'absorbance mesurée aux différentes longueurs d'ondes utilisées est donnée par une équation de la forme :  $A = a \cdot TB + b \cdot TP + c \cdot TL$ , où TB, TP, TL sont les teneurs du lait en matière grasse, protéines et lactose et a, b et c les coefficients d'extinction propres à chaque composant pour la longueur d'onde utilisée.

Pour obtenir une absorbance qui soit proportionnelle à la concentration de l'élément à mesurer, il faut, dans le cas par exemple du dosage de la matière grasse, que les coefficients b et c soient négligeables par rapport au coefficient a. Or, les valeurs de b et c dépendent non seulement de l'importance de l'absorption I.R. par les protéines et le lactose à 5,73  $\mu\text{m}$  mais surtout de « l'effet de déplacement de l'eau » (water displacement effect) par les protéines et le lactose à cette longueur d'onde. Le phénomène est le suivant : toute variation de la teneur d'un élément se traduit par une variation identique (en volume) de la teneur en eau de l'échantillon. Or, aux longueurs d'onde utilisées, l'eau absorbe de l'énergie I.R. et elle en absorbe souvent plus que l'élément qui la déplace (dans notre exemple : protéines ou lactose). Il s'ensuit que les coefficients d'extinction des composants qui interfèrent ont généralement un signe négatif et une valeur d'autant plus élevée que l'énergie absorbée par l'eau par rapport à l'énergie absorbée par le composant qui la déplace est différente.

A titre d'information, nous donnons dans le tableau 1 les coefficients d'extinction observés pour les différents constituants aux trois longueurs d'onde utilisées (Goulden, 1964).

## 2. Principe de l'appareil IRMA

Afin de montrer les différences essentielles existant entre l'IRMA et le MS 300, rappelons brièvement les principales caractéristiques de l'IRMA (Goulden, 1964 ; Adda et al., 1968).

L'appareil est un spectrophotomètre à double faisceau comportant deux cuves : une cuve de mesure et une cuve de référence. Il est muni d'un système monochromateur à réseau. L'appareil mesure, à chaque longueur d'onde caractéristique, la différence entre l'énergie absorbée par le lait et celle absorbée par l'eau (référence) à l'aide d'un système de compensation (servo, peigne atténuateur). Le signal

TABLEAU 1

Coefficients d'absorption relatifs de la matière grasse, des protéines et du lactose aux différentes longueurs d'onde utilisées par l'analyse infra-rouge

Composant interférant avec le composant à doser	Longueur d'onde (en $\mu\text{m}$ )		
	5,73 (graisse)	6,46 (protéines)	9,60 (lactose)
Graisse	1,000	— 0,227 — 0,05	— 0,100 —
Protéines	— 0,047 — 0,05	1,000	+ 0,050 —
Lactose	— 0,068 —	— 0,085 — 0,06 (*)	1,000

En caractères romains : valeurs calculées d'après Goulden (1964) pour l'IRMA.

En caractères italiques : valeurs données par Shields (1975) pour le MS 300.

\* Valeur déterminée expérimentalement au cours de nos essais.

de sortie transmis par le servo est proportionnel à la concentration du composant à mesurer.

### 3. Principe du Milko-Scan 300

Le Milko-Scan 300 (MS 300) utilise un système d'analyse à double faisceau en longueur d'onde. Ce système consiste à sélectionner, pour l'analyse de chaque composant, deux faisceaux à bandes étroites de longueur d'onde, l'une ayant une longueur d'onde correspondant au pic d'absorption du composant à analyser (faisceau de mesure) et l'autre ayant une longueur d'onde voisine, pour laquelle l'absorption par le composant à mesurer est très faible (faisceau de référence).

Les deux faisceaux passent alternativement au travers de la cuve contenant l'échantillon de lait et l'appareil mesure la différence d'énergie absorbée par le lait à chacune des deux longueurs d'onde à l'aide d'un système de compensation identique à celui qui est employé sur l'IRMA.

La sélection des longueurs d'onde (mesure et référence) est faite au moyen de filtres interférentiels. L'appareil comporte donc, pour

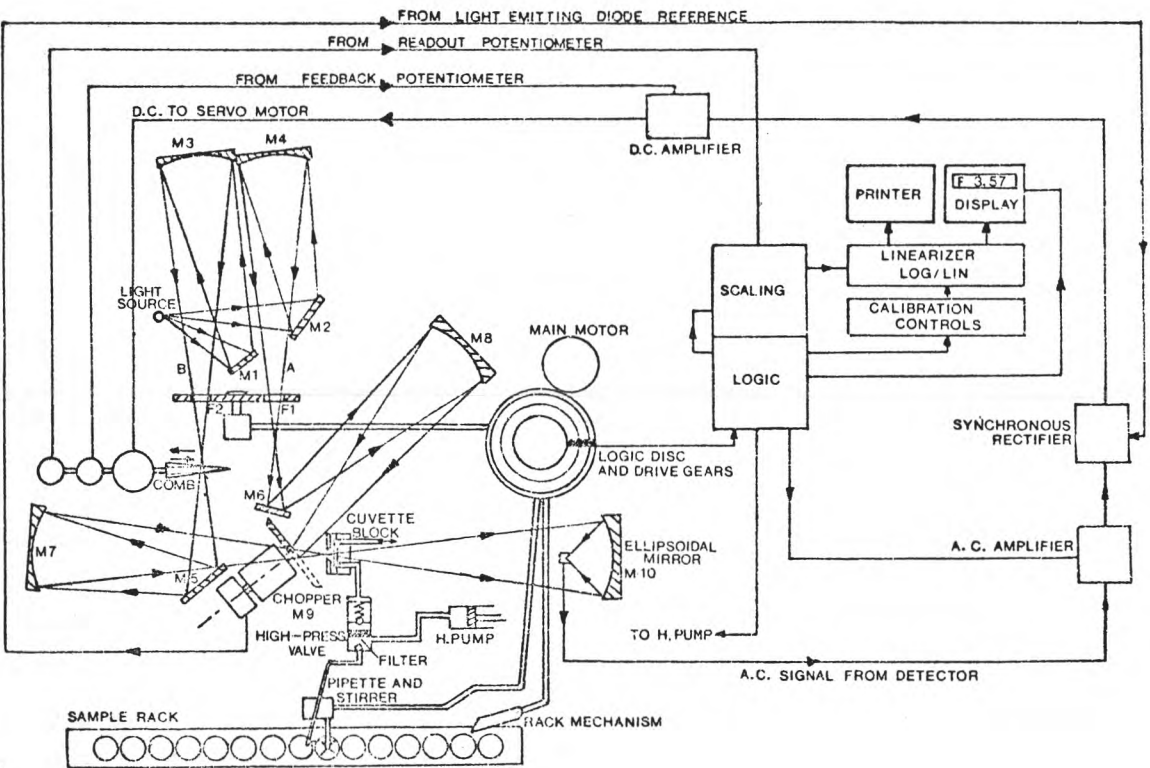


fig. 2

Diagramme de fonctionnement du Milko-Scan 300 (Doc. A/S N. Foss-Electric)

chaque composant à analyser, deux filtres, un filtre de mesure et un filtre de référence.

La figure 1 montre les bandes d'absorption des filtres utilisés par le MS 300 ainsi que les spectres correspondants de l'eau, de la matière grasse, des protéines et du lactose.

Selon Shields (1975), les principaux avantages d'un système de mesure à double faisceau en longueur d'onde (MS 300) par rapport au système à double faisceau avec deux cuves (IRMA) sont les suivants : 1° l'effet de déplacement de l'eau mentionné plus haut se faisant sentir aussi bien sur le faisceau de mesure que sur le faisceau de référence, l'interférence des différents composants du lait entre eux se trouve fortement atténuée (tab. 1), et 2° les mesures sont moins sensibles aux variations dans le degré d'homogénéisation des laits.

En revanche, le système utilisé par le MS 300 a l'inconvénient d'être très sensible aux variations d'humidité de l'atmosphère intérieure de l'appareil, car l'absorption d'énergie I.R. par la vapeur d'eau varie avec la longueur d'onde. Par ailleurs, l'utilisation de filtres interférentiels à la place d'un système monochromateur (utilisation qui est possible sur les deux types d'appareils) permet une simplification très importante de l'optique, un gain substantiel en énergie, donc une amplification moins importante, ainsi qu'une plus grande facilité de sélection des longueurs d'onde. Ceci se traduit au total par des impératifs technologiques moins contraignants pour le constructeur.

#### 4. Fonctionnement du Milko-Scan 300

Nous donnons dans la figure 2 le diagramme schématique de fonctionnement de l'appareil.

Pour chaque analyse, l'appareil utilise un volume de 6 ml de lait dont 0,2 ml seulement passe dans la cuve, le reste servant au rinçage du circuit. Le lait est d'abord homogénéisé dans un homogénéisateur mécanique à bille avant d'être envoyé dans la cuve de mesure. L'appareil mesure ensuite, à chaque longueur d'onde spécifique, l'absorbance de la matière grasse et des protéines. Les signaux électriques provenant du détecteur sont d'abord transformés suivant une relation logarithmique de façon à donner des résultats proportionnels aux teneurs en matière grasse et en protéines, puis mis en mémoire et corrigés en fonction des coefficients d'extinction de chaque composant interférant (voir tab. 1), enfin affichés et enregistrés sur document.

L'appareil effectue automatiquement toutes les opérations depuis la prise d'échantillons jusqu'à la saisie des résultats à la cadence théorique de 300 échantillons/h.

## 5. Calibrage de l'appareil

Il consiste à régler l'appareil de telle sorte qu'à tous les niveaux envisagés, les mesures fournies par le MS 300 soient en moyenne les mêmes que celles qui sont obtenues pour la méthode de référence.

Autrement dit, la droite de calibrage doit passer par l'origine et avoir une pente égale à 1 (équation  $y = 1. x + 0$ ).

Pratiquement, l'appareil est muni d'un système de réglage permettant à l'utilisateur de modifier seulement la pente de la droite de calibrage ; l'ordonnée à l'origine étant réglée par le constructeur. A noter qu'en raison de l'interférence des différents composants, l'absorption de l'eau, correspondant en principe à un lait sans graisse et sans protéines, donne une mesure légèrement positive aux longueurs d'onde utilisées. Les valeurs théoriques fournies par le constructeur sont de 2 g/kg pour la matière grasse et 4 g/kg pour les protéines. Mais ces valeurs doivent être vérifiées pour chaque composant en analysant un grand nombre d'échantillons de lait à la fois par le MS 300 et par la méthode de référence.

## ETUDE EXPERIMENTALE

### 1. Facteurs externes affectant la précision des mesures

Il s'agit essentiellement de tous les facteurs autres que ceux qui sont liés soit au principe de l'analyse infra-rouge, soit aux conditions de conservation et à l'altération des échantillons de lait, soit encore au calibrage de l'appareil.

#### 1.1. ENVIRONNEMENT

Nous avons pu vérifier que l'appareil doit être placé dans un local à l'abri de tout courant d'air, dont la température et l'hygrométrie doivent être relativement constantes ; toute vibration, tout choc ou toute pression exercés sur l'appareil modifie les réponses de l'appareil.

#### 1.2 TEMPÉRATURE DE L'ÉCHANTILLON DE LAIT

Toute variation de la température de l'échantillon dans la cuve se traduit par une modification des résultats fournis par le MS 300. La température de la cuve elle-même étant parfaitement contrôlée et maintenue à  $42^{\circ} \text{C} \pm 0,2^{\circ} \text{C}$ , seule une variation de la température de l'échantillon lors du pipettage peut influencer la température du lait dans la cuve. Nous avons constaté, qu'en dessous de  $38^{\circ} \text{C}$ , une diminution de la température de l'échantillon entraîne une baisse des résultats voisine de 2 à 3 p.100 en valeur relative par degré C.

### 1.3. CONTAMINATION

La « contamination » d'un échantillon par l'échantillon qui le précède, provenant d'une purge insuffisante des circuits, est de l'ordre de 1 à 1,5 p. 100 en valeur relative.

### 1.4. STABILITÉ DU ZÉRO OPTIQUE

La mesure du zéro optique indique, pour chaque longueur d'onde, l'état d'équilibre entre le faisceau de mesure et le faisceau de référence. L'appareil est muni de réglages permettant d'obtenir pour chaque longueur d'onde l'égalité d'énergie entre les deux faisceaux lorsque la cuve est remplie d'eau. Parmi les facteurs susceptibles d'affecter la stabilité du zéro optique de l'appareil, les variations d'humidité de l'atmosphère à l'intérieur de l'appareil représentent certainement le facteur le plus important ; pour maintenir un taux d'humidité aussi bas et constant que possible, du silica gel est placé à l'intérieur de l'instrument.

## 2. Valeur analytique

L'étude de la valeur analytique comprend essentiellement une évaluation de la répétabilité de l'appareil et de sa précision par rapport aux méthodes de référence (Grappin, 1976).

### 2.1. MATÉRIELS ET MÉTHODES

#### 2.1.1. *Nature des laits*

L'étude a porté sur 74 échantillons de laits individuels provenant de 4 troupeaux et 74 échantillons de laits de troupeaux, tous prélevés sur le lait d'une seule traite. Les prélèvements ont été effectués dans la région de Poligny pendant les mois d'octobre et novembre 1975 au début de la période d'alimentation hivernale.

#### 2.1.2. *Analyses*

Les analyses des échantillons de lait ont été effectuées en utilisant les méthodes suivantes :

- Dosage de la matière grasse :
  - méthode Röse-Gottlieb (RG), (Norme FIL 1, 1955),
  - méthode Gerber (norme officielle française, arrêté ministériel du 8 janvier 1970),
  - appareil Milko-Tester modèle MK III (MT), (Grappin et Jeunet, 1970),
  - appareil IRMA (Adda et al., 1968),
  - appareil Milko-Scan 300 (MS 300).
- Dosage des matières azotées :
  - dosage de l'azote total et des fractions azote non protéique (NPN) et azote soluble selon la méthode Rowland (1938),

- méthode au noir amido (norme AFNOR NF/V 04216),
- appareil IRMA,
- appareil Milko-Scan 300.

Selon la nouvelle réglementation française (arrêté du 12 avril 1974) nous utilisons les dénominations suivantes : teneur en matière azotée totale (MAT) =  $N \text{ total} \times 6,39$  et teneur en protéines (TP) =  $(N \text{ total} - \text{NPN}) \times 6,39$ .

Tous les dosages de matière grasse et de matière azotée ont été effectués en double exemplaire sur des échantillons conservés au plus 8 j à 4° C avec 1 p. 1000 de  $\text{Cr}_2\text{O}_7\text{K}_2$ , sauf pour les dosages au noir amido qui ont été faits sur des échantillons conservés avec 0,7 p. 1000 de  $\text{HgCl}_2$ . Les résultats sont exprimés en gramme par kg de lait (g/kg).

- Dosage de lactose :

— appareil IRMA.

- Numérations cellulaires :

Elles ont été effectuées sur le lait frais à l'aide d'un Compteur Coulter (Grappin et Jeunet, 1971).

- Indice de réfraction ( $n_D$ ) :

Les mesures ont été faites sur la matière grasse extraite par la méthode de Pont (1955) avec un réfractomètre Zeiss-Abbe à la température de 40° C.

## 2.2. RÉSULTATS

### 2.2.1. Répétabilité de l'appareil

Elle a été déterminée à partir des dosages effectués en double exemplaire sur les 74 échantillons de laits de troupeaux. Chaque échantillon a été analysé deux fois avec le MS 300 suivant une répartition au hasard. Les amplitudes des teneurs en matière grasse et en protéines étant assez faibles (respectivement 16 et 11 g/kg), l'influence de la contamination entre échantillons successifs peut être considérée ici comme négligeable.

L'écart-type de répétabilité obtenu par analyse de la variance est de 0,15 g/kg pour les déterminations de matière grasse et de protéines.

La répétabilité  $r$ , définie par l'écart arithmétique entre deux déterminations ayant une probabilité de 95 p. 100 de ne pas être dépassée, est :  $r = 2,77 \times 0,15 = 0,4 \text{ g/kg}$  (la valeur 2,77 est tirée de la loi de distribution des écarts entre les valeurs extrêmes d'une distribution).

### 2.2.2. Précision par rapport aux méthodes de référence

#### 2.2.2.1. Corrélations

La comparaison entre les résultats obtenus avec le Milko-Scan et ceux obtenus par les méthodes de référence constitue un élément

essentiel pour juger la valeur analytique de l'appareil. Pour évaluer exactement la précision, avec laquelle le MS 300 estime les teneurs en matière grasse et en protéines du lait données par les méthodes de référence il faut éliminer, d'une part les erreurs de répétabilité provenant de chacune des deux méthodes et, d'autre part, les différences systématiques dues à un défaut éventuel de l'étalonnage de l'appareil. Pour cela, on utilise la moyenne de deux déterminations au moins par méthode et on estime la précision par rapport à la méthode de référence à l'aide de l'écart-type résiduel ( $\sigma_{y,x}$ ) déduit de la régression de  $y$  (méthode de référence) sur  $x$  (MS 300) ou, d'une manière plus explicite, par les limites entre lesquelles se situe  $y$  pour une valeur donnée de  $x$  (l'intervalle de confiance à 95 p. 100).

Les résultats concernant les dosages de matière grasse, de protéines (N total — NPN)  $\times$  6,39 et de MAT (N total  $\times$  6,39) sur laits individuels et sur laits de troupeaux sont groupés dans le tableau 2.

En plus des méthodes Röse-Gottlieb et Kjeldahl nous avons inclus, dans ce tableau, les comparaisons par rapport aux méthodes Gerber et Noir Amido. Bien que n'étant pas considérées comme méthodes de référence au sens strict du terme, ces deux méthodes

TABLEAU 2

Précision d'estimation des teneurs en matière grasse, en protéines et en matière azotée totale du lait déterminées avec le Milko-Scan 300

Composant	Méthode de référence (y)	Laits individuels (n = 74)		Laits de troupeaux (n = 74)	
		$\sigma_{y,x}$ (g/kg)	intervalle de confiance à 95 p. 100 (g/kg)	$\sigma_{y,x}$ (g/kg)	intervalle de confiance à 95 p. 100 (g/kg)
Matière grasse	Röse-Gottlieb	0,90	$\pm$ 1,8	0,34	$\pm$ 0,7
	Gerber	0,90	$\pm$ 1,8	0,39	$\pm$ 0,8
Protéines : (N total - NPN) $\times$ 6,39	Kjeldahl	0,50	$\pm$ 1,0	0,29	$\pm$ 0,6
	Noir Amido	0,49	$\pm$ 1,0	0,28	$\pm$ 0,6
Matières azotées totales : N total $\times$ 6,39	Kjeldahl N total $\times$ 6,39	0,55	$\pm$ 1,1	0,45	$\pm$ 0,9

$\sigma_{y,x}$  = écart-type résiduel déduit de la régression de  $y$  (méthode de référence) sur  $x$  (MS 300).

Intervalle de confiance à 95 p. 100 =  $\pm$  1,96  $\sigma_{y,x}$ .

sont cependant des méthodes officielles pour le paiement du lait et sont donc souvent, à ce titre, utilisées comme des méthodes de référence secondaires. On constate d'ailleurs que la précision est identique quelle que soit la méthode utilisée comme référence : Röse-Gottlieb ou Gerber, Kjeldahl ou Noir Amido.

Pour les dosages de matière grasse comme pour ceux de protéines, l'écart-type résiduel est nettement plus élevé pour les laits individuels que pour les laits de troupeaux : 0,90 g/kg contre 0,34 pour la matière grasse et 0,50 g/kg contre 0,29 g/kg pour les protéines.

2.2.2.2. Origine des différences constatées entre le Milko-Scan 300 et les méthodes de référence

La précision du MS 300 étant nettement moins bonne avec des laits individuels qu'avec des laits de troupeaux, on peut supposer que ce sont les variations de composition ou de certaines propriétés du lait, plus importantes pour les laits individuels que pour les laits de mélange, qui sont responsables des différences entre le MS 300 et les méthodes de référence.

*Matière grasse* : si l'on se base sur le principe des dosages infra-rouge, les écarts entre le MS 300 et la méthode Röse-Gottlieb sont imputables en grande partie aux différences de composition en acides gras des échantillons analysés. En effet, la méthode Röse-Gottlieb effectue une mesure pondérale de la quantité de matière grasse tandis que le MS 300 comme l'IRMA, mesure le nombre de liaisons ester par unité de poids ; par conséquent toute variation du poids moléculaire moyen des acides gras se répercute sur la mesure faite par le MS 300. Nous n'avons pas effectué de dosages d'acides gras mais simplement des mesures d'indice de réfraction ( $n_D$ ) de la matière grasse, sachant qu'il existe une corrélation élevée entre le poids moléculaire moyen et l'indice de réfraction (en relation avec le taux d'acides gras insaturés).

Pour établir la relation entre les écarts MS 300 - RG et la valeur de l'indice de réfraction des échantillons de lait, nous avons choisi parmi les 74 laits, 26 échantillons représentant toute la gamme de variation des écarts MS 300 - RG.

Nous avons obtenu une corrélation très élevée ( $r = -0,92$ ) entre l'erreur relative du MS 300  $[(MS\ 300 - RG) \times 100/RG]$  et l'indice de réfraction (fig. 3). Environ 80 p. 100 des erreurs sont expliquées par les variations de  $n_D$ . La valeur du coefficient de régression indique qu'une variation de  $+10^{-1}$  unité de  $n_D$  entraîne une baisse des mesures MS 300 de 0,2 p. 100 en valeur relative, soit, pour un lait moyen à 36 g/kg de matière grasse, une sous-estimation voisine de 0,07 g/kg\*. Sur un appareil à l'état de prototype, Shields (1975) a

\* La même étude effectuée avec le MT et l'IRMA a donné des coefficients de régression de +0,15 pour le MT et -0,25 pour l'IRMA contre -0,20 pour le MS 300.

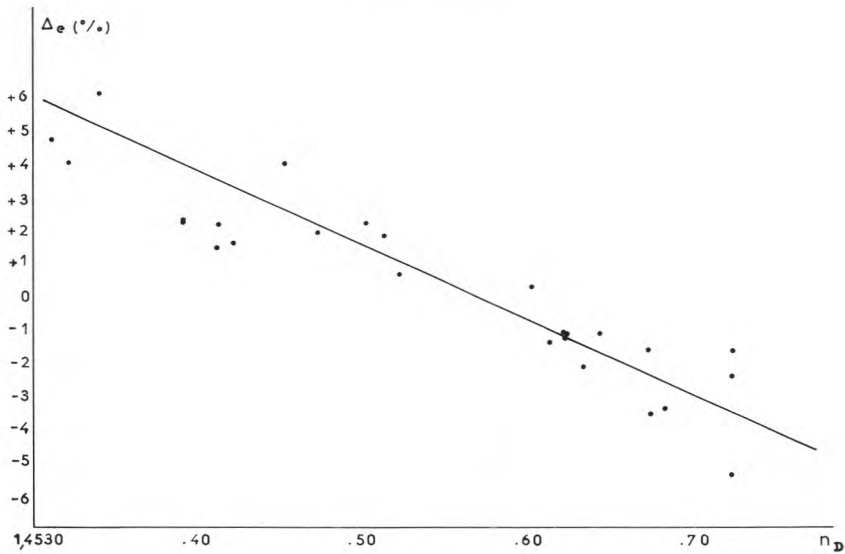


fig. 3

Relation entre l'erreur relative ( $\Delta e = \frac{\text{MS 300} - \text{RG}}{\text{RG}} \times 100$ ) de dosage de la matière grasse avec le Milko-Scan 300 et l'indice de réfraction de la matière grasse du lait.  $\Delta e = -0,20 \times n_D + 11,0$  ;  $r = -0,92$ .

obtenu une valeur du coefficient de régression de  $-0,09$  (environ deux fois plus faible que celle que nous avons obtenue) mais avec une corrélation moins élevée ( $r = -0,40$ ).

*Protéines* : nous savions déjà (Grappin, Jeunet et Roguinsky, 1970) que la détermination du taux de protéines avec l'IRMA se trouve influencée, en particulier dans le cas de mammite, vraisemblablement par la baisse concomitante du taux de lactose qui inter-fère à la longueur d'onde d'analyse des protéines.

Pour les 74 échantillons de laits individuels, nous avons trouvé une corrélation de  $-0,43$  entre l'erreur relative faite avec le MS 300 ( $\text{MS 300} - \text{Kjeldahl}$ )  $\times 100/\text{Kjeldahl}$  et le taux de lactose (fig. 4). Une augmentation de 1 g du taux de lactose entraîne une erreur relative de  $-0,20$  p. 100 soit, pour un lait moyen à 32 g/kg, une diminution de 0,06 g/kg du résultat MS 300.

### 2.2.2.3. Comparaison avec les autres méthodes de routine

En utilisant la même méthode statistique d'analyse de la régression que précédemment, nous avons comparé les dosages MS 300 (x) aux dosages effectués avec les autres méthodes (y) : méthode

TABLEAU 3

Comparaison des dosages Milko-Scan 300 avec les autres méthodes de routine de dosage de la matière grasse et des protéines du lait

Composants	Méthode (y)	Lait individuels (n = 74)		Laits de troupeaux (n = 74)	
		$\sigma_{y,x}$ (g/kg)	intervalle de confiance à 95 p. 100 (g/kg)	$\sigma_{y,x}$ (g/kg)	intervalle de confiance à 95 p. 100 (g/kg)
Matière grasse	Gerber	0,90	$\pm 1,8$	0,39	$\pm 0,8$
	MTA	1,47	$\pm 2,9$	0,57	$\pm 1,1$
	IRMA	0,53	$\pm 1,0$	0,33	$\pm 0,6$
Protéines	Noir amido	0,49	$\pm 1,0$	0,28	$\pm 0,5$
	IRMA	0,35	$\pm 0,7$	0,32	$\pm 0,6$

$\sigma_{y,x}$  = écart-type résiduel déduit de la régression de y (méthode comparée) sur x (Milko-Scan).

Intervalle de confiance à 95 p. 100 =  $\pm 1,96 \sigma_{y,x}$ .

Gerber, MTA et IRMA pour la matière grasse et noir amido et IRMA pour les protéines. Les résultats sont donnés dans le tableau 3.

On constate, comme précédemment, une bien meilleure corrélation dans le cas des laits de troupeaux que dans le cas des laits individuels. De ces différentes comparaisons, il faut surtout noter un écart-type faible lorsqu'on compare les deux techniques d'analyse infra-rouge entre elles (IRMA et MS 300) et un écart-type très élevé, donc une mauvaise corrélation entre les résultats MS 300 et MT, dans le cas des dosages de matière grasse. Suivant la nature de l'échantillon du lait et en particulier suivant sa composition en acides gras, le MT donnera par rapport au MS 300 un résultat qui sera compris dans un intervalle de  $\pm 2,9$  g/kg ( $P \leq 95$  p. 100) dans le cas d'un lait individuel et  $\pm 1,1$  g/kg dans le cas d'un lait de troupeau.

### 3. Influence des conditions de conservation des échantillons

Les échantillons de lait destinés au dosage de matière grasse et de protéines étant analysés souvent plusieurs jours voire plusieurs

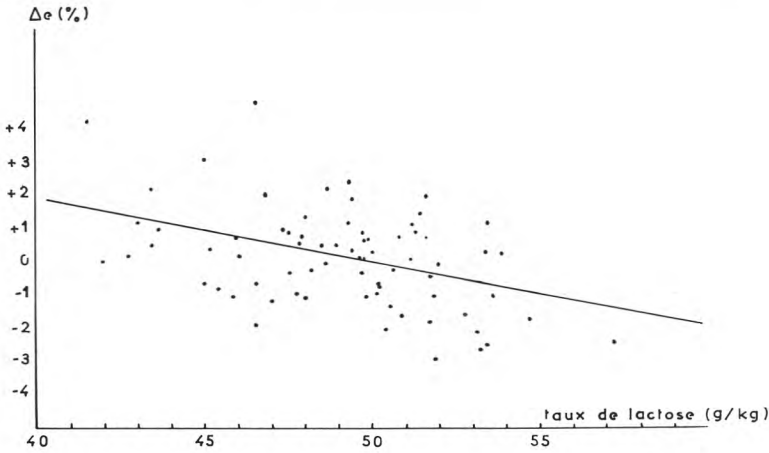


fig. 4

Relation entre l'erreur relative ( $\Delta e = \frac{\text{MS 300} - \text{Kjeldahl}}{\text{Kjeldahl}} \times 100$ ) de dosage des protéines avec le Milko-Scan 300 et la teneur en lactose du lait.

$$\Delta e = -0,20 \times T \text{ lactose} + 49,1 ; r = -0,43.$$

semaines après leur prélèvement, ils doivent être conservés dans des conditions prévenant toute altération susceptible de modifier les résultats donnés par le MS 300. Nous avons donc étudié l'influence sur cet appareil de différentes conditions de conservation (nature du conservateur, temps et température de conservation) des échantillons, telles qu'on les rencontre habituellement dans les laboratoires français.

### 3.1. INFLUENCE DU CONSERVATEUR

#### 3.1.1. Chlorure mercurique

Dans un essai préliminaire, nous avons étudié à nouveau (Grappin et Jeunet, 1970 a) le rôle du chlorure mercurique dans le phénomène de lipolyse et ses conséquences sur les dosages de matière grasse avec le MS 300. La figure 5 montre que l'augmentation de l'indice de lipolyse (ou acidité de la matière grasse libre) observée après l'addition de  $\text{HgCl}_2$  se traduit par une baisse proportionnelle des résultats de matière grasse donnés par le MS 300.

De même que pour l'IRMA ou le MT (Van Reusel, 1975), le sublimé employé à l'état pur ne convient pas comme agent de conservation des échantillons de lait.

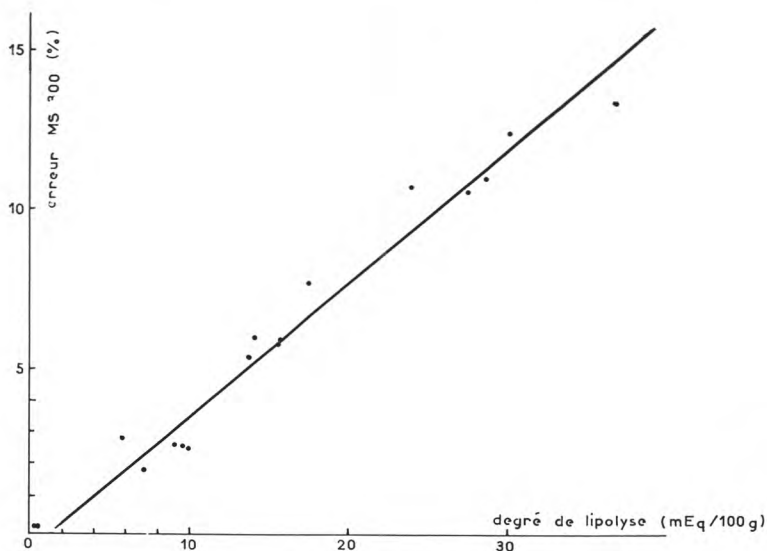


fig. 5

Influence du degré de lipolyse (exprimé en m Eq/100 g de graisse) du lait sur les dosages de matière grasse avec le Milko-Scan 300.

L'erreur est calculée en p. 100 par rapport au résultat obtenu avec le même échantillon de lait frais non lipolysé.

### 3.1.2. Dichromate de potassium et azide de sodium

Par comparaison avec les résultats obtenus sur du lait frais sans conservateur :

— l'addition de 1 p. 1000 de  $\text{Cr}_2\text{O}_7\text{K}_2$  ne modifie pas les dosages de matière grasse mais exerce une influence très faible, bien que significative (baisse de 0,1 g/kg) sur les dosages de protéines,

— l'addition de 0,3 p. 1000 de  $\text{NaN}_3$  n'a aucune influence sur les résultats donnés par le MS 300.

### 3.2. DURÉE ET TEMPÉRATURE DE CONSERVATION

La comparaison par rapport aux méthodes chimiques (Gerber et Noir Amido) de plusieurs séries d'échantillons de lait âgés de 0 à 20 j semble indiquer que les échantillons peuvent être gardés pendant 3 semaines à 4° C avec  $\text{Cr}_2\text{O}_7\text{K}_2$  ou avec  $\text{NaN}_3$  sans modification significative des résultats, à condition toutefois que les échantillons soient de bonne qualité bactériologique et ne soient pas altérés dès le prélèvement.

A 20° C on n'observe pas de changement des résultats après 20 j de conservation sauf dans le cas du dosage des protéines sur les

échantillons conservés avec  $\text{NaN}_3$  pour lesquels on note alors une augmentation des résultats voisine de 0,5 g/kg.

Ce phénomène peut provenir d'une acidification du lait avec formation d'acides carboxyliques dont les bandes d'absorption sont voisines de celles des protéines (Goulden, 1964).

## DISCUSSION

La connaissance des facteurs biochimiques influençant les résultats des dosages de matière grasse et de protéines effectués avec le MS 300 doit contribuer à mieux définir les principaux facteurs biologiques (saison, alimentation individu, troupeau, etc.) qui sont suscep-

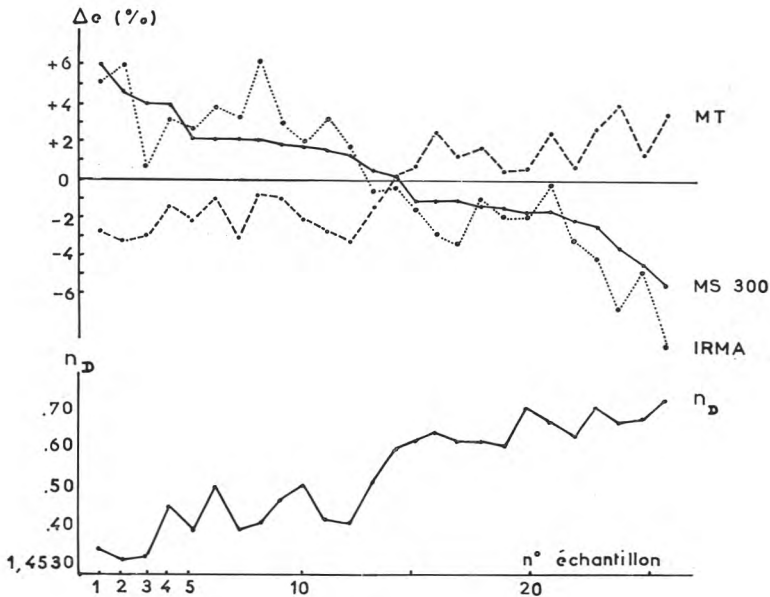


fig. 6

Relation entre l'indice de réfraction ( $n_D$ ) de la matière grasse du lait et l'erreur relative  $\Delta e$  (exprimée en p.100 par rapport au Rôse-Gottlieb) de dosage de la matière grasse avec le Milko-Scan 300, le Milko-Tester et l'IRMA sur 26 échantillons de laits individuels.

tibles de modifier plus ou moins la précision de l'appareil, elle permet aussi d'expliquer les divergences constatées entre les diverses méthodes de routine.

1. Pour les dosages de matière grasse, il ne fait pas de doute que la composition du lait en acides gras (exprimée dans notre essai par l'indice de réfraction de la matière grasse) est le facteur le plus important qui limite la précision des dosages. Les laits individuels analysés, ayant été prélevés au moment d'un changement de régime alimentaire (rentrée des animaux à l'étable), présentent une assez grande variabilité d'indice de réfraction ( $\sigma_{n_D} = 13 \times 10^{-4}$ ). Ceci explique en grande partie l'écart-type élevé que nous avons obtenu dans la comparaison MS 300 - RG des laits individuels. Inversement, la très bonne précision par rapport au RG observée dans le cas des laits de troupeaux provient en grande partie de la faible variabilité des indices de réfraction ( $\sigma_{n_D} = 4 \times 10^{-4}$ ). Le rapport entre les écarts-types résiduels de précision obtenus pour les laits individuels et pour les laits de troupeau ( $0,90/0,34 = 2,6$ ) est très proche du rapport correspondant des écarts-types des indices de réfraction ( $13/4 = 3,2$ ).

Pour illustrer l'influence de l'indice de réfraction sur les mesures effectuées avec le MS 300, ainsi qu'avec les deux autres appareils, nous avons porté, dans la figure 6, les différences relatives MS 300 - RG, IRMA - RG et MTA - RG, obtenues sur 26 échantillons de laits individuels, en fonction des variations de l'indice de réfraction. On constate qu'il y a un accroissement net des résultats MS 300 et IRMA et, inversement, une nette diminution des résultats MTA au fur et à mesure de l'augmentation de  $n_D$ .

La « réaction » opposée des appareils de dosage infra-rouge d'une part et du Milko-Tester d'autre part vis-à-vis des variations d'indice de réfraction explique la bonne corrélation obtenue entre le MS 300 et l'IRMA et, comparativement, la corrélation médiocre trouvée dans la comparaison MS 300 et MTA.

De l'analyse des résultats ressortent deux conclusions pratiques importantes déjà formulées dans une étude précédente (Grappin et Jeunet, 1972) :

a) Les dosages de la matière grasse du lait avec le MS 300 comme avec l'IRMA et le MTA sont influencés par tous les facteurs biologiques modifiant la composition du lait en acides gras. Parmi ces facteurs, on peut citer essentiellement :

1. La saison et la région, dont l'influence peut et doit être annulée, ou tout au moins très fortement diminuée, grâce à des calibrages appropriés. Ceci est important en particulier dans le cadre du paiement du lait suivant sa composition, car le laboratoire doit donner, au niveau des moyennes, des résultats identiques à ceux de la méthode officielle de façon que l'usine puisse équilibrer ses bilans « entrée » et « sortie » de matière grasse. Ceci est faisable si les contrôles de calibrage sont effectués régulièrement avec précision.

2. L'individu et le troupeau, dont l'influence ne peut pas être éliminée. Ainsi que nous l'avons déjà montré, il existe au niveau de

l'indice de réfraction de la matière grasse un « effet animal » et un « effet troupeau » significatifs (Grappin et Jeunet, 1972) qui peuvent entraîner dans certains cas des différences MS 300 - RG systématiques. Par conséquent, le MS 300 peut donner des résultats de matière grasse qui sont soit surestimés soit sous-estimés par rapport au RG, dans le calcul de la lactation d'un animal (lait individuel) ou de la livraison annuelle de lait d'un producteur (lait de troupeau).

L'emploi du MS 300 n'est possible que si ces différences systématiques restent à l'intérieur de limites acceptables. Nous avons montré à propos du MTA que ces erreurs, sans être négligeables, demeurent cependant assez faibles par rapport à d'autres erreurs, notamment celles qui sont liées à la fréquence des contrôles.

b) Le fait que le MS 300 soit influencé par une propriété du lait relativement variable comme le  $n_D$  compliquera la comparaison des résultats d'analyses effectuées soit par des laboratoires différents, soit avec des méthodes différentes. Prenons à titre d'exemple un laboratoire possédant un MS 300, un MT et un IRMA. Ce laboratoire utilise normalement le lait de la région où il est situé pour calibrer ses appareils de façon à donner des résultats qui soient en moyenne toujours égaux aux résultats donnés par la méthode de référence. Supposons que ce laboratoire reçoive d'une autre région, des échantillons de lait dont l'indice de réfraction est en moyenne supérieur de  $10^{-3}$  unité à l'indice de réfraction des échantillons ayant servi à calibrer les appareils. Dans ce cas, le laboratoire donnera, pour ces échantillons de laits différents, des résultats sous-estimés de 2 p. 100 environ en valeur relative avec le MS 300, sous-estimés de 2,5 p. 100 avec l'IRMA et surestimés de 1,5 p. 100 avec le MT. Soit pour une moyenne au RG de 36,0 g/kg par exemple, des moyennes de 35,3 g/kg au MS 300, de 35,1 g/kg à l'IRMA et de 36,5 g/kg au MT.

On voit toutes les difficultés (déjà signalées précédemment) qui risquent de surgir dans l'interprétation des résultats si les comparaisons ne sont pas faites avec une extrême prudence et une bonne connaissance de tous les éléments en jeu.

1. L'origine des différences MS 300 - méthode de référence, pour le dosage des protéines, est moins bien définie que dans le cas des dosages de matière grasse.

D'après nos résultats (fig. 4), le lactose semble avoir un rôle non négligeable sur les résultats MS 300, bien que les variations du taux de lactose n'expliquent qu'une faible part (16 p. 100) des écarts par rapport à la méthode de référence. La meilleure précision des dosages de protéines obtenus avec les laits de troupeaux peut être expliquée par le fait que la variabilité du taux de lactose est ici, environ deux fois et demie plus faible que pour les laits individuels.

Parmi les facteurs susceptibles de modifier le taux de lactose du lait, la mammite est certainement un des plus importants. Toutefois,

nous avons obtenu des corrélations assez faibles ( $r = -0,25$  et  $-0,30$ ) entre le taux de lactose et le log du nombre de cellules/ml des échantillons de lait. Par conséquent, la présence de mammite ou plus exactement une numération cellulaire élevée, n'entraîne pas automatiquement un résultat erroné avec le MS 300. Ceci s'applique spécialement au cas des laits de troupeaux dont la teneur en lactose a été trouvée peu variable malgré la présence de nombreux échantillons présentant une teneur élevée en cellules (12 p. 100 des échantillons ayant plus de  $10^6$  cellules/ml). En pratique, il est vraisemblable que l'influence des mammites sur le dosage des protéines ne se fait éventuellement sentir de manière significative que sur les laits individuels.

En dehors des mammites, il serait utile de compléter nos connaissances sur l'influence des principaux facteurs biologiques (saison, région, individu, etc.) sur la précision des dosages de protéines avec le MS 300.

Soulignons que la précision des dosages de protéines serait certainement améliorée si l'appareil effectuait la détermination du taux de lactose puis une correction en fonction de ce taux (de même que se font déjà les corrections de l'influence du taux de matière grasse sur le taux de protéines et vice-versa).

La comparaison du MS 300 avec les autres méthodes de routine servant au dosage des protéines n'entraîne pas de difficulté particulière. On trouve normalement une bonne corrélation entre les deux méthodes IR. Toutefois on pouvait s'attendre à une meilleure corrélation entre le MS 300 et le Noir Amido avec les laits individuels puisque ces deux méthodes se trouvent influencées (dans le sens d'une surestimation des résultats), par les mammites : le MS 300 en raison de la baisse du taux de lactose et le Noir Amido en raison de la baisse du rapport caséine/matières azotées totales (ou augmentation du rapport protéines solubles/matières azotées totales). La raison de ce fait réside dans la corrélation significative mais relativement faible ( $r = 0,40$ ) que nous avons trouvée entre le taux de lactose et le pourcentage de caséine du lait.

L'utilisation comme référence du TP à la place du taux de MAT n'a pas beaucoup modifié la précision des dosages de laits individuels (l'écart-type résiduel passe de 0,55 g/kg pour le taux de MAT à 0,50 g/kg pour le TP mais a amélioré nettement par contre la précision des dosages de laits de troupeaux (l'écart-type résiduel passe de 0,45 g/kg pour le MAT à 0,29 g/kg pour le TP). Ceci tient au fait que, paradoxalement, pour les populations de laits analysés, la proportion de NPN dans le lait est moins variable dans le cas des laits individuels (amplitude de variation de 3,7 à 5,5 p. 100) que dans le cas des laits de troupeaux (amplitude de variation de 3,0 à 7,0 p. 100).

2. Nous avons montré que la précision des résultats donnés par le MS 300 diminue lorsque la composition du lait s'éloigne de celle

d'un lait « moyen » de composition normale, elle dépend également des précautions prises par l'utilisateur pour maintenir un calibrage correct de son appareil. Mais il ne faut pas oublier que la précision dépend aussi de la bonne conservation des échantillons de lait. On a vu que la lipolyse, parfois importante dans le cas des laits réfrigérés, est une source non négligeable d'erreur ; il en est de même de la protéolyse pour le dosage des protéines. D'une manière générale, on peut dire que toute altération physique (barattage, échantillons huileux, floculation des protéines) ou chimique (lipolyse, protéolyse, acidification) se traduit par une erreur plus ou moins notable dans les résultats d'analyse.

Nous soulignons donc à nouveau le rôle essentiel des conditions de prélèvement et de conservation des échantillons de lait sur la précision des dosages en particulier dans le cas du MS 300.

Une utilisation correcte du MS 300 implique un contrôle permanent de la fidélité (stabilité) et de l'exactitude de calibrage de l'appareil.

Comme pour tous les appareils de ce type, une norme d'utilisation donnant les modalités techniques de contrôle de l'appareil devra être établie rapidement.

Signalons dès à présent qu'il sera possible d'utiliser les méthodes Gerber et Noir Amido comme méthodes de référence secondaires pour le contrôle de ce calibrage.

## CONCLUSIONS

En tant qu'appareil de routine, le MS 300 présente incontestablement un certain nombre de qualités originales : simplicité de fonctionnement, encombrement réduit, cadence élevée, absence de réactifs et, probablement, mais seule l'expérience le montrera, une bonne fiabilité.

Au point de vue analytique, la conception de l'appareil permet d'obtenir une très bonne répétabilité et une précision acceptable par rapport aux méthodes de référence lorsque l'appareil est utilisé pour des contrôles zootechniques individuels ou en vue du paiement du lait suivant sa composition. Les résultats obtenus avec le MS 300 se trouvant modifiés dès que la composition du lait s'éloigne de la composition moyenne normale, nous avons constaté une assez grande différence de précision entre les laits individuels et les laits de troupeaux.

L'utilisation du MS 300 nécessite, de la part de l'utilisateur, une attention toute particulière au niveau des contrôles : contrôle de la stabilité et de la fidélité à court et moyen terme de l'appareil,

contrôle très régulier dans le temps et dans l'espace de l'exactitude du calibrage et enfin prudence dans les comparaisons de résultats d'analyses effectuées par des laboratoires différents et surtout avec des méthodes différentes (Milko-Tester notamment).

Malgré ces nombreuses qualités techniques, cette première étude montre que le Milko-Scan 300, au même titre d'ailleurs que les autres appareils automatiques de dosage, ne présente pas encore au niveau de la précision, l'idéal en matière de méthode de routine d'analyse de la composition en matière grasse et en protéines du lait.

### Résumé

Une étude a été entreprise pour déterminer la valeur de l'appareil Milko-Scan 300 (A/S N.Foss Electric, DK) utilisé pour le dosage de la matière grasse et des protéines du lait.

L'écart-type de répétabilité entre analyses faites en double est de 0,15 g/kg. Les comparaisons par rapport aux méthodes de référence (méthode Röse-Gottlieb pour la matière grasse et méthode Kjeldahl [N total - NPN] pour les protéines) donnent respectivement pour les laits individuels et les laits de troupeaux, les écarts-types résiduels deduits de la régression :  $\sigma_{y,x} = 0,90$  et 0,34 g/kg pour les dosages de matière grasse et 0,50 et 0,29 g/kg pour le dosage des protéines.

Les comparaisons par rapport aux autres méthodes de routine montrent une bonne corrélation entre le Milko-Scan 300 et l'IRMA et une corrélation médiocre entre le Milko-Scan 300 et le Milko-Tester pour le dosage de la matière grasse ( $\sigma_{y,x} = 1,47$  g/kg pour les laits individuels et 0,57 g/kg pour les laits de troupeaux).

La précision des dosages matière grasse est influencée par les variations d'indice de réfraction ( $n_D$ ) de la matière grasse : une augmentation de  $10^{-4}$  de  $n_D$  entraîne une baisse du taux de matière grasse (comparé au Röse-Gottlieb) de 0,20 p. 100 en valeur relative. En conséquence, il est très important de connaître tous les facteurs biologiques (saison, région, individu, troupeau, etc.) modifiant le  $n_D$  de la matière grasse.

Les mesures de protéines sont influencées par les variations du lactose du lait.

En raison d'une lipolyse élevée, l'emploi de  $HgCl_2$  comme produit de conservation des échantillons ne convient pas avec le MS 300.

L'exactitude de calibrage de l'appareil doit être vérifiée fréquemment.

## Summary

A study of the determination of fat and protein content of milk with the Milko-Scan 300 apparatus (A/S N. Foss-Electric, DK) has been undertaken. The s.d. of repeatability between duplicate is 0.015 p. 100. Compared to reference methods (Röse-Gottlieb for fat and Kjeldahl [total N- NPN] for true protein), the accuracy expressed as the s.d. from regression is, for individual and herd milks respectively :  $\sigma_{y,x} = 0.090$  and  $0.034$  p. 100 for fat and  $0.050$  and  $0.029$  p. 100 for true proteins.

The comparisons with the other routine methods show a good correlation between IRMA and Milko-Scan 300 and a rather poor correlation between Milko-Tester and Milko-Scan 300 for fat determinations :  $\sigma_{y,x} = 0.147$  for individual milks and  $0.057$  p. 100 for herd milks.

The accuracy of fat determinations is influenced by the variations of the refractive index ( $n_D$ ) of fat : an increase of  $10^{-4}$  of  $n_D$  produces a decrease expressed in relative value (compared to Röse-Gottlieb) of  $0.20$  p. 100. Consequently it is important to know the influence of various biological factors such as season, region, herd, individual etc. on the  $n_D$  of milk fat.

The protein measurements are modified by the variations of the lactose content of milk.

As  $HgCl_2$  induces lipolysis, this preservative is unsuitable.

The accuracy of the calibration must be checked frequently.

*Reçu pour publication en avril 1976.*

## Références bibliographiques

- ADDA (J.), BLANC-PATIN (E.), JEUNET (R.), GRAPPIN (R.), MOCOQUOT (G.), POUJARDIEU (B.) et RICORDEAU (G.) (1968). — Essais d'utilisation de l'Infra-Red Milk Analyser. *Le Lait*, 48, 145-153, 293-302.
- GOULDEN (J. D. S.) (1964). — Analysis of Milk by infra-red absorption. *J. Dairy Res.*, 31, 273-284.
- GRAPPIN (R.) et JEUNET (R.) (1970 a). — Essais de l'appareil « Milko-Tester Automatique » destiné au dosage en série de la matière grasse du lait. *Le Lait*, 50, 235-256.
- GRAPPIN (R.), JEUNET (R.) et ROGUINSKY (M.) (1970 b). — Influence de la mammite sur la composition de la matière azotée des laits de quartiers et sur les dosages de matière azotée par la méthode au noir amido et l'appareil Infra-Red Milk Analyser. *Le Lait*, 50, 491-510.
- GRAPPIN (R.) et JEUNET (R.) (1971). — Essais de l'appareil Compteur-Coulter utilisé pour la détermination du nombre de cellules totales des laits de troupeaux. *Le Lait*, 51, 273-293.

- GRAPPIN (R.) et JEUNET (R.) (1972). — Facteurs biologiques responsables des variations observées dans la précision des méthodes de routine utilisées pour le dosage de la matière grasse du lait (Milko-Tester, Infra-Red-Milk Analyser et Gerber). *Le Lait*, 52, 324-346.
- GRAPPIN (R.) (1976). — Guide pour l'évaluation des méthodes de routine d'analyses (à paraître dans « *Le Lait* », 1976, n° 559-560, novembre décembre).
- PONT (E. G.) (1955). — A de-emulsification technique for use the peroxyde test on the fat of milk, cream, concentrated and dried milks. *Aust. J. Dairy Techn.*, n° mai-juin, 72.
- ROWLAND (S. J.) (1938). — The determination of the nitrogen distribution in milk. *J. Dairy Res.*, 9, 42-46.
- SHIELDS (J.) (1975). — The analysis of milk by infra-red absorption. Thesis B Ph. Chemistry Department, University of York.
- VAN REUSEL (A.) (1975). — Influence of lipolysis on Milko-Tester analysis. Proceedings of the Lipolysis Symposium, Doc. n° 86, FIL-IDF.

### Remerciements

*Nous remercions vivement MM. Hermier et Mocquot pour les critiques et corrections apportées au manuscrit.*

*Nous remercions également M. Pascal (directeur du C.I.L., Alençon) qui a effectué les dosages avec l'appareil IRMA.*

---