

MESURE DE LA LIPOLYSE DANS LE LAIT

Un phénomène préoccupant

La lipolyse de la matière grasse (MG) est un facteur qui préoccupe de plus en plus les transformateurs en raison de la baisse de qualité (mauvais goûts) qu'elle occasionne dans certains produits laitiers.

Maintenant bien identifiées, les causes principales du développement de la lipolyse sont liées aux modes de traite, de transfert et de conservation du lait dans le lait, qui sont à l'origine de chocs physiques et thermiques plus ou moins fréquents qui fragilisent les globules gras et favorisent le contact de la MG avec les enzymes lipolytiques présentes dans le lait (lipase naturelle du lait, lipases de contamination bactérienne).

Dans certains départements, l'interprofession laitière, ainsi que certaines entreprises ont déjà commencé à prendre en compte le critère "lipolyse" dans le paiement du lait et cette tendance va se développer.

Une nécessaire harmonisation des méthodes de dosage

Afin de permettre la mesure de la lipolyse, les laboratoires interprofessionnels concernés ont été amenés à faire un choix de méthode de dosage entre deux catégories : les méthodes titrimétriques (famille des méthodes BDI -Bureau of Dairy Industries-) et les méthodes colorimétriques (famille des méthodes aux savons de cuivre ou MSC).

Ces méthodes mesurent toutes l'acidité de la MG, directement liée à la teneur en acides gras libres (AGL), teneur qui croît au fur et à mesure que se développe la lipolyse.

Compte tenu de ce contexte et de l'ouverture du Marché Européen, il devient indispensable d'assurer une homogénéité dans les pratiques et la qualité des résultats des laboratoires français. C'est pourquoi CECALAIT a mis en place, à l'automne 1991, des chaînes nationales d'analyses sur ce critère. Celles-ci ont mis en évidence une diversité de pratiques, qui nécessite une harmonisation dans le cadre d'une utilisation de type réglementaire. Ce travail est actuellement en cours avec l'aide de CECALAIT.

Aussi, nous apparaît-il utile de présenter les deux méthodes de routine du dosage de l'acidité de la MG, BDI et savons de cuivre, d'une part dans ce numéro de la Lettre de Cecalait, d'autre part dans un prochain numéro, afin de souligner les points primordiaux qu'il convient de maîtriser.

La méthode BDI

Elle a subi de nombreux aménagements et modifications depuis ses premières applications, ce qui fait que l'on a plutôt affaire à une famille de méthodes. On distingue notamment la méthode de Jamotte (1972), la méthode de Driessen et al. (1977), la méthode INRA de Chilliard et al. (1983) et la méthode, adoptée par la Fédération Internationale de Laiterie (FIL), décrite en détail dans le Bulletin FIL N° 265 de 1991. Elle devrait être adoptée comme

norme dans un avenir proche et devrait de ce fait constituer une référence internationale.

Pour une présentation complète de la méthode, on se référera au Bulletin FIL N° 265. Nous traiterons ci-dessous des principes et des points clés qui nécessitent une harmonisation et un bon contrôle !

PRINCIPE DE LA METHODE

Par mélange avec une solution détergente, suivi d'une décantation à 95-100°C, la MG du lait est séparée de la phase aqueuse du lait. L'acidité libre contenue dans cette MG est alors titrée (à partir d'un aliquot en solution dans un solvant organique) à l'aide d'une liqueur alcaline en solution alcoolique et en présence d'un indicateur coloré.

1 EXTRACTION

L'extraction est la résultante de différents phénomènes physico-chimiques plus ou moins simultanés, qui sont étroitement liés à la nature des produits en présence et à leurs proportions respectives, aux conditions de milieu (pH et température) et à la durée de l'extraction. Ceux-ci conditionnent la libération physique des AGL du lait (une coagulation éventuelle des caséines en retient une partie), et la distribution des AGL entre la phase aqueuse et la phase grasse qui sera analysée (effet de la dissociation des AGL, liée au pH et du coefficient de partage entre phase aqueuse et grasse).

HARMONISATION

① Température - durée

Les différentes variantes de la méthode BDI s'accordent sur une température d'extraction de 95-100°C pendant 15 mn.

② pH

Le pH d'extraction varie selon les cas entre 5,5 (Chilliard et al. 1983) et 6,6 (Driessen et al., 1977; FIL, 1991), ce qui entraîne des différences moyennes de 10% entre les deux extrêmes (voir Figure 1).

La FIL a donc arrêté son choix sur un pH de 6,6, proche de celui du lait de manière à ce que l'extraction n'entraîne pas de modification dans la dissociation des AGL et donc dans leur distribution entre phase grasse et phase aqueuse.

③ Rapport volume de lait / volume de solution détergente

Une variation même faible de ce rapport entraîne une modification de distribution entre phase aqueuse et phase grasse, du fait d'un coefficient de partage, qui ne varie pas. Selon les différentes variantes de la méthode, le rapport varie entre 1:1 et 4:1 ! Or on a mesuré qu'une modification de ce rapport de 4:1 à 3:1 entraîne une diminution apparente de l'acidité de 10%. La proportion lait / détergent a donc été fixée à 3,5:1, le rapport le plus communément utilisé.

● Nature des produits de la solution détergente

Toutes les formules utilisées en méthode BDI contiennent du Triton X-100, associé à un polyphosphate de sodium. Le choix du polyphosphate détermine le pH de la solution d'extraction. Certaines ont tendance à s'hydrolyser lors du séjour au bain-marie à 95-100°C et le pH décroît rapidement jusqu'à floculation des caséines. La FIL a adopté l'utilisation du tétraphosphate de sodium, qui permet l'obtention directe d'un pH proche de 6,6 et un ajustement final plus aisé.

Certaines formulations de solutions détergentes incluent soit de l'urée, soit de l'isopropanol qui ont pour effet de modifier le pH ou la polarité de la phase aqueuse. Ces produits sont à proscrire, en tant que sources potentielles de biais.

acidité de la MG à pH x

acidité de la MG à pH 6,6

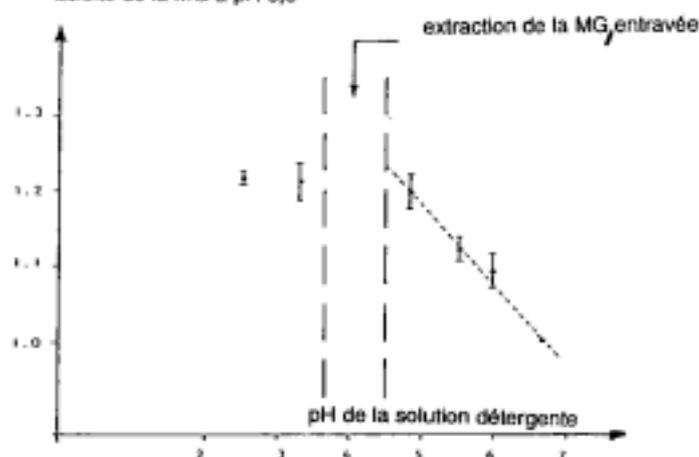


Figure 1 : augmentation relative de l'acidité de la MG du lait en fonction de la décroissance du pH de la solution détergente (Van Reusel, 1989 in Bulletin FIL N°265, 1991)

2 TITRATION DE LA MATIERE GRASSE

La titration reprend les éléments de la norme FIL 6B:1989, "Dosage de l'acidité de la MG dans les produits à base de MG laitière", mais en les adaptant à de faibles quantités de MG.

Ces faibles quantités sont liées au volume de lait nécessaire qui a été fixé à 16 ml, en fonction de considérations pratiques de prélèvement (volume de prélèvement limité, car il y a d'autres analyses à effectuer) et d'analyse (utilisation de récipients permettant l'analyse de séries importantes, donc de dimensions réduites, tels que les butyromètres de Van Gulik ou les tubes de MONED). Dans ces conditions, un lait à 40 g/l de MG permet d'extraire environ 640 mg de MG, ce qui permet de réaliser chaque dosage en double avec des prises d'essai de 250 mg. En deçà, la précision des résultats risque de devenir incompatible avec une utilisation réglementaire.

Compte tenu des faibles quantités de MG ainsi mises en jeu, il importe de contrôler les points essentiels suivants :

- précision des prises d'essai;
- protection contre le CO₂ de l'air (piégeage, bullage);
- exactitude du titre de la liqueur de titration (dilution précise);
- précision de la distribution de la liqueur de titration (contrôle pondéral, sur tout ou partie de l'échelle);
- détermination du point d'équivalence (indicateur adapté, colorimétrie).

La titration peut être réalisée en continu, comme le préconise la FIL (prises d'essai successives dans le même solvant de la MG) ou en discontinu (changement de solvant et de récipient), mais dans ce dernier cas, des précautions élémentaires sont nécessaires.

● précision des prises d'essai

a) Normes selon le bulletin N° 265 de la FIL

* La quantité requise pour le dosage est de 250 mg de MG, précise à 2 mg près, soit une tolérance relative de $\pm 0,8\%$, ce qui occasionne un erreur systématique de $\pm 0,008$ meq/100 g

* Le système de prise d'essai (seringue calibrée) ne doit pas entraîner d'effet de contamination entre échantillons supérieur à 3%, soit entre une MG à 0,50 meq/100 g et une MG à 1,5 meq/100 g une erreur de 0,03 meq/100 g. Par ailleurs, le système de prise d'essai doit être répétable car l'erreur de répétabilité relative s'applique aux résultats. La titration proprement dite doit respecter la norme 6B:1989, où $r = 0,05$ meq/100 g soit un CV de 1,8%. La prise d'essai devra donc respecter au moins cette valeur de CV de 1,8%.

b) Mesure volumétrique (système en continu)

L'adoption d'un système de distribution se fera après essai par pesée et vérification que le système respecte bien ces normes de précision.

Dans ces conditions, pour un résultat individuel, le cumul des erreurs systématiques et aléatoires tolérées n'excèdera pas $\pm 4,5\%$, soit 0,045 meq/100 g au niveau de 1 meq/100 g (l'erreur de contamination vient en addition de cette erreur).

Les seringues à expulsion totale peuvent convenir à ce type d'utilisation.

c) Mesure pondérale (système discontinu)

Ce système permet la maîtrise parfaite de la prise d'essai, la précision étant celle de la balance utilisée. Cette balance analytique à 10^{-4} g sera vérifiée régulièrement (poids de référence, service de contrôle agréé).

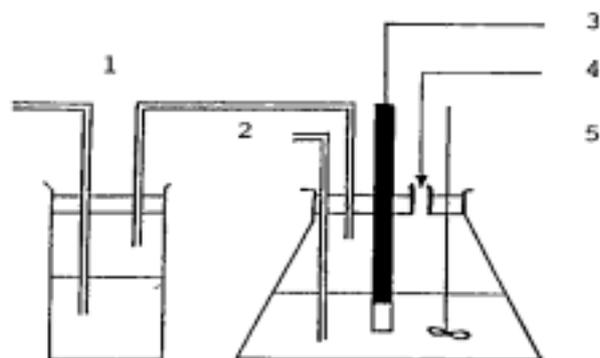
Dans ces conditions, l'erreur de prélèvement est très faible et n'excède pas 0,5% soit 0,005 meq/100 g à un niveau de 1 meq/100 g.

⊗ protection contre le CO₂ de l'air

Le gaz carbonique de l'air peut être titré sous forme d'acide carbonique par la liqueur alcaline et fausser les dosages par excès.

a) Evacuation à l'azote

* Le montage de titration doit permettre d'éliminer le CO₂. Un courant d'azote pur, exempt de CO₂ doit permettre de chasser les traces de CO₂ dans le récipient de titration clos, l'azote s'évacuant par l'orifice d'introduction de la prise d'essai dans le cas d'un système de dosage en continu (voir figure 2).



1. arrivée de l'azote, passant par une bouteille de lavage contenant de l'éther de pétrole

2. admission d'une solution alcaline à 0,01N depuis une burette de titration semi-automatique

3. sonde optique, connectée à un colorimètre et à une chaîne de titration

4. orifice d'introduction du solvant de la MG et des prises d'essai

5. agitateur

Figure 2 : Schéma de montage pour la titration successive de différentes prises d'essai dans le même solvant de la MG (in Bulletin FIL N°265, 1991)

* Dans un montage en discontinu, le nouveau récipient avec prise d'essai sera purgé à l'azote avant l'introduction du solvant dans la MG et le début de la titration.

Un "blanc réactifs" (solvant seul) sera effectué régulièrement (toutes les 10 analyses) et son acidité sera soustraite aux résultats de routine (voir norme FIL 6B:1989).

b) Choix de la liqueur de titration

La liqueur alcaline préconisée par la FIL (tétra N butylammonium hydroxyde (titrant) dans le 2 propanol / méthanol (solvant)) a l'avantage de solubiliser plus faiblement le CO₂ ambiant par rapport à la classique potasse alcoolique. Néanmoins, elle doit être préparée extemporanément.

⊗ Exactitude du titre de la liqueur de titration

L'erreur relative existant sur ce titre se répercute intégralement sur les résultats des dosages et peut s'additionner aux erreurs de prise d'essai.

Le titrant FIL garantit une bonne stabilité journalière de son titre (peu sensible au CO₂, faible évaporation du solvant, bonne affinité du titrant et de son solvant), mais ce titre doit être parfaitement déterminé par rapport à une solution étalon d'hydrogénophthalate de potassium, en présence de bleu de thymol. En outre, des analyses de contrôle régulières sur une MG de contrôle (témoins) ou de référence (préparée selon la norme FIL 6B:1989 ou le Bulletin FIL N° 265 de 1991) doivent permettre de vérifier si le titre évolue et, le cas échéant, d'en redéterminer la valeur.

⊗ Précision de la distribution de la liqueur de titration

a) L'erreur relative de la titration se répercute directement sur les résultats : on vérifiera par pesée la justesse du système de distribution sur l'échelle de distribution utilisée.

- en cas de système automatique avec moteur pas à pas, un réglage sera effectué (erreur relative : 0,3%)

- dans le cas de microburette, on mesurera les erreurs éventuelles à différents niveaux de chute pour permettre des corrections si nécessaire (erreur relative autour de 0,5% en valeur relative).

b) La résolution du système de distribution détermine celle de la méthode : une résolution de 0,01 meq/100 g nécessite une mesure de chute de burette de 0,025 ml. Le bulletin FIL 265 de 1991 fixe la division minimale pour une microburette à 0,005 ml qui permet d'obtenir une telle résolution par estimation entre 2 divisions.

⊗ Précision de la détermination du point d'équivalence

Meilleure est l'affinité de la liqueur de titration avec le solvant de la MG et celle de ce dernier avec la MG elle-même, meilleure est la neutralisation de l'acidité de la MG, d'où le choix des experts de la FIL.

Compte tenu de la faible ionicité du milieu, la seule méthode de détermination du point d'équivalence est l'utilisation d'un indicateur coloré (une sonde à pH n'est pas appropriée). Le choix de cet indicateur est donc particulièrement important. Le bleu de thymol (dans le 2 propanol) qui a un virage très proche du point d'équivalence, est, de ce fait, le plus approprié.

La détermination du point de virage, réalisée de manière visuelle peut être facilitée par l'utilisation d'une sonde optique à 600-620 µm. On peut y associer une microburette automatique qui simplifiera le travail du laborantin et permet de gagner du temps. Si la densité optique au point d'équivalence est préalablement réglée, l'erreur du manipulateur est supprimée (appréciation du virage, erreur de lecture).

Conclusion

La procédure publiée par la FIL est le résultat d'une optimisation des différentes étapes de la méthode par des experts

internationaux. Dans ce cadre, la méthode doit permettre de respecter les valeurs de fidélité qui y sont données :

répétabilité : $r = 0,05$ meq/100 g
reproductibilité : $R = 0,08$ meq/100 g

Dans ces conditions, les erreurs systématiques d'un groupe entraîné de laboratoires se distribuent dans la fourchette de $\pm 0,045$ meq/100 g, ce qui recouvre les différentes erreurs de titration énumérées ci-dessus avec leurs tolérances respectives associées à l'erreur d'extraction.

Références citées dans ce texte

BULLETIN DE LA FIL, 1991, N° 265.FIL-IDF, Bruxelles.

CHILLIARD, Y., BAUCHART, D., CARTIER, P. et CHAZAL, M.P.
Etalonnage, comparaison et automatisation de différentes

méthodes de dosage des acides gras libres du lait de vache.
Brochure ITEB - INRA, 1983, N° 84031

DRIESSEN, F.M., JELLEMA, A., VAN LUIN, F.J.P., STADHOUDERS, J. and WOLBERS G.J.M. The estimation of the fat acidity in raw milk. An adaptation of the BDI method, suitable for routine assays. *Neth. Milk Dairy J.*, 1977, V. 31, p. 40-55

JAMOTTE, P. (1972) Note concernant la méthode BDI, utilisée à Gembloux. Documentation FIL. Groupe de travail A3, 1989

norme FIL 6B:1989 :Produits à base de matière grasse laitière et beurre : détermination de l'acidité de la matière grasse

VAN REUSEL, A. Contribution à l'étude de la détermination des acides gras libres dans le lait et les produits laitiers. Gembloux (Belgique) : Centre de Recherches Agronomiques de l'Etat, 1989, Mémoire N° 12, ISBN 2 - 87286 -000 -2