

(12) **FASCICULE DE BREVET**

(11) N° de publication :
MA 34988 B1

(51) Cl. internationale:
G 01N 27/00, 5/04

(43) Date de publication : **03/04/2014**

(21) N° Dépôt : **34482**

(22) Date de Dépôt : **22/12/2011**

(71) Demandeur(s) :

UNIVERSITE IBN TOFAIL, BP 133, KENITRA 14000, MA

(72) Inventeur(s) :

**Sakina BELHAMIDI; Mohamed EBN TOUHAMI; Salma CHOUNI; Mohamed TAKY; Jamal
EDDOUHANI; Aziz ACHTAEI; Azzedine EL MIDAUI**

(74) Mandataire : **Jamila Jennane**

(54) Titre : **Nouvelle méthode expérimentale pour la détermination des taux des protéines et du
(57) lactose dans le lait et ou le lactosérum**

Abrégé : La présente invention concerne une nouvelle méthode facile à mettre en œuvre et rapide pour la détermination du taux des protéines et du lactose dans le lait et dans le lactosérum.

Cette méthode consiste à coupler trois opérations:

- Opération 1: Ultrafiltration (UF) membranaires.
- Opération 2: Détermination des teneurs en minéraux.
- Opération 3: Mesures d'extrait Sec Total (EST).

L'opération d'ultrafiltration permet d'obtenir un concentrât constitué d'un mélange de protéines, lactose et de minéraux et un perméat constitué de lactose et de minéraux.

Le choix de la membrane appropriée permet de garder la même concentration en lactose et en minéraux dans le perméat et dans le concentrât au cours de l'opération d'ultrafiltration.

Les mesures de conductivité électrique permettent de déterminer le taux des Minéraux. Les mesures gravimétriques permettent d'une part de déterminer la masse du mélange des quatre constituants (Protéines, Matière Grasse, Lactose et Minéraux) dans le Concentrât et d'autre part la masse du mélange des deux constituants (Lactose et Minéraux) dans le Perméat. La teneur en protéines est déduite aisément à partir des deux pesées (Concentrât et Perméat).

La clé de l'invention réside dans deux points essentiels: Coupler des opérations d'ultrafiltration avec des mesures de conductivité électrique et des mesures gravimétriques d'EST. Choisir la membrane appropriée pour arrêter toutes les protéines dans le compartiment retentât et ne laisser passer que le lactose et les minéraux et l'eau dans le compartiment perméat.

Mots clés: Lactosérum, Lait, Protéines, Lactose, Minéraux, Mesure gravimétrie, Conductivité, Ultrafiltration.

Abrégé du contenu technique de l'invention

La présente invention concerne une nouvelle méthode facile à mettre en œuvre et rapide pour la détermination du taux des protéines et du lactose dans le lait et dans le lactosérum. Cette méthode consiste à coupler trois opérations :

- Opération 1 : Ultrafiltration (UF) membranaires.
- Opération 2 : Détermination des teneurs en minéraux.
- Opération 3 : Mesures d'Extrait Sec Total (EST).

L'opération d'ultrafiltration permet d'obtenir un concentrât constitué d'un mélange de protéines, lactose et de minéraux et un perméat constitué de lactose et de minéraux.

Le choix de la membrane appropriée permet de garder la même concentration en lactose et en minéraux dans le perméat et dans le concentrât au cours de l'opération d'ultrafiltration. Les mesures de conductivité électrique permettent de déterminer le taux des Minéraux. Les mesures gravimétriques permettent d'une part de déterminer la masse du mélange des quatre constituants (Protéines, Matière Grasse, Lactose et Minéraux) dans le Concentrât et d'autre part la masse du mélange des deux constituants (Lactose et Minéraux) dans le Perméat. La teneur en protéines est déduite aisément à partir des deux pesées (Concentrât et Perméat).

La clé de l'invention réside dans deux points essentiels: Coupler des opérations d'ultrafiltration avec des mesures de conductivité électrique et des mesures gravimétriques d'EST. Choisir la membrane appropriée pour arrêter toutes les protéines dans le compartiment retentât et ne laisser passer que le lactose et les minéraux et l'eau dans le compartiment perméat.

Mots clés : Lactosérum, Lait, Protéines, Lactose, Minéraux, Mesure gravimétrie, Conductivité, Ultrafiltration.

01 AVR 2014

Description de l'invention

La présente invention concerne une nouvelle méthode facile à mettre en œuvre et rapide pour la détermination du taux des protéines et du lactose dans le lait et dans le lactosérum. Cette méthode consiste à coupler trois opérations :

- Opération 1 : Ultrafiltration (UF) membranaires.
- Opération 2 : Détermination des teneurs en minéraux.
- Opération 3 : Mesures gravimétriques d'Extrait Sec Total (EST).

Le lait est un liquide blanc, opaque, deux fois plus visqueux que l'eau, de saveur légèrement sucrée et d'odeur peu accentuée. Les principaux constituants du lait sont donnés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Composition moyenne des principaux constituants du lait de vache (g/l) [1].

Constituants	Moyennes
Matières Azotées	34
Lactose	48
Matières Salines	9
Extrait sec Dégraissé	91
Matières Grasses	37
Extrait Sec Total	128
Eau libre (solvant) et liée	902
Lait Entier	1 030

L'industrie laitière génère de grandes quantités de co-produits issus de la fabrication du fromage et du beurre. Le produit qui nous intéresse dans cette invention est le lactosérum. C'est un liquide obtenu après la coagulation du lait dans la fabrication du fromage. Il est riche en substances nutritives essentiellement le lactose, les protéines globulaires, une fraction azotée non protéique, la matière grasse et les minéraux [2]. La composition du lactosérum dépend du lait d'origine et du procédé de coagulation des caséines. Le tableau 2 donne la composition type (en g/l) du lactosérum acide et doux.

Tableau 2 : Composition type (en g/l) de lactosérum acide et doux.

	Lactosérum doux	Lactosérum acide
Matière Sèche	71	65,8
Matières Grasses	2,0	0,4
Lactose	49,0	44,0
Azote Non Protéique	0,5	0,2
Protéines	8,0	7,0
Acide Lactique	2,0	5,0
Acide Citrique	1,3	0,3
Minéraux	5,0	8,0
Phosphore	0,41	0,65
Calcium	0,47	1,25
Potassium	1,45	1,48
Sodium	0,5	0,53
Chlorures	2,19	2,09

Le problème majeur est la détermination des taux des protéines et du lactose. Dans la littérature plusieurs méthodes d'analyses sont utilisées pour la détermination de ces composants.

- **Méthodes de dosage de la teneur en protéines** : Méthode de Bradford [3] ; Méthode de Folin–Lowry [4] ; Méthode au BCA: Acide Bicinchoninique [5] ; Méthode de Milkoscan [6].
- **Méthodes de dosage de la teneur en lactose** : Méthode gravimétrique d'Allihn-Soxhlet [7] ; Méthode spectroscopique [8]; Méthode de Milkoscan [6].

Généralement l'industrie laitière, utilise la méthode Kjeldahl [9] ou le Milkoscan [6], pour la détermination de la teneur en protéines. En ce qui concerne la teneur en lactose, elle est déterminée par le Milkoscan ou par la méthode du brix ou bien elle est simplement ignorée. Autrement les laitiers ne s'occupent pas d'analyser le lactose.

Les Inconvénients de la méthode officielle Kjeldhal pour le dosage des protéines :

La détermination des taux protéiques (TP) est lente et nécessite beaucoup de temps environ deux jours, une journée pour la minéralisation et une journée pour la distillation et le titrage du produit final, la méthode nécessite beaucoup de produits chimiques et d'appareillages spéciaux : solution de H_2SO_4 concentré, NaOH concentré, indicateurs colorés, solution d'acide trichloroacétique, pour la minéralisation, distillateur, des Matras, beaucoup de risques de fuites de produits nocifs tels que le CO_2 dans l'étape de minéralisation ou l'ammoniac dans l'étape de distillation. Généralement à l'échelle industrielle la méthode kjeldhal n'est pas plus pratique à cause de ses inconvénients cités ci-dessous. Pour cela on utilise notre nouvelle méthode qui est basée sur le couplage des opérations d'UF membranaire avec des mesures de conductivité électrique et des mesures gravimétriques d'Extrait Sec Total (EST).

Opération 1 : Ultrafiltration: L'Ultrafiltration est une technique membranaire qui permet de retenir des macromolécules de taille comprise entre 0.01 et 0.1 μm , sous une pression de travail de 3 à 10 bars selon la nature du produit à traiter. La membrane d'UF permet le passage dans le compartiment diluât des constituants de faible masse moléculaire tels que l'Eau, les sels minéraux en solution, le lactose, les acides organiques et les peptides. Par contre les constituants de masse moléculaire élevée ($MW > 10 \text{ kg/mol}$) sont totalement ou partiellement retenus et concentrés dans le compartiment concentrât (Globules Gras,

Protéines, Micro-organismes) [10]. L'étape ultrafiltration de l'invention est schématisée dans la figure 1 qui présente un schéma de l'étape UF de l'invention : **P₁** : Prétraitement ; **UF** : Ultrafiltration ; **S et L** : Lactosérum et Lait brut dans la composition (C₁, C₂, C₃, C₄) ; **R** : Retentât dans la composition (C₁, C₂, C₃, C₄) ; **P₂** : Permeat dans la composition (C₃, C₄). C₁= Concentration en matière grasse (g/kg) ; C₂= Concentration en protéines (g/kg) ; C₃= Concentration en lactose (g/kg) ; C₄= Les minéraux (ms/cm).

➤ **Prétraitement** : Avant l'opération d'ultrafiltration le lactosérum et le lait subissent une filtration sur un filtre mono cartouche pour éliminer les particules en suspension et les lipides résiduels.

➤ **Opération d'Ultrafiltration (UF)** : Le lactosérum et le lait) prétraité subit une Ultrafiltration. L'UF avec un Facteur de Réduction Volumique (FRV) prédéterminé, permet de bloquer la totalité des protéines et de la Matière Grasse (MG) dans le compartiment retentât et de laisser passer les Minéraux (Min) et le lactose dans le compartiment perméat. Le suivi de l'opération d'UF nécessite la détermination du FRV donné par la formule suivant : $VFR = V_0/V_R = V_0/V_0 - V_P$; V₀ représente le volume initial de l'échantillon brut (lactosérum ou lait), V_R le volume du Retentât et V_P le volume du Perméat.

La composition du lactosérum et du lait avant et après UF est donnée dans le tableau 3. Il faut signaler que la concentration en lactose et en minéraux au cour de l'opération d'ultrafiltration reste constante dans les deux compartiments (Retentât et Perméat).

Tableau 3 : Composition du lactosérum et du lait avant et après UF

Compositions Paramètres	Avant UF	Après UF à FRV X	
		Concentrât	Perméat
MG (g/kg)	C ₁	XC ₁	0
Protéines (g/kg)	C ₂	XC ₂	0
Lactose (g/kg)	C ₃	C ₃	C ₃
Min (ms/cm)	C ₄	C ₄	C ₄

• **Opération2 : Mesures de conductivité** : La teneur en minéraux est calculée à partir de mesure de la conductivité selon la formule : **Teneurs en Minéraux (g/kg) = CE (mS/cm)*FacteurX** ; CE : Conductivité électrique. Le facteur X varie en fonction de la concentration du produit à traiter. Dans la gamme du lait et du Lactosérum, la teneur en minéraux est déduite à partir de la formule suivante : **Teneurs en Minéraux (g/kg) = Conductivité Electrique (ms/cm)*0,758**

• **Opération3 : Mesures gravimétriques d’EST** : Les mesures gravimétriques consistent à déterminer les masses des échantillons du Retentât et du Perméat par pesée à l’aide d’une balance de précision et après séchage dans une étuve. L’Extrait Sec Total (EST) du perméat donne la Masse (M) du mélange minéraux et lactose : **EST_{Perméat} (g/kg) = Teneurs en Lactose (g/kg) + Teneurs en Minéraux (g/kg)**. L’EST du Retentât donne la masse du mélange minéraux, lactose, matière grasse et protéines : **EST_{Retenât}(g/kg) = Teneurs en Lactose (g/kg) + Teneurs en Minéraux (g/kg)+ Teneurs en Protéines (g/kg)+Teneurs en Matière Grasse (g/kg)**.

➤ **Détermination de la teneur en lactose** : La teneur en lactose est déterminée à partir de la masse de l’échantillon perméat selon la formule : **Teneurs en Lactose (g/kg) = EST_{Perméat}(g/kg) – Teneurs en Minéraux (g/kg)**.

➤ **Détermination de la teneur en protéines** : La teneur en protéines est donnée par la somme de la masse de l’échantillon Retentât : **Teneurs en Protéines (g/kg) = EST_{Retenât}(g/kg) – [(Teneurs en Lactose (g/kg)+Teneurs en Minéraux (g/kg) + Teneurs en Matière Grasse (g/kg))]**. L’analyse de la matière grasse est déterminée par la méthode de Gerber [11].

Remarque1 : Dans le calcul des teneurs en protéines, il faut prendre en considération la valeur du FRV.

L’invention a été vérifiée sur une centaine d’échantillons de : lait, lactosérum, et de poudre de lait. Les résultats sont reproductibles sur le même produit (lait ou lactosérum). Nous nous limitons à présenter les résultats d’une dizaine d’échantillons.

Exemples :

1. **Cas du lait brut** : La détermination de la teneur en protéines et en lactose a été effectuée selon la méthode officielle Kjeldhal et également au moyen de la présente invention (UF+Conductivité+EST). Les tableaux 4 et 5 donnent les résultats d’analyse sur une dizaine d’échantillons.

2. Cas du lactosérum brut : La même série d'analyse a été effectuée pour le lactosérum brut. Les tableaux 6 et 7 donnent les résultats d'analyse des deux méthodes.

Remarque2 : Il faut signaler que chacune des valeurs des tableaux suivant (Lait et lactosérum) est une moyenne de trois mesures. Les résultats d'analyses des tableaux ci-dessus montrent que les valeurs sont reproductibles. Ces tableaux confirment que la présente invention est une méthode fiable, facile à mettre en œuvre et rapide. Elle donne des résultats précis et très proches de ceux obtenus par les méthodes classiques pour les deux produits, le lait et le Lactosérum. Par rapport aux méthodes classiques, les valeurs obtenues par l'invention présentent un écart de l'ordre de 2% pour les protéines et 1% pour le Lactose.

Tableau 4: Comparaison des teneurs en protéines en (g/kg) dans le lait brut par la méthode officielle et par la présente invention

Méthodes Echantillons (ECH)	Mesure officielle Kjeldhal	Invention (UF+Conductivité+EST)
ECH₁	30,5	31,3
ECH₂	34,5	33,2
ECH₃	32,2	33,1
ECH₄	33,3	31,6
ECH₅	32,5	31,6
ECH₆	33,6	30,9
ECH₇	34,3	32,8
ECH₈	31,7	32,1
ECH₉	32,8	31,9
ECH₁₀	33,7	33,1

Tableau 5 : Comparaison des teneurs en lactose en (g/kg) dans le lait brut par la méthode officielle et par la présente invention

Méthodes Echantillons (ECH)	Mesure officielle Kjeldhal	Invention (UF+Conductivité+EST)
ECH₁	47,4	46
ECH₂	48,2	46,5
ECH₃	47,4	47,8
ECH₄	48,1	47,2
ECH₅	47,6	47,3
ECH₆	46,8	47,4
ECH₇	47,2	46,2
ECH₈	46,5	47,4
ECH₉	48,3	47,2
ECH₁₀	47,6	47,3

Tableau 6: Comparaison des teneurs en protéines en (g/kg) dans le lactosérum brut par la méthode officielle et par la présente invention

Méthodes Echantillons (ECH)	Mesure officielle Kjeldhal	Invention (UF+Conductivité+EST)
ECH₁	6,2	5,4
ECH₂	5,4	5,2
ECH₃	6,3	5,5
ECH₄	6,5	5,7
ECH₅	5,8	6,3
ECH₆	5,9	5,6
ECH₇	6,4	5,8
ECH₈	5,5	5,2
ECH₉	5,3	5,6
ECH₁₀	6,2	5,7

Tableau 7 : Comparaison des teneurs en lactose en (g/kg) dans le lactosérum brut par la méthode officielle et par la présente invention

Méthodes Echantillons (ECH)	Mesure officielle Kjeldhal	Invention (UF+Conductivité+EST)
ECH₁	44,2	45,4
ECH₂	43,3	44,7
ECH₃	44,5	46,5
ECH₄	44,7	45,4
ECH₅	46,2	45,4
ECH₆	43,4	45,6
ECH₇	44,4	46,2
ECH₈	46,3	45,5
ECH₉	43,2	44,4
ECH₁₀	45,6	46,3

Références bibliographique

- [1]: **C. Alais**. Principes des techniques laitières. Paris, Editions Sepaic. 4e éd. 814 pages. Science du lait, 1984.
- [2]: **R.R. Zall**. Source and composition of whey and permeate in: Whey and lactoseprocessing/ed. by Zadow J.G., London : Elsevier Applied Science, 1992, 1-72.
- [3]: **Bradford, M. M.** A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Anal. Biochem. 1976, 72:248-254.
- [4]: **DELOBETTE H., FRIRY A.; PLEWNIAK et EGLY J. M.** Le dosage des protéines. Biofutur, 1991,41, 3-11.
- [5]: **Paul Smith et al.**, Mesurment of protein using bicinchoninic acid, Anal.Biochem. 1990,150, 75-85.
- [6]: **R. GRAPPIN and R. JEUNET**, méthode rapide de dosage des protéins dans le lait et le lactosérum. 1979, 345-360.
- [7]: **Dr P.Demont** : Dosage permanganométrique de l'oxyde cuivreux libéré par les sucres réducteurs.Travaux de Chimie alimentaire et d'hygiène.1940. Vol. XXXI, pages 81-85.
- [8]: **Lubert Stryer, Jeremy Mark Berg, John L. Tymoczko** (trad. Serge Weinman), Biochimie, Flammarion, « Médecine-Sciences », Paris, 2003, 5e éd. (ISBN 978-2-257-17116-0).
- [9]:**L.Tremblay,M.F.Laporte,J.Léonil,D.Dupont,P.Paquin**, Quantitation of proteins in milk and milk products, in: P.F. Fox, P.L.H. McSweeney (Eds.), Advanced Dairy Chemistry Vol. 1: Proteins, 3rd Ed. 2003, Kluwer Academic Plenum Publishers, New York.
- [10]:**G. Daufin, G. Gésan, A. Muller, U. Merin, R. Jeantet, C. Bramaud**,b. Industrie laitière (2) : lactosérum dans Les séparations par membrane dans les procédés de l'industrie alimentaire, DAUFIN, G., RENE, F., & AIMAR, 1998, P. (7):310-329 Ed. Tec. et Doc. Lavoisier.
- [11]: **Gerber Method** dosage of the fat milk and whey (NF V 04-210).

Revendications

1. Méthode de détermination des teneurs en protéines et en lactose dans le lait et dans le lactosérum est réalisé par le couplage de trois opérations :
 - Opération 1 : Ultrafiltration (UF) membranaires
 - Opération 2 : Détermination des teneurs en minéraux
 - Opération 3 : Mesures d'Extrait Sec Total (EST)
2. Méthode de détermination des teneurs en protéines et en lactose dans le lait et dans le lactosérum selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'opération d'Ultrafiltration permet de bloquer les protéines dans le compartiment retentât de l'opération.
3. Méthode de détermination des teneurs en protéines et en lactose dans le lait et dans le lactosérum selon les revendications 1 et 2, caractérisée en ce que la détermination des teneurs en minéraux dans les compartiments retentât et perméat de l'étape 2 se fait par des mesures conductimétrique.
4. Méthode de détermination des teneurs en protéines et en lactose dans le lait et dans le lactosérum selon les revendications 1 et 2, caractérisée en ce que les mesures d'EST de l'étape 3 se font par des mesures gravimétriques.
5. Méthode de détermination des teneurs en protéines et en lactose dans le lait et dans le lactosérum selon les revendications 1, 2 et 3 caractérisée en ce que la mesure des teneurs en minéraux se fait par la formule suivante :

$$\text{Teneurs en Minéraux (g/kg)} = \text{Conductivité Electrique (CE)} * 0,758$$

6. Méthode de détermination des teneurs en protéines et en lactose dans le lait et dans le lactosérum selon les revendications 1, 2, 3, 4 et 5, caractérisée en ce que la détermination des teneurs en Lactose se fait par la formule suivante :

$$\text{Teneurs en Lactose (g/kg)} = \text{EST Pérmeat (g/kg)} - \text{Teneurs en Minéraux (g/kg)}$$

7. Méthode de détermination des teneurs en protéines et en lactose dans le lait et dans le lactosérum selon les revendications 1, 2, 3, 4, 5 et 6, caractérisée en ce que la détermination des teneurs en protéines se fait par la formule suivante :

$$\text{Teneurs en Protéines (g/kg)} = \text{EST Rétenant (g/kg)} - [\text{Teneurs en Lactose (g/kg)} + \text{Teneurs en Minéraux (g/kg)} + \text{Teneurs en Matière Grasse (g/kg)}].$$

8. Méthode de détermination des teneurs en protéines et en lactose dans le lait et dans le lactosérum selon les revendications 1 à 7, caractérisée en ce que l'application de cette nouvelle méthode permet de trouver des taux en protéines et en lactose comparables à ceux retrouvés par les techniques classiques.
9. Méthode de détermination des teneurs en protéines et en lactose dans le lait et dans le lactosérum selon les revendications 1 à 7, caractérisée en ce que la détermination des teneurs en protéines et en lactose dans le lait et dans le lactosérum est réalisée en 15heures.

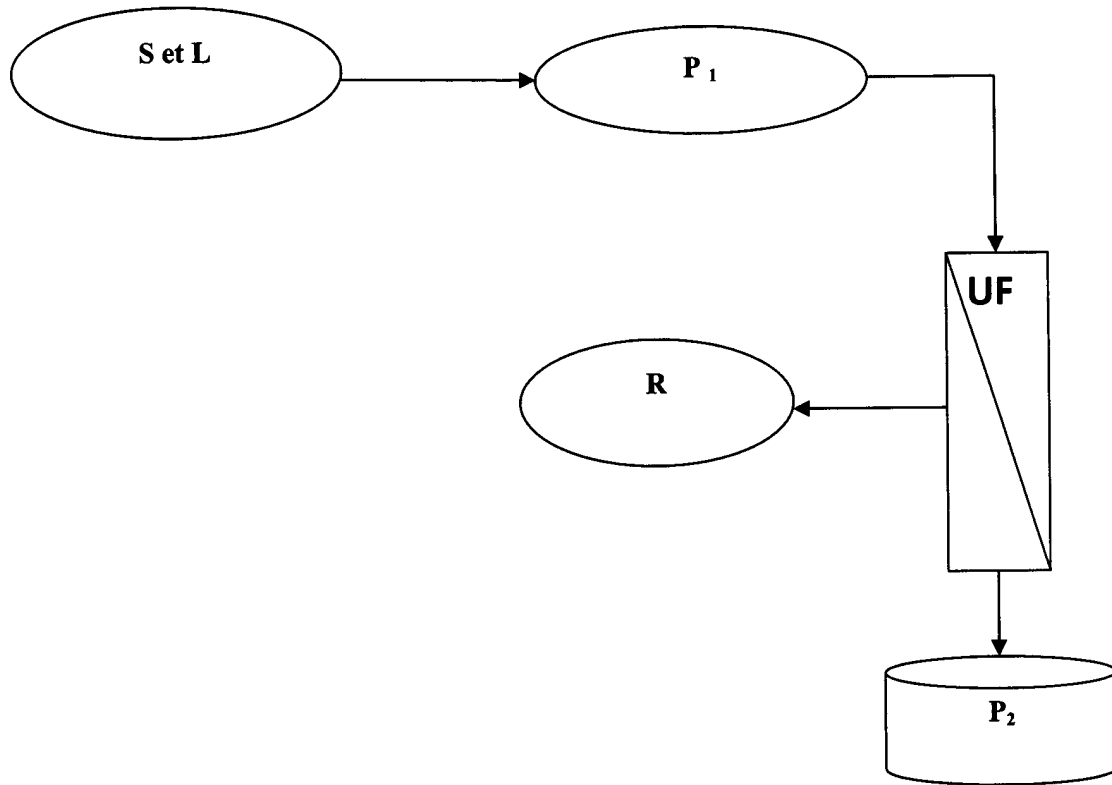


Figure 1