



HAL
open science

Méthodes de dosage des protéines du lait de vache

Hervé Guillou, J.P. Pelissier, R. Grappin

► **To cite this version:**

Hervé Guillou, J.P. Pelissier, R. Grappin. Méthodes de dosage des protéines du lait de vache. *Le Lait*, 1986, 66 (2), pp.143-175. hal-00929062

HAL Id: hal-00929062

<https://hal.science/hal-00929062>

Submitted on 11 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Méthodes de dosage des protéines du lait de vache

H. GUILLOU, J.P. PELISSIER et R. GRAPPIN*

*INRA-CNRZ, Laboratoire de Biochimie et Technologie laitières
78350 Jouy-en-Josas, France*

* *INRA, Station expérimentale laitière - 39800 Poligny, France*

Résumé

Un grand nombre de méthodes a été utilisé pour le dosage quantitatif des protéines du lait (protéines totales, caséines, protéines du lactosérum) : méthodes de dosage nécessitant la dégradation par voie chimique des protéines (méthode de Kjeldahl, Dumas, Kofranyi, dosage des acides sialiques), méthodes par titrage à la formaldéhyde, par fixation de colorant, par colorimétrie, par spectrométrie d'absorption dans l'infrarouge et l'ultraviolet ou par fluorescence dans l'ultraviolet, méthodes turbidimétriques, méthodes électrophorétiques, méthodes chromatographiques, méthode immunologiques et par action d'exopeptidases (carboxypeptidase A). Les avantages et les inconvénients de chacune d'elles sont discutés. Leur utilisation en dosage de routine dans l'industrie laitière ou au stade du laboratoire est précisée. Les variantes ou améliorations de chaque méthode, utilisées lors du dosage des protéines du lait sont rapportées de même qu'un certain nombre d'indications (agents de conservation, effet de la saison, de la race, de l'âge ou du stade de lactation...).

Mots clés : Protéines - Lait - Vache - dosage.

Summary

Methods for the quantitative determination of milk proteins

A great number of methods have been used for the determination of milk proteins (total proteins, caseins, whey proteins) : Techniques which necessitate chemical degradation of proteins (Kjeldahl, Dumas, Kofranyi, sialic acid analysis) formaldehyde titration, dye binding, colorimetry, absorption spectrometry in IR and UV range, fluorescence in UV, turbidimetric methods, electrophoretical and chromatographic methods, immunological techniques and action of exopeptidases (carboxypeptidase A). The advantages and drawbacks of each method are discussed. Their use in routine analysis in the dairy industry and laboratory practice is outlined. The modifications and improvements of each method used for milk protein determination are discussed and some indications are given regarding preserving agents, influence of the season, age and stade of lactation.

Key words : Proteins - Milk - Cow - Quantitative determination.

Introduction

Un des objectifs de la biochimie alimentaire est la séparation et la quantification des différents constituants présents dans les aliments. La séparation permet leur identification ultérieure (nature et fonction des constituants) et la quantification permet de déterminer leur teneur relative.

Suivant le but recherché, la quantification des constituants de la matière sèche peut se faire de deux manières différentes.

Dans la première, les groupes de constituants principaux de l'aliment (lipides, protéines, glucides, sels minéraux) peuvent être quantifiés. Ce type de dosage se fait dans les laboratoires de recherche, mais aussi dans les laboratoires de contrôle de l'industrie alimentaire. Dans le cas du lait, la détermination de la teneur en protéines totales se fait par la méthode du Kjeldahl, par fixation de colorant ou par spectrométrie dans l'infrarouge et l'ultraviolet. La méthode par fixation de colorant (principalement le noir amido) et la spectrophotométrie dans l'infrarouge sont les plus utilisées dans les laboratoires de contrôle de l'industrie laitière. Ces méthodes sont le plus souvent automatisées. Ce sont des méthodes de routine car elles sont simples, rapides, peu onéreuses et peuvent être utilisées par du personnel peu spécialisé. Elles permettent le paiement du lait au producteur selon sa teneur en protéines.

Dans la deuxième, chaque constituant de l'aliment est quantifié (chaque protéine, chaque acide gras...). Ce type de dosage se fait principalement dans les laboratoires de recherches. Appliquées au dosage des protéines du lait, les méthodes utilisées permettent de séparer et de quantifier les différentes protéines. Ce sont principalement les méthodes électrophorétiques, chromatographiques, et immunologiques. La possibilité, ou l'impossibilité, de quantifier chaque protéine dépend du pouvoir de séparation et de la sensibilité de la méthode utilisée.

Le but de cette revue est de présenter les principales méthodes utilisées pour le dosage des protéines du lait. Ces méthodes ont été employées pour doser les protéines du lait de différentes espèces. Nous nous sommes principalement intéressés ici au dosage des protéines du lait le plus utilisé dans l'alimentation humaine : le lait de vache.

I. Les protéines du lait

La matière azotée du lait est divisée en deux parties : la matière azotée protéique (correspond à 95 % de l'azote total) et la matière azotée non protéique (NPN). En fonction de leur solubilité à pH 4,6, les protéines du lait peuvent être réparties en deux catégories : les caséines (insolubles à ce pH) et les protéines du lactosérum (solubles à pH 4,6) (ALAIS, 1984).

A. Les caséines ou protéines insolubles à pH 4,6

La caséine entière représente 80 % des protéines du lait de vache. On ne lui connaît pas de fonction biologique autre qu'un rôle nutritif d'apport d'azote et d'acides aminés indispensables. Elle est constituée de 4 caséines (α_{s1} , α_{s2} , β , κ) qui sont synthétisées dans la glande mammaire à partir de 4 gènes de structure différents situés sur le même chromosome (GROSCLAUDE *et al.*, 1972).

Les caséines α_{s1} , α_{s2} et β sont des phosphoprotéines. La caséine κ est une phosphoglycoprotéine. Ces protéines sont hétérogènes. Cette hétérogénéité est due à des teneurs différentes en phosphore pour les caséines α_{s1} et α_{s2} ou en sucre pour la caséine κ (RIBADEAU DUMAS, 1979).

Un groupe de « caséines mineures » (caséines γ) a été mis en évidence dans le lait de vache. Les 3 caséines de ce groupe (γ_1 , γ_2 , γ_3) correspondent aux fragments 29-209, 106-209, 108-209 de la caséine β . Ils proviennent de la protéolyse limitée de la caséine β par la plasmine, enzyme provenant du sang et naturellement présent dans le lait (KAMINOGAWA et YAMAUCHI, 1972). La caséine α_{s1} est hydrolysée par la plasmine en caséine λ (EIGEL, 1977 ; AIMUTIS et EIGEL, 1982). La caséine α_{s2} est également sensible à l'action de cette protéase (SNOEREN et VAN RIEL, 1979).

Dans le lait, les caséines sont présentes sous forme d'agrégats de haut poids moléculaire : les micelles. Ce sont des particules sphériques d'un diamètre moyen d'environ 100 nm, constituées elles-mêmes de sous-unités sphériques, appelées submicelles (diamètre moyen de 15 à 20 nm), qui renferment les 4 caséines sur lesquelles sont fixés des ions calcium. Les submicelles sont « cimentées » entre elles par le « phosphate colloïdal » qui est un complexe phosphate-citrate de calcium et de magnésium amorphe (SCHMIDT, 1982).

La caséine κ stabilise, sous forme de micelles, les autres caséines, normalement insolubles à une teneur en calcium égale à celle du lait. L'action préférentielle de la présure (mélange de protéases extraites de l'estomac du jeune veau nourri au lait, utilisé pour la fabrication fromagère) sur la caséine κ , en hydrolysant la liaison Phe 105 - Met 106, déstabilise les micelles et entraîne la coprécipitation des caséines α_{s1} , α_{s2} et β , et de la para-caséine κ (fragment 1-105 de la caséine κ) qui sont insolubles à la teneur en calcium du lait. Le caséinomacropéptide ou CMP (fragment 106-169 de la caséine κ) reste soluble, ainsi que les protéines du lactosérum.

B. Les protéines du lactosérum ou protéines solubles à pH 4,6

Elles représentent 20 % des protéines du lait de vache. Les 2 protéines majoritaires, en poids, sont la β -lactoglobuline (44 % des protéines du lactosérum) et l' α -lactalbumine (20 %). A côté de ces deux protéines, le lactosérum renferme de très nombreuses autres protéines (BLANC, 1982).

Certaines protéines du lactosérum sont synthétisées dans la glande mammaire (α -lactalbumine, β -lactoglobuline) et d'autres proviennent du sang (sérum albumine, lysozyme,...). Ces protéines ont différents rôles. A titre d'exemple,

la β -lactoglobuline a un rôle nutritionnel. L' α -lactalbumine et la plasmine ont un rôle enzymatique. Les immunoglobulines ont un rôle protecteur. La lactoferrine permet le transport d'ions inorganiques (RIBADEAU-DUMAS, 1979).

Les protéoses peptones représentent une fraction complexe, contenant des fragments de protéines. On y trouve les fragments « 5 lent » (1-105), « 8 lent » (29-107) et « 8 rapide » (1-28) provenant de l'hydrolyse de la caséine β par la plasmine. Ces peptides sont les compléments des caséines γ (ANDREWS, 1979).

L'importance nutritionnelle et la grande diversité des protéines présentes dans le lait expliquent que de nombreuses méthodes de dosage aient été utilisées. Les unes servent à des dosages permettant de repérer et de quantifier un composant particulier. Un certain nombre de ces techniques sont utilisées en routine dans l'industrie alors que d'autres sont utilisées dans les laboratoires de recherches. La grande diversité des techniques utilisées, et la vitesse d'évolution scientifique et technologique de ces techniques, nécessitent d'en faire un bilan périodique. C'est ce que nous avons tenté ici, afin de présenter les grandes lignes des techniques utilisées, sans prétendre à l'exhaustivité. Pour les travaux plus anciens, il est possible de se reporter à la revue de BOSSET *et al.* (1976).

II. Les méthodes de dosage

Les méthodes de dosage des protéines du lait, utilisées en routine ou dans les laboratoires de contrôle de l'industrie laitière, fournissent des résultats qui ne sont pas directement comparables, car obtenus par des techniques différentes. La comparaison des résultats obtenus par différentes méthodes ou d'un laboratoire à l'autre, doit être basée sur une méthode de référence commune dont la précision est bonne. La précision est une notion globale qui comprend la fidélité (répétabilité : fait par le même opérateur, dans le même laboratoire ; reproductibilité : comparaison d'un laboratoire à l'autre), la justesse (comparaison d'une méthode à une méthode de référence) et la sensibilité (GRAPPIN, 1976 c).

Pour le domaine alimentaire, la méthode de référence adoptée est la méthode de Kjeldahl. Elle permet ainsi, dans le cas des méthodes de routine, le paiement du lait à la qualité sur la base d'une référence unique. Pour permettre la conversion des résultats obtenus avec une autre méthode, un grand nombre d'échantillons sont analysés par la méthode de référence (y) et par la méthode utilisée (x). D'après les résultats, une droite de régression d'équation $y = bx + a$ est calculée. Elle donne la relation entre la mesure obtenue par la méthode (x) et la teneur en protéines donnée par la méthode Kjeldahl (y). On compare l'équation obtenue avec la droite théorique d'équation $y = x$. Il faut que la droite obtenue ne diffère pas trop de la droite théorique pour avoir une bonne exactitude du calibrage. Plus le coefficient de corrélation est proche de 1, meilleure est la précision de la méthode employée, par rapport à la méthode de Kjeldahl.

Avec certaines techniques, les différentes fractions azotées du lait (caséines, protéines du lactosérum, NPN) se comportent différemment lors des

dosages. Suivant les différentes fractions azotées du lait obtenues par fractionnement chimique, les méthodes peuvent être étalonnées pour doser la matière azotée totale, les protéines totales, les caséines,... Les méthodes de dosage de routine sont généralement étalonnées pour doser la matière azotée totale et les protéines totales. L'étalonnage fait à partir des protéines totales peut être influencé par la variation du rapport des teneurs en protéines solubles et des caséines. Les variations en fonction de la période ont été étudiées par différents auteurs (HARLAND *et al.*, 1955 ; DELLAMONICA *et al.*, 1965 ; GRAPPIN et JEUNET, 1976 a). Le rapport varie beaucoup avec l'individu, la race et le stade de lactation. La précision du dosage des protéines totales sera plus faible pour les laits individuels que pour les laits de mélange dans lesquels ces variations se compensent partiellement.

L'étalonnage fait à partir de l'azote total peut être influencé par la variation de l'azote non protéique (NPN) en fonction de la période et de l'endroit. Cette fraction varie beaucoup avec l'individu, la race, l'alimentation et le stade de lactation. Il faut donc réétalonner fréquemment ou considérer que cette fraction est en moyenne égale à 5 % (GRAPPIN et JEUNET, 1976 a). Si on ajoute les considérations faites précédemment à propos de la variation de la teneur des différentes fractions protéiques du lait, la précision du dosage de l'azote total est plus faible avec les laits individuels qu'avec les laits de mélange.

A. Méthodes de dosage nécessitant la dégradation par voie chimique des protéines

1. Méthode de Kjeldahl

Cette méthode, qui est la méthode de référence, consiste à effectuer une minéralisation complète des molécules organiques, transformant l'azote présent en ammoniacque qui peut être dosé par différentes techniques.

a) Présentation de la méthode

Les échantillons sont minéralisés en présence d'acide sulfurique concentré et chaud (250° C). Le carbone, l'oxygène et l'hydrogène sont transformés en gaz carbonique et en vapeur d'eau, alors que l'azote reste en solution sous forme de sulfate d'ammonium. L'adjonction d'acide perchlorique ou d'eau oxygénée permet une minéralisation plus poussée (KRAMÉ *et al.*, 1973). Des catalyseurs doivent être rajoutés au milieu réactionnel (Sélénium, sels de mercure ou de cuivre, le sulfate de cuivre est le catalyseur retenu par la FIL). Les sulfates de potassium ou de fer élèvent le point d'ébullition. L'ammoniacque est obtenu par alcalinisation du milieu. Trois techniques permettent de doser cet ammoniacque. Elles nécessitent la constitution d'une courbe d'étalonnage obtenue avec des solutions de concentration connue en sulfate d'ammonium.

— Le titrage

L'ammoniacque est titré par un acide (HCl, H₂SO₄) après entraînement à la vapeur (distillation) et piégeage dans une solution d'acide para-hydroxybenzoïque ou d'acide borique (URBAN, 1971). La diffusion, technique selon laquelle l'ammoniacque se propage dans la solution piégeante placée dans un container, a aussi été utilisée (LIN et RANDOLPH, 1978). L'ammoniacque augmente

le pH de la solution et la quantité d'HCl rajoutée pour revenir au pH initial, détectée par l'utilisation d'un indicateur coloré, est proportionnelle à la quantité d'ammoniaque. Le titrage est une méthode manuelle. Il peut être partiellement (LIN et RANDOLPH, 1978) ou totalement automatisé.

— La colorimétrie

Un certain nombre de réactions colorimétriques permettent de doser l'ammoniaque. Parmi les réactifs utilisés nous avons : HgI_4 (réactif de Nessler), la ninhydrine, le phénol hypochlorite (réaction de Berthelot) (BEECHER et WHITTEN, 1970), le salicylate dichloroisocyanurate (BIETZ, 1974). La sensibilité des réactions de coloration avec ces deux derniers réactifs peut être augmentée par l'adjonction de nitroprussiate (BIETZ, 1974). Il existe une version entièrement automatique de cette méthode qui s'est imposée pour le dosage en flux continu de l'azote (KRAMÉ *et al.*, 1973 ; BIETZ, 1974). Avec cette méthode, la hauteur des pics obtenus est proportionnelle à la quantité d'ions ammonium.

— La potentiométrie

L'introduction dans la solution d'une électrode spécifique de l'ammoniaque permet une mesure directe, une fois l'équilibre atteint. La différence des potentiels d'électrodes entre la solution étudiée et une solution étalon permet, à l'aide d'un facteur adéquat, de déterminer la quantité d'azote (DESCHREIDER et MEAUX, 1973).

b) Application au dosage des protéines du lait

Les différentes fractions azotées du lait peuvent être obtenues par fractionnement chimique. La première méthode de fractionnement a été réalisée par ROWLAND en 1938, et revue par ASCHAFFENBURG et DREWRY en 1959.

L'azote est dosé par la méthode de Kjeldahl dans les différentes fractions. Parmi les méthodes de dosage de l'ammoniaque, le titrage (LIN et RANDOLPH, 1978) et le dosage automatique (KRAMÉ *et al.*, 1973) sont les plus utilisés.

Les diverses protéines lactiques contiennent à peu près toutes la même proportion d'azote (caséine α_{s1} : 15,3 %, caséine α_{s2} : 14 %, caséine β : 15,33 %, caséine κ : 14,5 %, β -lactoglobuline : 15,60 %, α -lactalbumine : 15,86 %). La transformation des résultats en poids de protéine s'obtient en multipliant la quantité d'azote déterminée par un facteur adéquat : on prend la teneur en azote multipliée par 6,38 ce qui correspond à une teneur de 15,67 %. On peut ainsi doser les protéines dans les différentes fractions azotées du lait sauf la fraction non protéique pour laquelle ce coefficient n'est pas valable (CERBULIS et FARRELL, 1975).

c) Problèmes liés à la méthode

Des problèmes sont directement liés aux méthodes de dosage de l'ammoniaque. La distillation avant le titrage nécessite beaucoup d'attention. La diffusion est une technique trop longue (2 h) et les résultats obtenus sont moins élevés qu'avec la méthode par distillation (LIN et RANDOLPH, 1978). En colorimétrie, certains facteurs peuvent avoir une influence sur le développement de la coloration : stabilité du pH, choix des tampons (BEECHER et WHITTEN, 1970) présence de certains ions (KRAMÉ *et al.*, 1973).

Les séparations chimiques ne sont pas parfaites. En particulier, la précipitation à pH 4,6 ne sépare pas parfaitement la caséine entière du lactosérum (YVON *et al.*, 1984 ; BRIGNON *et al.*, 1985). Le coefficient multiplicateur de 6,38 n'est pas parfaitement adapté à toutes les fractions (NPN notamment). Toutes les formes d'azote ne sont pas totalement dosées car certaines structures moléculaires sont difficiles à détruire lors de la minéralisation (indole du tryptophane, imidazole de l'histidine).

Tout ceci soulève le problème de la fidélité de la méthode de Kjeldahl, quand on sait que c'est la méthode de référence pour les autres méthodes de dosage des protéines du lait. Cependant, de récents essais effectués au niveau de la FIL montrent que la méthode est fidèle. De plus, la méthode manuelle est longue et fastidieuse, ce qui empêche l'utilisation de cette méthode en routine pour le paiement du lait à sa teneur protéique.

2. Méthode de Dumas

La méthode de Dumas est également basée sur le dosage de l'azote protéique par minéralisation poussée des protéines. Cette méthode est plus juste que la méthode de Kjeldahl puisqu'elle permet de doser toutes les formes de l'azote, mais elle est très délicate. Elle fonctionne bien sur des poudres homogènes. Les échantillons doivent de plus être d'un volume très réduit et ne pas contenir trop d'eau. Le lait, du fait de la présence des divers constituants (protéines, matière grasse,...) se prête moins bien à cette technique. Elle a été supplantée par la méthode de Kjeldahl comme méthode de référence.

Dans cette méthode, les substances organiques sont brûlées sous atmosphère d'oxygène dans un circuit fermé. L'excédent d'oxygène est fixé à haute température par de la poudre de cuivre. Les produits de la combustion (vapeur d'eau et gaz carbonique) sont absorbés par une solution concentrée de potasse. Les oxydes d'azote sont réduits, à chaud, par du cuivre en azote moléculaire (N_2). La teneur en azote moléculaire est mesurée volumétriquement au moyen d'une burette à gaz (MORRIS *et al.*, 1968), ou par chromatographie en phase gazeuse.

Le coefficient de 6,38 permet la transformation de la quantité d'azote déterminée en poids de protéine. Les considérations faites à propos de la méthode de Kjeldahl (problèmes de fractionnement chimique, du coefficient, de la durée de la méthode) restent valables pour la méthode de Dumas.

Il existe une version automatique de cette méthode, dont les performances (précision, rapidité d'exécution) sont moins élevées que la version automatique de Kjeldahl (WANG et STONE, 1967 ; MORRIS *et al.*, 1968).

3. Digestion alcaline et méthode de Kofranyi

La méthode de Kofranyi repose sur la propriété qu'ont les protéines de libérer une certaine quantité d'ammoniacque, dans un milieu fortement alcalin (NaOH). L'ammoniacque est distillé (10 min), fixé par une solution d'acide borique et titré par HCl. Le mécanisme de la réaction est mal connu. La validité de la méthode est limitée car toutes les protéines ne possèdent pas le même nombre d'acides aminés susceptibles de libérer de l'ammoniacque. Cette méthode a été appliquée au lait (DYDENKOV, 1966). Elle a été utilisée comme

méthode de dosage de routine. Elle a l'inconvénient d'être coûteuse et n'est, semble-t-il, plus utilisée.

La classique hydrolyse alcaline des protéines suivie d'une réaction de coloration à la ninhydrine a été également utilisée (Mc GRATH, 1972).

4. Méthode par dosage des acides sialiques

Cette méthode a été utilisée pour doser la caséine κ (les sucres de la caséine κ contiennent des acides sialiques). La caséine entière, obtenue par précipitation à pH 4,6 est hydrolysée (H_2SO_4 , 80° C, 45 min). L'hydrolysate est oxydé par l'acide périodique et de l'arsenate de sodium est ensuite rajouté. L'addition d'acide 2 thiobarbiturique (Réactif de Warren) développe une couleur rouge. Le chromophore est extrait à la cyclohexanone. L'absorbance à 549 nm est proportionnelle à la quantité d'acides sialiques dans l'échantillon de départ. Cette quantité d'acides sialiques est corrélée à la quantité de caséine κ du lait. Une courbe d'étalonnage est constituée avec des quantités connues d'acides sialiques (MARIER *et al.*, 1963).

Cette méthode ne peut être appliquée au lait entier puisque d'autres composants contiennent des acides sialiques (composant 3 des protéoses peptones) (MARIER *et al.*, 1963). De plus, la caséine κ est composée de 7 fractions (de κ_1 à κ_7) ayant des teneurs différentes en acides sialiques. Le résultat obtenu est donc une teneur globale en sucres de la caséine. Il est peu probable que les différentes fractions de la caséine κ (chacune étant supposée avoir une teneur constante en acides sialiques) soient en proportions constantes. Il est donc inenvisageable de doser en routine chaque composant de la caséine κ avec cette méthode car leur séparation nécessite une chromatographie (ROSE *et al.*, 1969). La caséine entière doit être parfaitement lavée pour éliminer le lactose dont la présence modifie la coloration obtenue (chromophore de couleur orange). Le temps d'hydrolyse doit être parfaitement déterminé. Si ce temps est trop court, tous les acides sialiques ne seront pas libérés. S'il est trop long, une partie des acides sialiques risque d'être dégradée. Une cinétique d'hydrolyse devrait être réalisée avant chaque dosage.

B. Méthode par titrage au formaldéhyde

1. Présentation de la méthode

L'addition de formaldéhyde sur les groupements aminés libres des acides aminés des protéines déplace l'équilibre de dissociation du cation $-\text{NH}_3^+$ avec libération d'un proton. Il va donc y avoir libération d'une quantité de protons titrables et diminution du pH. Cette variation de pH sert de mesure.

2. Application au dosage des protéines du lait

Cette méthode a été utilisée dans l'industrie laitière comme méthode de dosage de routine (ROEPER, 1974). Appliquée au lait, la technique nécessite quelques améliorations comme l'emploi d'oxalate de potassium qui précipite le calcium, ce qui évite aux phosphates de calcium de réagir avec les protons libérés (WOLSCHOON et VARGAS, 1978).

3. Problèmes liés à la méthode

Le mécanisme complet de la réaction avec le formaldéhyde est mal connu (WOLSCHOON et VARGAS, 1977, 1978). La validité de la méthode est limitée car toutes les protéines ne possèdent pas le même nombre de groupements aminés libres. Cette technique n'est plus utilisée comme méthode de dosage de routine.

C. Méthode par fixation de colorant (*Dye binding*)

1. Présentation de la méthode

La méthode consiste à former un complexe coloré insoluble entre un colorant en quantité connue et en excès, et les protéines de l'échantillon. L'excès de colorant non fixé présent dans le surnageant est mesuré spectrométriquement (densité optique à la longueur d'onde d'absorption du colorant) après élimination du précipité par centrifugation ou filtration. Plus la quantité de protéines est grande, plus la densité optique du surnageant est faible. La mesure de la teneur en protéines est indirecte.

Les colorants utilisés sont des acides sulfoniques. Les plus utilisés sont : le Noir Amido 10 B et l'Acide Orange 12. Les groupements sulfoniques des colorants réagissent avec les chaînes latérales des acides aminés basiques (lysine, histidine, arginine), les groupements N-terminaux des protéines, mais aussi avec le colorant déjà lié aux protéines (LAKIN, 1974 ; KROGER *et al.*, 1978). La réaction a lieu en milieu acide (tampon phosphate-citrate de pH 2,45). A ce pH, le complexe résulte d'une interaction ionique directe entre l'anion sulfonate du colorant et l'acide aminé basique. L'étalonnage préalable du système avec des solutions de protéines de concentration connue permet le passage de l'absorbance enregistrée à la concentration en protéines.

2. Application au dosage des protéines du lait

C'est la méthode la plus utilisée pour le dosage de routine des protéines du lait.

Le colorant le plus utilisé est le Noir Amido 10B (GRAPPIN et JEUNET, 1976 a). L'étalonnage est obtenu en utilisant un grand nombre d'échantillons de lait de mélange.

La méthode peut être manuelle (UDY, 1956), partiellement automatisée (GRAPPIN *et al.*, 1980 ; KWAI HANG et HAYES, 1982 ; MC LEAN *et al.*, 1984) ou entièrement automatisée (GRAPPIN et JEUNET, 1971 ; PARK et KING, 1974). La méthode manuelle a recours à la centrifugation ou à la filtration pour séparer le surnageant du précipité. Les appareils ont recours à la filtration sous pression ou possèdent un dialyseur à flux continu.

3. Problèmes liés à la méthode

La filtration est plus utilisée que la centrifugation. Elle est plus rapide et moins onéreuse (coût faible du papier filtre) (SHERBON, 1967), mais l'utilisation du papier filtre absorbe une partie du colorant (ALAIS *et al.*, 1961). L'utilisation de papier en fibre de verre non mouillable permet d'éviter cet inconvénient.

Le Noir Amido se fixe plus aux protéines que l'orangé G (ALAIS *et al.*, 1961 ; ASWORTH, 1966). Le gros problème de ce colorant est sa purification. Deux lots de Noir Amido différents peuvent avoir une absorption différente (ALAIS *et al.*, 1961 ; GRAPPIN et JEUNET, 1976 a). La présence de conservateurs (HgCl_2 , $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) a une influence sur la coloration. Ces conservateurs entrent en compétition de fixation avec le colorant sur les protéines. Leur concentration, la durée de mise en présence avec le colorant lors du dosage, la température de la réaction, augmentent ou diminuent leur influence. Il en ressort, par exemple, que dans des conditions définies, seul HgCl_2 ne modifie pas les mesures avec le Noir Amido dans l'analyse manuelle, et que HgCl_2 et $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ne les modifient pas avec les appareils automatiques (GRAPPIN et JEUNET, 1971 ; KWAI HANG et HAYES, 1982).

De nombreux produits laitiers (glaces,...) possèdent des colorants alimentaires. L'absorption de ces colorants à la longueur d'onde du colorant utilisé, va diminuer les résultats du dosage des protéines. Cette diminution sera d'autant plus importante que la bande d'absorption du colorant alimentaire sera proche de celle du colorant fixé. La méthode au Noir Amido est cependant moins affectée que la méthode à l'orangé G. Il est donc recommandé d'appliquer la méthode sur des produits non colorés (KROGER *et al.*, 1978).

Les protéines du lait fixent différemment le colorant. Ainsi les protéines du lactosérum fixent 1,27 fois plus de colorant que les caséines. La fraction azotée non protéique (NPN) ne fixe pas de colorant (ALAIS *et al.*, 1961 ; GRAPPIN et JEUNET, 1979). Cette différence de fixation par les protéines et la variation de la teneur des différentes fractions du lait (suivant la race, l'individu, l'endroit, la saison, le stade de lactation) peuvent avoir une influence sur l'étalonnage de la méthode et le dosage des protéines (GRAPPIN et JEUNET, 1976 a).

La méthode possède une bonne répétabilité (SHERBON et HEMPHILL, 1976 ; GRAPPIN et JEUNET, 1971 ; GRAPPIN *et al.*, 1980). La reproductibilité de la méthode est très bonne. Il y a de faibles écarts entre les différents laboratoires (LUKE, 1967 ; MICHILAK *et al.*, 1978). Les performances des appareils de dosage sont identiques à celles de la méthode manuelle (SHERBON, 1974 ; PARK et KING, 1974). L'amélioration de la reproductibilité est encore possible grâce à la mise en place d'un étalonnage commun (MICHILAK *et al.*, 1978). Cet étalonnage existe en France. Il est réalisé par un laboratoire central qui analyse un nombre élevé d'échantillons provenant de toute la France. On obtient un étalonnage commun qui est « transféré » à tous les appareils par l'intermédiaire de deux échantillons de lait reconstitués de référence, représentant un lait riche et un lait pauvre en protéines, de teneur connue (GRAPPIN et JEUNET, 1976 a).

D. Méthodes colorimétriques

1. Méthodes recourant à la formation d'un complexe coloré avec certains acides aminés

Les deux méthodes les plus utilisées sont celles de Folin Ciocalteu (FOLIN et CIOCALTEU, 1927) et de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951). Ces méthodes consistent en une réaction d'oxydo-réduction entre un réactif phosphomolybdique phosphotungstique et les acides aminés tyrosine et tryptophane des protéines. Le

développement maximal de la coloration se fait au moyen d'un traitement par une solution alcaline (NaOH) contenant du cuivre (CuSO_4). L'intensité de la couleur développée, mesurée spectrométriquement, est proportionnelle à la concentration en protéines. Le passage de l'absorbance mesurée à une concentration en protéines se fait par étalonnage avec des échantillons de concentration connue.

Ces méthodes ont l'avantage d'être très sensibles. Elles sont utilisées quand les quantités de protéines de l'échantillon sont extrêmement faibles. Cet avantage ne se justifie pas dans le cas du lait où les quantités de protéines des différentes fractions sont largement suffisantes. De plus, ces méthodes ont des défauts : coloration peu stable, mécanisme de réaction mal connu, dépendance étroite avec la composition en acides aminés des chaînes polypeptidiques, mauvaise corrélation avec la méthode de Kjeldahl (BROWN *et al.*, 1983). Ces diverses raisons expliquent le peu de retentissement de ces méthodes appliquées au dosage des protéines du lait (BROWN *et al.*, 1983) et leur limitation à des déterminations semi-quantitatives (CHURCH *et al.*, 1983).

2. Méthodes recourant à la formation de complexes colorés avec les liaisons peptidiques

a) Méthodes du Biuret

La plus classique de ces méthodes est la méthode de Biuret. La méthode consiste en une réaction entre la liaison peptidique des protéines et un métal de transition (Cu, Ni...) pour former un complexe stable et coloré. Cette méthode présente un intérêt plus grand pour une détermination quantitative puisqu'elle fait appel à une caractéristique commune à toutes les protéines. Son application au dosage des protéines du lait a fait l'objet de peu de travaux. La méthode est affectée par la teneur en azote non protéique et en matière grasse du lait. La corrélation avec la méthode de Kjeldahl n'est pas très bonne (BROWN *et al.*, 1983). La méthode a surtout été utilisée, couplée à un compteur à scintillation.

b) Couplage à un compteur à scintillation

Cette méthode est basée sur la diminution (quenching) de l'émission photonique indirecte d'une source radioactive constante, placée dans un liquide de scintillation, lorsqu'elle est mise en présence d'une solution colorée. Cette diminution se traduit par une baisse du nombre de coups enregistrés par un compteur à scintillation, dans lequel nous avons deux cuves scellées. Une cuve possède la solution radioactive mélangée à un liquide de scintillation, l'autre cuve possède en plus de ces deux éléments, la solution colorée. L'appareil enregistre la différence du nombre de coups entre les deux cuves qui est proportionnelle à la concentration du complexe coloré (NOBLE *et al.*, 1979).

Le liquide de scintillation est une solution organique qui transmet l'énergie radioactive via l'émission photonique. Deux types de sources de radioactivité connue sont utilisées : le cholestérol¹⁴C et l'acide palmitique³H.

Cette méthode a été appliquée au lait (NOBLE et SCHAND, 1980 ; NOBLE *et al.*, 1981). Elle permet la détermination quantitative des protéines du lait, mais aussi de la matière grasse et du lactose. Les protéines sont sous forme

d'un complexe coloré obtenu par la méthode de Biuret. La décroissance du nombre de coups de l'acide palmitique³H est utilisé pour le dosage des protéines. L'étalonnage permet de transformer le nombre de coups enregistrés en concentration de protéines. Pour le dosage des protéines, l'élimination de la matière grasse est nécessaire pour éviter l'absorption de l'émission photo-nique.

La méthode possède une très bonne répétabilité et une très bonne précision. Elle a l'avantage de posséder un étalon stable (source radioactive) et la possibilité de détecter, comme toute méthode radioactive, des quantités extrêmement faibles. Les désavantages de la méthode sont principalement : l'utilisation d'isotopes, le problème du bruit de fond dans les mesures, les limites de la méthode du Biuret lorsqu'elle est appliquée au lait et le temps de manipulation qui est plus long que celui des méthodes spectrométriques.

E. Méthodes spectrométriques par absorption et par fluorescence

Ces méthodes ont longtemps été utilisées pour l'analyse qualitative avant de passer dans le domaine de l'analyse quantitative. Ce sont des méthodes de dosage de routine. Ces méthodes possèdent le grand avantage (sauf dans des cas isolés : fluorescence) de mesurer une propriété intrinsèque des protéines et non un produit de réaction avec ces dernières.

1. Méthode spectrométrique par absorption dans l'infrarouge

a) Présentation de la méthode

La plupart des produits organiques possède une absorption dans l'infrarouge qui se traduit par un accroissement de l'énergie vibrationnelle de la molécule (vibrations de valence et de déformation). On obtient un spectre constitué de nombreux pics d'absorption, correspondant aux divers groupements d'atomes de la molécule. Chaque groupe d'atomes possède une absorption caractéristique à une longueur d'onde donnée. On exprime la longueur d'onde en nm mais on utilise surtout, pour l'infrarouge, le nombre d'onde λ^{-1} en cm^{-1} pour mesurer l'emplacement d'un pic. L'infrarouge s'étend de 4 000 à 600 cm^{-1} . Pour doser les protéines, on met à profit le pic d'absorption de la liaison peptidique à 1 548 cm^{-1} . L'intensité du pic suit la loi de Beer Lambert ($D_0 = \epsilon lc$). La hauteur du pic est donc proportionnelle à la concentration de l'échantillon en protéines. L'étalonnage permet le passage de l'absorbance à une concentration de protéines.

b) Application au dosage des protéines du lait

Un certain nombre d'appareils ont été conçus pour l'application de la méthode au lait (GOULDEN, 1964 ; ADDA *et al.*, 1967, 1968 ; BIGGS, 1967, 1972 a et b, 1978, 1979 ; GRAPPIN et JEUNET, 1976 b ; GRAPPIN *et al.*, 1980 ; JOHNSTON, 1982). Ces appareils permettent de doser la matière grasse, le lactose et les protéines du lait. Il suffit de mesurer l'intensité des pics d'absorption à trois emplacements du spectre bien déterminés : matière grasse (1745 cm^{-1}), pro-

téines (1548 cm^{-1}), lactose (1042 cm^{-1}). Les mesures sont simples et rapides (de 100 à 300 mesures par heure suivant l'appareil).

c) Problèmes liés à la méthode

Les deux gros problèmes technologiques qu'il a fallu résoudre sont la forte teneur du lait en eau et l'hétérogénéité des globules gras.

L'eau dissout les matériaux utilisés en spectrométrie infrarouge (halogénures de métaux alcalins). Les cuves de mesure ont donc été faites en un matériau très peu soluble. L'eau absorbe une grande quantité d'énergie dans le domaine situé entre 1000 et 5000 cm^{-1} . Les bandes d'absorption de l'eau sont si intenses qu'il est impossible de distinguer les bandes d'absorption des autres composants (GOULDEN, 1964 ; ADDA *et al.*, 1967, 1968). Pour annuler cette absorption, certains appareils travaillent selon le principe du double faisceau. Une absorption constante due à l'eau est soustraite grâce à une cuve de référence pleine d'eau (GOULDEN, 1964 ; ADDA *et al.*, 1967, 1968). D'autres appareils possèdent un système d'analyse à double faisceau en longueur d'onde. Dans ce système, une longueur d'onde (faisceau de mesure) correspond au pic d'absorption du composé à mesurer et l'autre est une longueur d'onde voisine pour laquelle l'absorption du composé est faible (faisceau de référence). L'appareil mesure la différence d'énergie absorbée par le lait (cuve unique) à chacune des deux longueurs d'onde et l'absorption due à l'eau est ainsi soustraite (GRAPPIN et JEUNET, 1976 b ; BIGGS, 1979).

La diffusion de la lumière dépend du rapport entre le diamètre des particules et la longueur d'onde. Or, certains globules gras sont du même ordre de grandeur que les longueurs d'onde utilisées. Il y a alors diffusion de la lumière et atténuation du pic d'absorption. Il faut donc réduire le diamètre des globules gras (moins de $2 \mu\text{m}$), à l'aide d'homogénéisateurs, et choisir les bandes d'absorption des composés dans le domaine des grandes longueurs d'onde (donc des petites fréquences). Ainsi, pour la matière grasse, la lecture se fait à 1745 cm^{-1} et non à 2898 cm^{-1} (GOULDEN, 1964 ; GRAPPIN et JEUNET, 1976 b). La diffusion due aux micelles de caséines (moins de $0,1 \mu$) est négligeable aux longueurs d'onde utilisées (GOULDEN, 1964).

Les longueurs d'onde sont sélectionnées pour éviter les interférences entre les composés. Il existe cependant une interférence due à la matière grasse à la longueur d'onde des protéines. Une procédure correcte est de corriger la teneur en protéines avec l'aide de la teneur en matière grasse, préalablement déterminée. L'interférence due au lactose, à cette même longueur d'onde, peut être négligée (GOULDEN, 1964). Il est cependant préférable d'utiliser des facteurs de correction pour toutes les longueurs d'ondes.

Les différents appareils possèdent une précision et une répétabilité identiques. Elles sont identiques à celles obtenues pour la méthode par fixation de colorant, lorsque l'étalonnage de l'appareil est soigneusement contrôlé par les utilisateurs (GRAPPIN et JEUNET, 1976 b ; GRAPPIN *et al.*, 1980). Cette méthode possède, elle aussi, une meilleure précision dans le cas des laits de mélange que dans le cas des laits individuels (GRAPPIN et JEUNET, 1976 a). L'explication des variations observées avec la méthode infrarouge n'est

pas parfaitement déterminée (GRAPPIN et JEUNET, 1976 a). Les variations de la teneur du lait en citrate seraient le principal responsable des écarts observés.

La reproductibilité de la méthode est bonne entre laboratoires (BIGGS, 1978). La mise en place d'un étalonnage commun des appareils, comme pour la méthode par fixation de colorant, a considérablement amélioré la reproductibilité des mesures.

Nous assistons actuellement, au développement des techniques de mesure dans le proche infrarouge. Ces techniques sont rapides et précises (EGLI et MEYHACK, 1984). Elles commencent à se développer dans le domaine laitier, mais peu de publications existent encore sur cette méthode.

2. Méthode spectrométrique par absorption dans l'ultraviolet

Cette méthode de dosage repose sur la propriété qu'ont les acides aminés aromatiques (tyrosine, tryptophane et, dans une moindre mesure, phénylalanine) d'absorber de la lumière dans l'ultraviolet. La méthode nécessite un spectrophotomètre sensible.

Cette méthode a été appliquée pour le dosage des protéines du lait. Elle a souvent été utilisée pour doser la teneur en protéines et en matière grasse du lait. L'intensité du pic d'absorption à 280 nm est proportionnelle à la teneur en protéines.

La méthode présente de nombreux problèmes. Les diverses protéines ont des teneurs différentes en acides aminés aromatiques. L'absorption U.V. des protéines est donc différente, ce qui entraîne une mauvaise corrélation avec la méthode de Kjeldahl, principalement pour les laits individuels (HUDSON et LUCAS, 1983).

La spécificité de la méthode est limitée par l'absorption d'autres composants comme les acides nucléiques.

L'échantillon de lait ne peut être utilisé tel quel à cause de son extrême turbidité. L'échantillon doit être fortement dilué. Les globules gras et les micelles de caséines diffusent la lumière aux longueurs d'onde utilisées. Plusieurs techniques ont été proposées pour les éliminer. Certains auteurs ajoutent à l'échantillon de la butylamine pour éliminer les globules gras et de l'EDTA (avec du lauryl sulfate de sodium) pour dissoudre les micelles de caséines. L'échantillon est filtré, puis on mesure la densité optique à 280 nm dans le filtrat (NAKAI *et al.*, 1964). D'autres ont recours à la dissolution intégrale des protéines et de la matière grasse de l'échantillon avec de l'acide acétique glacial à 97 %. La solution obtenue est claire et incolore. Cette technique permet la mesure correcte de l'absorbance des protéines à 280 nm. En rajoutant au milieu, un mélange d'urée et d'imidazole, la teneur en matière grasse peut être déterminée par simple mesure à 400 nm (NAKAI et CHILE, 1970). D'autres auteurs recourent à une cellule photoélectrique à géométrie particulière et équipée d'un dispositif permettant de compenser dans une certaine mesure cette diffusion lumineuse (IWAIDA *et al.*, 1967).

3. Méthode photométrique par fluorescence dans l'ultraviolet

Lorsqu'une molécule aromatique reçoit de l'énergie (lumineuse ou thermique), il y a transition d'un électron de l'orbitale électronique la plus basse

(état fondamental : S_0) vers l'orbitale électronique plus élevée (état excité). Lorsque la molécule se désactive, l'électron revient à son état fondamental et il y a émission d'une radiation lumineuse (photoluminescence). La fluorescence est due au retour de l'électron du premier état singulet (S_1) vers l'état fondamental (S_0). L'intensité de la fluorescence est enregistrée par un fluorimètre. 2 types de méthodes fluorimétriques ont été utilisées pour doser les protéines. Une de ces méthodes utilise la propriété qu'ont les acides aminés aromatiques des protéines (tyrosine, tryptophane) d'absorber de l'énergie lumineuse à 278 nm et de la réémettre sous forme de fluorescence à 340 nm. L'autre méthode consiste en l'utilisation de fluorophores (molécules organiques émettant de la fluorescence à une longueur d'onde donnée, qui se fixent sur les protéines). Dans les deux méthodes, l'intensité de la fluorescence est proportionnelle à la concentration en protéines. Ces deux types de méthode ont été appliqués au lait. Un étalonnage préalable permet de transformer l'intensité de fluorescence en concentration de protéines.

a) *Méthode photométrique par fluorescence sans utilisation de fluorophores*

Cette méthode a été appliquée pour doser les protéines du lait (Fox *et al.*, 1963 ; PORTER, 1965). Plusieurs facteurs peuvent influencer les mesures de fluorescence. Contrairement à la méthode spectrométrique dans l'ultraviolet, la matière grasse n'a aucune influence sur les mesures. Les micelles de caséines doivent cependant être dissoutes (tampon phosphate citrate urée) car leur présence augmente l'intensité de la fluorescence (Fox *et al.*, 1963). L'échantillon doit aussi être dilué. La température doit être fixe. Une augmentation de la température est à l'origine d'une diminution de la fluorescence. Le pH doit être fixe (pH 6,8) pour éviter l'agrégation des protéines entraînant une augmentation de la fluorescence. Certains ions (Ca^{++}) et certaines molécules organiques peuvent diminuer l'intensité de la fluorescence. Les ions métalliques peuvent être éliminés par des chélateurs de métaux (citrate d'ammonium qui piège le Ca^{++} ...) (Fox *et al.*, 1963).

Comme la méthode spectrométrique dans l'ultraviolet, la méthode dépend du nombre d'acides aminés aromatiques des différentes protéines, ce qui entraîne une mauvaise corrélation avec la méthode de Kjeldahl, principalement dans le cas des laits individuels. La limitation de la précision de la méthode et le nombre important de précautions à prendre, font que cette méthode fluorimétrique est peu utilisée pour le dosage quantitatif des protéines du lait (Fox *et al.*, 1963).

b) *Méthode photométrique par fluorescence avec utilisation de fluorophores*

Les fluorophores qui ont été utilisés pour le dosage quantitatif des protéines du lait sont l'o-phthaldialdéhyde et la fluorescamine. L'intensité de fluorescence se mesure à 340 nm et à 480 nm, respectivement (BEEBY, 1980 ; CHURCH *et al.*, 1983).

L'o-phthaldialdéhyde (OPA) réagit avec le groupement α aminés libres des protéines et avec le groupement ϵ aminé de la lysine en présence de 2-mercaptoéthanol, pour donner un groupement fluorescent (CHURCH *et al.*, 1983). La fluorescamine est un fluorophore intéressant car il ne réagit qu'avec

les groupements α aminés des protéines à pH 6 (BEEBY, 1980). Cette méthode est donc plus précise que la première (OPA), qui est limitée par la teneur différente en lysine des diverses protéines.

F. Méthodes turbidimétriques

Deux méthodes de dosage de la teneur des protéines du lait (spectrométrique et néphélométrique), basées sur la turbidité de ces protéines dans certaines conditions, sont utilisées pour le dosage des protéines du lait.

1. Méthode spectrométrique

Cette méthode a été utilisée pour la détermination de la quantité des caséines α_s , β et κ du lait (TESSIER *et al.*, 1963). Beaucoup d'observations ont montré que le degré d'agrégation des caséines α_s , β et κ sous forme de micelle est influencé par la température. Les teneurs en caséines β et κ affectent la turbidité. La relation entre la somme des deux caséines ($\beta + \kappa$) et le changement de turbidité de la solution avec la température, permet de déterminer les quantités de ces différentes caséines. La méthode consiste à mélanger une quantité de caséine entière (obtenue par précipitation à pH 4,6) avec un tampon imidazole contenant du calcium. La différence des densités optiques à 400 nm de la solution, mesurées à 0° C et à 35° C est proportionnelle à la quantité de caséine β plus de caséine κ . Cette quantité est déterminée grâce à la constitution d'une courbe étalon obtenue avec des quantités de caséine β et caséine κ connues. La méthode de dosage des acides sialiques permet de déterminer la quantité de caséine κ . Connaissant la quantité de caséine totale déterminée préalablement, les quantités de caséine α_s , β et κ sont obtenues par différence. Les quantités de Ca^{++} et de caséine entière, le pH de la solution (entre 6 et 8) sont choisis de façon à avoir une augmentation de la turbidité maximale entre 0° C et 35° C. Cette méthode nécessite beaucoup de précautions. La détermination de la teneur en caséine β est limitée par la présence de caséines γ dont la teneur n'est pas déterminée par cette méthode.

2. Méthode néphélométrique

La néphélométrie est la mesure de la lumière dispersée par des particules (colloïde). Un faisceau lumineux monochromatique de grande intensité est émis. Le cône de lumière est recueilli après focalisation sur un photodétecteur et le signal électrique, mesuré en volts, est directement proportionnel à la turbidité de la solution. Le néphélomètre est l'appareil responsable de toutes ces opérations. Cette méthode a été appliquée pour doser les protéines et la matière grasse du lait (BEITZ *et al.*, 1977). L'appareil est étalonné pour 0 et 100 % de turbidité par une solution de formazine. L'établissement, par étalonnage, d'une droite de régression permet de transformer le pourcentage de turbidité donné par l'appareil en concentration de protéines. Les protéines du lait forment une solution colloïdale par réaction avec un mélange d'acide acétique glacial, d'anhydride acétique, et d'acide para-toluène sulfonique. La mesure turbidimétrique est alors effectuée. Le colloïde de protéines est ensuite

dissous. Il peut alors y avoir agrégation de la matière grasse (émulsion), dont la mesure turbidimétrique peut aussi être effectuée.

La méthode est simple, rapide, peu onéreuse. Elle jouit d'une bonne répétabilité et d'une bonne précision. Elle possède tous les critères d'une méthode de dosage de routine, mais elle a été peu utilisée.

G. Méthodes électrophorétiques

1. Présentation de la méthode

L'électrophorèse est la migration de molécules chargées, en solution, sous l'action d'un champ électrique. Les protéines, qui comportent des groupes chargés positivement ou négativement, possèdent une charge globale non nulle sauf à leur pH iso-électrique, pH auquel ces charges se compensent exactement. Si l'on place une protéine dans un champ électrique, elle va donc migrer selon sa charge globale nette et sa taille moléculaire soit vers l'anode soit vers la cathode, et d'autant plus vite que cette charge est élevée. La migration se fait sur des supports variés : gels, principalement d'amidon, de polyacrylamide, d'agarose ou de polyacrylamide agarose ; ou, moins fréquemment pour les protéines, papier, acétate de cellulose. Les gels d'électrophorèse peuvent être moulés entre deux plaques de verre ou dans des tubes. Les gels peuvent avoir des porosités différentes suivant leur concentration en polyacrylamide. Plus la porosité du gel est faible (pourcentage d'acrylamide élevé), plus la migration des protéines de poids moléculaire élevé est ralentie. On peut modifier la charge nette de la protéine suivant le tampon d'électrophorèse. Avec un tampon de pH 8,6, les protéines majeures du lait ont une charge nette négative et migrent alors vers l'anode. On utilise généralement un tampon Tris contenant de l'urée (rupture des liaisons hydrogènes) et du 2-mercaptoéthanol (rupture des ponts disulfures) de manière à obtenir une parfaite dissociation des différentes protéines. Les échantillons sont mis en solution dans le tampon, à une concentration finale connue, avant d'être déposés sur le gel.

Le gros avantage de la méthode électrophorétique est de permettre à la fois de séparer et de quantifier les différentes protéines d'un mélange. La quantification des protéines nécessite leur coloration par le bleu de Coomassie ou le Noir amido. La coloration est ensuite enregistrée à l'aide d'un densitomètre à la longueur d'onde correspondant à l'absorption du colorant. Un tracé densitométrique est obtenu et la quantité de chaque protéine est proportionnelle à la surface de chaque pic. Cette méthode nécessite la constitution d'une gamme étalon obtenue avec une quantité connue de chacune des protéines.

2. Application au dosage des protéines du lait

Les différentes techniques électrophorétiques mentionnées précédemment, ont été appliquées au dosage quantitatif des caséines et des protéines du lactosérum. L'électrophorèse sur papier (BORTREE *et al.*, 1962 ; SHAH et MORSE, 1964), l'électrophorèse sur gel en plaque (HAENLEIN *et al.*, 1973 ; RANDOLPH *et al.*,

1974 ; KWAI-HANG et KROEKER, 1984 ; Mc LEAN *et al.*, 1982, 1984 ; BASCH *et al.*, 1985) et sur gel en tube (DILL *et al.*, 1972 ; NAGASAWA *et al.*, 1972, 1973).

3. Problèmes liés à la méthode

La préparation du gel (polymérisation, moulage et démoulage, équilibrage dans un tampon) dure plusieurs heures. La migration électrophorétique ainsi que la coloration durent 2 à 3 h. L'électrophorèse est une technique longue. Elle ne peut donc pas être utilisée comme méthode de dosage de routine des protéines du lait. L'électrophorèse sur gel d'acétate de cellulose est rapide (15 min) mais n'a pas été appliquée au dosage quantitatif des protéines du lait.

Lors d'une électrophorèse sur gel en tube, les échantillons de la gamme étalon, contrairement à l'électrophorèse en plaque, sont placés dans des tubes différents. La précision du dosage peut être limitée par la différence de porosité des gels.

La coloration de certaines protéines présentes en trop faible quantité est difficile malgré la sensibilité des colorants (cas des caséines α_{s2}). Les différentes protéines ne fixent pas la même quantité de colorant. L'étalonnage doit donc être fait avec des protéines pures.

H. Méthodes chromatographiques

Comme l'électrophorèse, les méthodes chromatographiques permettent la séparation et la quantification des différentes protéines d'un mélange. La chromatographie sur DEAE cellulose, sur hydroxyapatite et par filtration sur gel sont des méthodes longues, pouvant difficilement être utilisées pour des dosages de routine. Le développement des techniques chromatographiques rapides comme la FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) et la HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) suscitent dans ce domaine de nombreux espoirs (abaissement des temps d'analyse, sensibilité accrue).

1. Chromatographie sur DEAE cellulose

Cette méthode consiste à fixer les protéines par l'intermédiaire de leurs charges négatives, sur les charges positives de la colonne de DEAE cellulose (interactions électrostatiques). Comme en électrophorèse, le tampon utilisé (tampon imidazole de pH 7) contient de l'urée et du 2-mercaptoéthanol permettant une bonne séparation des protéines. Certains auteurs (ROSE *et al.*, 1969 ; DAVIES et LAW, 1977 a) rajoutent de l'iodacétamide. L'iodacétamide permet l'alkylation des fonctions thiols des cystéines, évitant ainsi leur réassociation ultérieure. Une fois fixées sur la colonne, les différentes protéines sont éluées, par le même tampon, mais de concentration croissante en NaCl. Plus la charge nette de la protéine est négative, plus la concentration de NaCl nécessaire pour l'élué est élevée. L'absorbance à 280 nm est mesurée pour obtenir un profil d'élué dans lequel chaque pic a été identifié par électrophorèse lors de la mise au point de la technique. Si le pic correspond à une seule protéine, l'aire de ce pic est proportionnelle à sa concentration. Connaissant l' ϵ molaire de chaque protéine, leur concentration peut être obtenue directe-

ment à partir du profil d'éluéon par application de la loi de Beer Lambert ($D_0 = \epsilon_{280}cl$) (ROSE *et al.*, 1969) ou après coloration des différentes fractions éluées par la méthode de Biuret et mesure de la densité optique à 310 nm (DAVIES et LAW, 1977 a).

Cette méthode a été appliquée pour le dosage des caséines (MERCIER *et al.*, 1968 ; ROSE *et al.*, 1969 ; DAVIES et LAW, 1977 a, b, 1980). 5 fractions sont obtenues par ordre d'éluéon : les caséines γ , les caséines κ , la caséine β , les caséines α_{s2} (α_{s2} , α_{s1} , α_{s3} et α_{s2}) et les caséines α_{s1} . Les résultats obtenus montrent une bonne répétabilité de la méthode. La précision des dosages est limitée pour certaines fractions. Les protéoses peptones sont éluées avec les caséines α_s (ROSE *et al.*, 1969). Le dosage des caséines κ fournit une surestimation de leur teneur, due à la contamination de cette fraction par des protéines non identifiées (DAVIES et LAW, 1977 a, b, 1980).

2. Chromatographie sur hydroxyapatite

Cette méthode consiste en l'adsorption, par l'hydroxyapatite, des protéines par l'intermédiaire de leurs charges négatives. Le tampon utilisé est un tampon phosphate de pH 6,8 contenant du dithiothréitol et de l'urée. Plus la charge nette de la protéine est négative, plus elle est retenue lors de l'éluéon qui se fait avec le tampon phosphate à des concentrations croissantes en phosphate. Un profil d'éluéon est obtenu par mesure de l'absorption de l'éluat à 280 nm. Une électrophorèse permet, là aussi, d'identifier les différents pics. Connaissant l' ϵ molaire de chaque protéine, leur concentration est obtenue directement par application de la loi de Beer Lambert ($D_0 = \epsilon_{280} cl$) (BARRY et DONNELLY, 1979, 1980).

Cette méthode a été appliquée pour le dosage des caséines (ADDEO *et al.*, 1977 ; DONNELLY, 1977 ; BARRY et DONNELLY, 1977, 1980), et pour le dosage des protéines du lait écrémé (BARRY et DONNELLY, 1979). La caséine entière est éluée en 4 fractions : les caséines γ , les caséines κ , la caséine β et les caséines α_s . Contrairement à la chromatographie sur DEAE cellulose, cette méthode ne permet pas de séparer les caséines α_s en deux fractions. La précision est limitée par la contamination de la fraction de la caséine β par les caséines α_s . La fraction contenant les caséines α_s est contaminée par la caséine β et des composés mineurs (protéoses peptones) (DONNELLY, 1977). Le profil d'éluéon obtenu avec le lait écrémé donne aussi 4 fractions. Les caséines κ sont éluées avec les protéines majoritaires du lactosérum (α -lactalbumine, β -lactoglobuline, sérum albumine). L'impossibilité de les séparer empêche leur quantification.

3. Chromatographie par filtration sur gel

Le principe de la filtration sur gel est basé sur les capacités différentes des protéines à pénétrer dans les pores de la phase stationnaire (gel). La taille des pores du gel limite un domaine de fractionnement. Les protéines ayant une taille moléculaire supérieure à la taille des pores sont totalement exclues du gel qu'elles traversent rapidement. Elles sont éluées dans un volume appelé volume mort. Les protéines ayant une taille moléculaire inférieure, entrent dans les pores du gel et parcourent un chemin d'autant plus long que

leur poids moléculaire est petit. Les protéines sont donc éluées dans l'ordre des masses moléculaires décroissantes. Un profil d'éluion est obtenu par mesure de l'absorbance de l'éluat à 280 nm. Une électrophorèse permet l'attribution de chaque pic du profil aux différentes protéines.

Cette méthode a été appliquée pour le dosage des protéines du lactosérum (DAVIES et LAW, 1980). L'éluion se fait avec un tampon phosphate de pH 6,8. Ces auteurs ont quantifié les protéines après coloration des fractions éluées par la méthode du Biuret et mesure de la densité optique. Seules la β -lactoglobuline, l' α -lactalbumine, le sérum albumine et la lactoferrine ont pu être dosées.

Cette méthode possède des limites. Les protéines du lactosérum sont obtenues par filtration après précipitation des caséines à pH 4,6. La quantité d' α -lactalbumine et de β -lactoglobuline qui précipite avec la caséine n'est pas dosée (YVON *et al.*, 1984). La β -lactoglobuline est cependant surestimée par suite de la contamination de cette fraction par le composant 5 des protéoses peptones.

4. Chromatographie rapide

a) FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*)

Dans le cas du lait, cette méthode consiste à séparer les différentes protéines d'un mélange sur une colonne échangeuse d'anions. Le principe et les limites de la méthode sont identiques à ceux de la chromatographie « classique » sur DEAE cellulose. Le gros avantage de cette méthode est que la séparation des différentes protéines est très rapide. La séparation des caséines du lait dure 30 min au lieu de plusieurs heures (HUMPHREY et NEWSOME, 1984 ; BARREFORS *et al.*, 1985).

b) HPLC (*High Pressure Liquid Chromatography*)

En HPLC, on peut distinguer suivant la polarité de la phase stationnaire, deux modes de travail : phase normale et phase inverse.

En phase normale, la phase stationnaire est polaire. Les composés sont donc élués par ordre de polarité croissante. Cette phase n'est pas utilisée pour la séparation des protéines.

En phase inverse, la phase stationnaire est apolaire (colonne de silice possédant des groupements alkyle de longueur variable). Cette phase est utilisée pour la séparation, en fonction principalement de leur hydrophobicité, et la quantification des protéines d'un mélange. Les protéines sont éluées par ordre de polarité décroissante par un gradient de concentration en solvant organique. On obtient un profil d'éluion par mesure de l'absorbance à 280 nm de l'éluat. L'identification des différents pics de protéine se fait par injection des protéines pures. Si leur concentration est connue, on peut déterminer l' ϵ molaire des différentes protéines, ce qui permet de calculer directement, à partir du profil d'éluion, la concentration inconnue des différentes protéines. Cette méthode a été utilisée pour le dosage des protéines du lait ; seules quelques protéines du lactosérum (α -lactalbumine, β -lactoglobuline, sérum albumine) ont été dosées (PEARCE, 1983). La méthode est très sensible et le temps d'analyse est de 30 min.

I. Méthodes immunologiques

1. Principe des dosages immunologiques

Un antigène (protéine ou autre macromolécule) et des anticorps (protéines) dirigés contre celui-ci sont susceptibles de s'unir spécifiquement dans des conditions déterminées en formant un précipité. La réaction antigène (AG) + anticorps (AC) \longleftrightarrow AG-AC est un équilibre tel qu'il y a dissociation du précipité (AG-AC) en excès d'anticorps ou d'antigènes. Elle est à la base des techniques immunologiques.

Un antigène purifié injecté dans un organisme provoque de la part de celui-ci, la synthèse d'anticorps spécifiques. L'immunsérum monospécifique obtenu est utilisé dans les méthodes d'immunologie quantitative. Le problème est donc de préparer des antigènes suffisamment purs permettant d'obtenir des immunséras monospécifiques. La vérification de la pureté de l'antigène avant injection dans l'animal se fait à l'aide d'anticorps polyspécifiques, dirigés contre toutes les protéines susceptibles de contaminer la préparation. Ces méthodes nécessitent le titrage du sérum. On détermine ainsi la quantité minimale de sérum nécessaire pour obtenir des résultats exploitables. Avec ces méthodes aucun traitement préalable de la solution d'antigène n'est nécessaire, en général, si ce n'est une dilution.

Un courbe étalon est obtenue en utilisant différentes concentrations de l'antigène à doser. La plupart de ces méthodes sont trop longues et trop lourdes pour pouvoir être utilisées comme méthodes de dosage de routine des protéines du lait.

2. Méthodes immunologiques en milieu gélose

On a ici recours à la constitution d'un gel (Agarose) auquel est mélangé le sérum monospécifique de concentration connue et préalablement titré. La formation du précipité AG-AC est révélée par coloration (Bleu de Coomassie, Noir Amido). L'ensemble de ces méthodes possède une très bonne répétabilité et elles sont très sensibles (détection de quantités de l'ordre du ng) (BABAJIMOPOULOS et MIKOLAJCIK, 1977).

a) Immunodiffusion simple (Méthode d'Oudin)

Le gel obtenu est coulé dans des tubes verticaux. Une solution contenant l'antigène à doser est déposée à sa surface. Cet antigène va migrer (72 h) par diffusion dans le gel jusqu'à ce qu'il y ait formation du précipité. Plus la quantité d'antigène est grande, plus la distance entre le précipité et la surface du gel est grande. Cette distance est proportionnelle à la quantité d'antigène. Cette méthode a été appliquée pour le dosage de la sérum albumine et de la β -lactoglobuline (BABAJIMOPOULOS et MIKOLAJCIK, 1977), de l' α -lactalbumine et de la β -lactoglobuline (Mc LEAN *et al.*, 1984). Les principaux problèmes de la méthode sont : l'utilisation de plusieurs tubes dont les gels peuvent avoir des porosités différentes. Certaines distances de migration sont trop petites et peuvent entraîner des erreurs de mesure.

b) Immunodiffusion radiale (Méthode de Mancini)

Dans cette méthode (MANCINI *et al.*, 1965), les solutions d'antigène sont placées dans des puits creusés dans un gel horizontal. La migration se fait

donc sur le même support. La migration de l'antigène par diffusion radiale dans le gel va créer un halo de précipitation : plus la quantité d'antigène est grande, plus la surface du halo de précipitation est grande. Cette surface est proportionnelle à la quantité d'antigène. La méthode a été appliquée pour doser la sérum albumine et la β -lactoglobuline du lait (BABAJIMOPOULOS et MIKOLAJCIK, 1977), l' α -lactalbumine (FORSUM, 1976), les immunoglobulines G (LEBRETON *et al.*, 1981 ; JOISEL *et al.*, 1981). Cette méthode est la plus longue de toutes (plusieurs jours). Les erreurs de mesure de la surface des halos sont minimisées par l'utilisation d'un appareil lecteur agrandisseur.

c) *Electroimmunodiffusion (Méthode de Laurell)*

La grande différence de cette méthode (LAURELL, 1966), avec la méthode de Mancini, est que l'antigène va migrer sous l'action d'un champ électrique. Il va y avoir formation d'un cône de précipitation (appelé aussi « roquette ») dont la hauteur est proportionnelle à la quantité d'antigène. Plus la quantité d'antigène est grande, plus la hauteur du cône de précipitation est grande. Cette méthode a été appliquée au dosage de la caséine K dans les mélanges protéiques complexes (DRIOU *et al.*, 1985), de la sérum albumine (BABAJIMOPOULOS et MIKOLAJCIK, 1977 ; SMITH *et al.*, 1979), de la β -lactoglobuline du lait (BABAJIMOPOULOS et MIKOLAJCIK, 1977), de la lactoferrine (SCHANBACHER et SMITH, 1974 ; LONNERDAL *et al.*, 1976). Cette méthode est bien plus rapide que les deux autres (quelques heures). L'utilisation d'un gel d'acétate de cellulose permet d'augmenter la rapidité (2 h) (SCHANBACHER et SMITH, 1974). La mesure de la hauteur des pics est précise pour des pics compris entre 2 et 5 cm.

3. *Méthodes immunologiques avec marquage de l'anticorps ou de l'antigène*

Les méthodes immunologiques en milieu gélosé exigent des quantités d'antigène et d'anticorps (pour l'imprégnation du milieu gélosé) importantes. On assiste à une orientation préférentielle vers les méthodes utilisant le marquage des antigènes ou des anticorps par fixation d'entités radioactives ou dotées d'une activité enzymatique. Les quantités d'anticorps ou d'antigène utilisées sont moins importantes. Le problème général de ces méthodes est que la fixation de l'entité radioactive ou enzymatique peut modifier l'association antigène-anticorps, en se fixant sur les déterminants antigéniques de l'antigène ou de l'anticorps. Ces méthodes possèdent une très bonne répétabilité et une sensibilité plus élevée (de l'ordre du ng, voire du pg) que celle des méthodes immunologiques en milieu gélosé (BECK et TUCKER, 1977 ; MASSEYEF, 1978).

a) *Dosage radioimmunologique*

L'antigène étudié est marqué par un isotope radioactif (iode radioactif). Ce dosage est fondé sur l'équilibre de dissociation du complexe antigène-anticorps et sur l'hypothèse que l'antigène chaud (radioactif) et l'antigène froid (non radioactif) se fixent de la même façon sur l'anticorps. L'antigène marqué va permettre la constitution de complexes anticorps-antigène marqués dont une quantité connue est placée dans un tube. Une quantité d'antigène froid est alors rajoutée. Après incubation, le précipité est récupéré par centrifugation et la radioactivité mesurée par un compteur à scintillation. Plus la radioactivité du précipité est faible, plus la concentration d'antigène froid est importante. La radioactivité enregistrée est inversement proportionnelle à la concen-

tration d'antigène froid de la solution. Cette méthode a été appliquée pour le dosage de l' α -lactalbumine et de la prolactine (protéohormone) du lait (BECK et TUCKER, 1977). Le gros problème de la méthode est l'ensemble des contraintes liées à l'utilisation d'isotopes radioactifs (MASSEYEF, 1978).

b) *Dosage immunoenzymatique*

Le principe de cette méthode (MASSEYEF, 1978) est identique à celui du dosage radioimmunologique sauf que le marquage isotopique est remplacé par un marquage enzymatique. L'activité de l'enzyme doit être conservée après sa fixation sur l'antigène qui se fait en général par l'interposition du glutaraldéhyde dont les fonctions aldéhydes réagissent avec la lysine de la protéine. Les enzymes les plus utilisés sont la peroxydase de Raifort et la phosphatase alcaline.

Dans cette méthode, une concentration d'anticorps connue est placée dans un tube. On rajoute l'antigène lié (antigène marqué) de concentration connue et l'antigène libre (antigène non marqué et à doser), qui vont entrer en compétition de fixation sur l'anticorps. Après incubation, le précipité est récupéré par centrifugation et l'activité enzymatique présente est mesurée par addition d'un substrat donnant une réaction colorée. Plus la concentration d'antigène libre est grande, plus l'activité enzymatique enregistrée est faible. Cette activité est inversement proportionnelle à la concentration d'antigène libre.

Cette méthode existe aussi avec fixation préalable de l'anticorps sur un support solide (verre, plastique). Elle est connue dans ce cas, sous le nom de méthode Elisa (enzyme linked immunosorbent assay). Dans cette méthode, la séparation de l'antigène lié et de l'antigène libre se fait par un simple lavage.

La méthode Elisa dite « en sandwich » est la seule à avoir été appliquée pour le dosage des caséines K du lait et ne donne des résultats satisfaisants qu'avec des solutions de caséines purifiées de concentrations comprises entre 10^{-3} g/l et 5×10^{-2} g/l (LEFIER et COLLIN, 1982). Dans cette méthode, l'antigène doit posséder au moins deux déterminants antigéniques. L'antigène va se fixer à l'anticorps fixé au support et de concentration connue. Une quantité d'anticorps marqués et en excès est alors rajoutée au milieu. Après incubation, le milieu est lavé. Plus la concentration d'antigène est grande, plus la quantité d'anticorps fixés au support et occupés est élevée. Ainsi, la quantité d'anticorps marqués qui est retenue est plus grande ainsi que l'activité enzymatique enregistrée. Cette activité enzymatique est proportionnelle à la concentration en antigène.

Les réactifs (antigène marqué, anticorps marqué) peuvent se conserver des années sans perte de l'activité enzymatique. Il faut cependant s'assurer dans cette méthode que le milieu réactionnel ne renferme pas de substance inhibitrice de l'enzyme.

4. *Dosage immunonéphélométrique*

Le principe de cette méthode (LEBRETON *et al.*, 1981) est la mesure de la lumière dispersée au contact des particules d'immunocomplexes formées en zone d'excès d'anticorps. Le cône de lumière dispersée est recueilli après

focalisation sur un photodétecteur et le signal électrique créé, mesuré en volts, est proportionnel à la quantité d'immunocomplexe, elle-même proportionnelle à la quantité d'antigène rajoutée dans le milieu. L'appareil qui fait la mesure s'appelle un laser néphélémètre, qui fonctionne en continu. La méthode est rapide (un dosage toutes les 15 secondes). Elle s'est imposée comme méthode de routine pour la détection des immunoglobulines G du lait (LEBRETON *et al.*, 1981 ; JOISEL *et al.*, 1981). Elle permet ainsi de détecter la présence de colostrum dont la teneur en immunoglobulines G est élevée, dans le lait. Le lait contenant du colostrum est, en effet, impropre à la consommation. Cette méthode possède une bonne sensibilité (de l'ordre du ng).

J. Dosage des protéines par action de la carboxypeptidase A

Cette méthode consiste à faire agir la carboxypeptidase A, qui est une exopeptidase, sur un mélange de protéines. Cet enzyme libère les acides aminés à partir de l'extrémité C terminale des protéines et son action est stoppée par des acides aminés tels que la proline, la lysine et l'arginine. Les acides aminés libres sont analysés directement à l'aide d'un analyseur d'acides aminés. Connaissant les séquences C terminales des différentes protéines, le nombre de moles d'acides aminés libérés et spécifiques à chaque protéine, est proportionnel à la quantité de protéines présentes dans la solution. Cette méthode a été utilisée pour quantifier les différentes caséines (RIBADEAU-DUMAS, 1968). La précision de la méthode est limitée par la sensibilité de l'analyseur d'acides aminés. L'utilisation des analyseurs actuels permet une analyse rapide (une analyse par heure) et sensible (environ 1 nmole). Cette méthode pourrait être utilisée par le service de répression des fraudes pour détecter la présence de lait de vache dans le lait de chèvre. En effet, les séquences C terminales de protéines du lait de chèvre sont différentes de celles du lait de vache.

Conclusion

En conclusion de cette revue, il nous a semblé utile, par souci de clarté, de résumer sous forme de tableau les valeurs obtenues par différents auteurs lors du dosage des protéines du lait de vache. Ces valeurs sont classées en fonction de la nature des protéines à doser : protéines totales, caséine entière, protéines du sérum, différentes caséines et autres protéines du lait. Pour chaque référence citée, la race de l'animal et la méthode de dosage utilisée ont été précisées.

Les valeurs indiquées dans ce tableau font apparaître de grandes variations lors du dosage des protéines avec les différentes méthodes. Il semble cependant que la variabilité des résultats soit davantage imputable aux facteurs naturels de variation de la teneur en protéines du lait (stade de lactation, saison, alimentation, état sanitaire...) qu'à la méthode de dosage utilisée.

D'une manière générale, les méthodes de dosage rapide (principalement les méthodes de routine) ne permettent pas de doser les différentes protéines

alors que celles qui le permettent (électrophorèse, chromatographie, techniques immunologiques) sont longues. Cependant, le développement des méthodes chromatographiques rapides (FPLC, HPLC) ouvrent de nouvelles perspectives par un abaissement important du temps d'analyse.

TENEURS DES DIFFERENTES FRACTIONS PROTEIQUES DU LAIT.

PROTEINES TOTALES (g/l)				
Teneur	Référence	Race	Méthode de dosage	
31,3	Rrolleri <u>et al</u> (1956)	Brune Suisse	Kjeldahl	
34,6	Rrolleri <u>et al</u> (1956)	Guernesey	Kjeldahl	
29,4	Rrolleri <u>et al</u> (1956)	Holstein	Kjeldahl	
33,8	Rrolleri <u>et al</u> (1956)	Jersey	Kjeldahl	
31,5	Rrolleri <u>et al</u> (1956)	Ayrshire	Kjeldahl	
36,9	Nakai <u>et al</u> (1964)		Spectrométrie ultraviolet	
35,7	Ashworth (1966)	Guernesey	Fixation de colorant	
34,1	Wang et Stone (1967)		Kjeldahl	
34,6	Wang et Stone (1967)		Dumas	
33,9	Mc Gann <u>et al</u> (1972)		Fixation de colorant (Pro-Milk MK II)	
36,1	Haenlein <u>et al</u> (1973)	Holstein	Fixation de colorant	
41,6	Haenlein <u>et al</u> (1973)	Guernesey	Fixation de colorant	
30,6	Cerbulis et Farrell (1975)	Holstein	Kjeldahl	
35,5	Cerbulis et Farrell (1975)	Guernesey	Kjeldahl	
32,9	Cerbulis et Farrell (1975)	Ayrshire	Kjeldahl	
40,7	Cerbulis et Farrell (1975)	Jersey	Kjeldahl	
31,6	Cerbulis et Farrell (1975)	Milking Shorthorn	Kjeldahl	
38,3	Cerbulis et Farrell (1975)	Brune Suisse	Kjeldahl	
34,2	Lin et Randolph (1978)		Kjeldahl	
33,8	Lin et Randolph (1978)		Kjeldahl	
32,7	Davies et Law (1980)	Ayrshire-Frisone	Kjeldahl	
CASEINES TOTALES (g/l)				
27,8	Rrolleri <u>et al</u> (1956)	Brune Suisse	Kjeldahl	
28,8	Rrolleri <u>et al</u> (1956)	Guernesey	Kjeldahl	
23,3	Rrolleri <u>et al</u> (1956)	Holstein	Kjeldahl	
24,6	Rrolleri <u>et al</u> (1956)	Ayrshire	Kjeldahl	
27,2	Rrolleri <u>et al</u> (1956)	Jersey	Kjeldahl	
20,1	Nakai <u>et al</u> (1964)		Spectrométrie ultraviolet	
25,8	Mc Gann <u>et al</u> (1972)		Fixation de colorant (Pro-Milk MK II)	
27,9	Haenlein <u>et al</u> (1973)	Holstein	Fixation de colorant	
31,9	Haenlein <u>et al</u> (1973)	Guernesey	Fixation de colorant	
31,4	Cerbulis et Farrell (1975)	Brune Suisse	Kjeldahl	
25,6	Cerbulis et Farrell (1975)	Milking Shorthorn	Kjeldahl	
33,8	Cerbulis et Farrell (1975)	Jersey	Kjeldahl	
27,2	Cerbulis et Farrell (1975)	Ayrshire	Kjeldahl	
25,2	Cerbulis et Farrell (1975)	Holstein	Kjeldahl	
28,7	Cerbulis et Farrell (1975)	Guernesey	Kjeldahl	
25,9	Davies et Law (1977 b)	Ayrshire	Kjeldahl	
26,9	Davies et Law (1980)	Ayrshire-Frisone	Kjeldahl	
24,7	Mc Lean <u>et al</u> (1984)	Frisone	Fixation de colorant (Pro-Milk MK II)	
31,7	Mc Lean <u>et al</u> (1984)	Jersey	Fixation de colorant (Pro-Milk MK II)	
PROTEINES TOTALES DU LACTOSERUM (g/l)				
5,3	Rrolleri <u>et al</u> (1956)	Brune Suisse	Kjeldahl	
5,8	Rrolleri <u>et al</u> (1956)	Guernesey	Kjeldahl	
5,6	Rrolleri <u>et al</u> (1956)	Holstein	Kjeldahl	
5,1	Rrolleri <u>et al</u> (1956)	Ayrshire	Kjeldahl	
6,6	Rrolleri <u>et al</u> (1956)	Jersey	Kjeldahl	
12,5	Nakai <u>et al</u> (1964)		Spectrométrie ultraviolet	
7,9	Mc Gann <u>et al</u> (1972)		Fixation de colorant (Pro-Milk MK II)	
9,6	Haenlein <u>et al</u> (1973)	Guernesey	Kjeldahl	
8,2	Haenlein <u>et al</u> (1973)	Holstein	Kjeldahl	
5,7	Cerbulis et Farrell (1975)	Ayrshire	Kjeldahl	
6,9	Cerbulis et Farrell (1975)	Brune Suisse	Kjeldahl	
6,0	Cerbulis et Farrell (1975)	Milking Shorthorn	Kjeldahl	
6,8	Cerbulis et Farrell (1975)	Jersey	Kjeldahl	
5,4	Cerbulis et Farrell (1975)	Holstein	Kjeldahl	
6,7	Cerbulis et Farrell (1975)	Guernesey	Kjeldahl	
8,8	Lin et Randolph (1978)		Kjeldahl	
8,7	Lin et Randolph (1978)		Kjeldahl	
5,7	Davies et Law (1980)	Ayrshire-Frisone	Kjeldahl	
CASEINE α_{s1} (g/l)				
9,96	Davies et Law (1977 b)	Ayrshire	DEAE Cellulose	
10,25	Davies et Law (1980)	Ayrshire-Frisone	DEAE Cellulose	
10,1	Mc Lean <u>et al</u> (1984)	Jersey	Electrophorèse	
8,3	Mc Lean <u>et al</u> (1984)	Frisone	Electrophorèse	

TENEURS DES DIFFERENTES FRACTIONS PROTEIQUES DU LAIT.

PROTEINES TOTALES (g/l)				
Teneur	Référence		Race	Méthode de dosage
CASEINE α_{s2} (g/l)				
2,72	Davies et Law	(1977 b)	Ayrshire	DEAE Cellulose
2,74	Davies et Law	(1980)	Ayrshire-Frisone	DEAE Cellulose
2,9	Mc Lean <u>et al</u>	(1984)	Frisone	Electrophorèse
4,1	Mc Lean <u>et al</u>	(1984)	Jersey	Electrophorèse
CASEINE α_s (g/l)				
13,3	Haenlein <u>et al</u>	(1973)	Holstein	Electrophorèse
15,6	Haenlein <u>et al</u>	(1973)	Guernesey	Electrophorèse
CASEINE β (g/l)				
8,4	Rolleri <u>et al</u>	(1956)	Brown swiss	Electrophorèse
8,2	Rolleri <u>et al</u>	(1956)	Guernesey	Electrophorèse
6,0	Rolleri <u>et al</u>	(1956)	Holstein	Electrophorèse
8,5	Rolleri <u>et al</u>	(1956)	Ayrshire	Electrophorèse
7,6	Rolleri <u>et al</u>	(1956)	Holstein	Electrophorèse
10,6	Haenlein <u>et al</u>	(1973)	Holstein	Electrophorèse
12,0	Haenlein <u>et al</u>	(1973)	Guernesey	Electrophorèse
9,46	Davies et Law	(1977 b)	Ayrshire	DEAE Cellulose
9,6	Davies et Law	(1980)	Ayrshire-Frisone	DEAE-Cellulose
8,8	Mc Lean <u>et al</u>	(1984)	Frisone	Electrophorèse
10,8	Mc Lean <u>et al</u>	(1984)	Jersey	Electrophorèse
CASEINE κ (g/l)				
1,6	Haenlein <u>et al</u>	(1973)	Holstein	Electrophorèse
1,8	Haenlein <u>et al</u>	(1973)	Guernesey	Electrophorèse
3,2	Davies et Law	(1977 b)	Ayrshire	DEAE Cellulose
3,4	Davies et Law	(1980)	Ayrshire-Frisone	DEAE Cellulose
2,7	Beeby	(1980)		Fluorescamine
2,7	Mc Lean <u>et al</u>	(1984)	Frisone	Electrophorèse
3,9	Mc Lean <u>et al</u>	(1984)	Jersey	Electrophorèse
CASEINE γ (g/l)				
1,1	Rolleri <u>et al</u>	(1956)	Brune Suisse	Electrophorèse
1,4	Rolleri <u>et al</u>	(1956)	Guernesey	Electrophorèse
2,0	Rolleri <u>et al</u>	(1956)	Holstein	Electrophorèse
0,8	Rolleri <u>et al</u>	(1956)	Ayrshire	Electrophorèse
1,3	Rolleri <u>et al</u>	(1956)	Jersey	Electrophorèse
0,5	Davies et Law	(1977 b)	Ayrshire	DEAE Cellulose
0,8	Davies et Law	(1980)	Ayrshire-Frisone	DEAE Cellulose
2,1	Mc Lean <u>et al</u>	(1984)	Frisone	Electrophorèse
2,7	Mc Lean <u>et al</u>	(1984)	Jersey	Electrophorèse
CASEINE α_{s1} (% pour 100% de caséine)				
38	Davies et Law	(1977 a)	Ayrshire	DEAE Cellulose
38,4	Davies et Law	(1977 b)	Ayrshire	DEAE Cellulose
38,1	Davies et Law	(1980)	Ayrshire-Frisone	DEAE Cellulose
33,6	Mc Lean <u>et al</u>	(1982)	Frisone	Electrophorèse
31,9	Mc Lean <u>et al</u>	(1982)	Jersey	Electrophorèse
31,8	Mc Lean <u>et al</u>	(1984)	Jersey	Electrophorèse
33,6	Mc Lean <u>et al</u>	(1984)	Frisone	Electrophorèse
CASEINE α_{s2} (% pour 100% de caséine)				
11	Davies et Law	(1977 a)	Ayrshire	DEAE Cellulose
10,5	Davies et Law	(1977 b)	Ayrshire	DEAE Cellulose
10,2	Davies et Law	(1980)	Ayrshire-Frisone	DEAE Cellulose
11,7	Mc Lean <u>et al</u>	(1982)	Frisone	Electrophorèse
12,8	Mc Lean <u>et al</u>	(1982)	Jersey	Electrophorèse
11,7	Mc Lean <u>et al</u>	(1984)	Frisone	Electrophorèse
12,9	Mc Lean <u>et al</u>	(1984)	Jersey	Electrophorèse
CASEINE α_s (% pour 100% de caséine)				
49	Tessier et al	(1963)		Turbidimétrie
46,8	Ribadeau-Dumas	(1968)		Carboxypeptidase
48,9	Haenlein <u>et al</u>	(1973)	Guernesey	Electrophorèse
47,8	Haenlein <u>et al</u>	(1973)	Holstein	Electrophorèse
51,2	Randolph <u>et al</u>	(1974)		Electrophorèse
49	Davies et Law	(1977 a)	Ayrshire	DEAE Cellulose
48,9	Davies et Law	(1977 b)	Ayrshire	DEAE Cellulose
49,6	Barry et Donnelly	(1979)	Frisone	Hydroxyapatite
48,7	Barry et Donnelly	(1980)	Frisone	Hydroxyapatite
48,3	Davies et Law	(1980)	Ayrshire-Frisone	DEAE Cellulose
44,7	Mc Lean <u>et al</u>	(1982)	Jersey	Electrophorèse
45,3	Mc Lean <u>et al</u>	(1982)	Frisone	Electrophorèse
45,3	Mc Lean <u>et al</u>	(1984)	Frisone	Electrophorèse
44,7	Mc Lean <u>et al</u>	(1984)	Jersey	Electrophorèse

TENEURS DES DIFFERENTES FRACTIONS PROTEIQUES DU LAIT.

PROTEINES TOTALES (g/l)

Teneur	Référence		Race	Méthode de dosage
CASEINE β (% pour 100% de caséine)				
30,1	Rolleri <u>et al</u>	(1956)	Brune Suisse	Electrophorèse
28,3	Rolleri <u>et al</u>	(1956)	Guernesey	Electrophorèse
25,2	Rolleri <u>et al</u>	(1956)	Holstein	Electrophorèse
32,2	Rolleri <u>et al</u>	(1956)	Ayrshire	Electrophorèse
27,9	Rolleri <u>et al</u>	(1956)	Jersey	Electrophorèse
36,0	Tessier <u>et al</u>	(1963)		Turbidimétrie
30,2	Ribadeau-Dumas	(1968)		Carboxypeptidase A
37,6	Haenlein <u>et al</u>	(1973)	Guernesey	Electrophorèse
37,9	Haenlein <u>et al</u>	(1973)	Holstein	Electrophorèse
43,9	Randolph <u>et al</u>	(1974)		Electrophorèse
36,0	Davies et Law	(1977 a)	Ayrshire	DEAE Cellulose
36,5	Davies et Law	(1977 b)	Ayrshire	DEAE Cellulose
34,9	Barry et Donnelly	(1979)	Frisone	DEAE Cellulose
33,8	Barry et Donnelly	(1980)	Frisone	Hydroxyapatite
35,7	Davies et Law	(1980)	Ayrshire-Frisone	DEAE Cellulose
35,4	Mc Lean <u>et al</u>	(1982)	Frisone	Electrophorèse
34,2	Mc Lean <u>et al</u>	(1982)	Jersey	Electrophorèse
34,0	Mc Lean <u>et al</u>	(1984)	Jersey	Electrophorèse
35,6	Mc Lean <u>et al</u>	(1984)	Frisone	Electrophorèse

CASEINE κ (% pour 100% de caséine)

10,0	Tessier <u>et al</u>	(1963)		Dosage des acides sialiques
10,6	Ribadeau-Dumas	(1968)		Carboxypeptidase A
5,6	Haenlein <u>et al</u>	(1973)	Guernesey	Electrophorèse
5,7	Haenlein <u>et al</u>	(1973)	Holstein	Electrophorèse
3,3	Randolph <u>et al</u>	(1974)		Electrophorèse
13,0	Davies et Law	(1977 a)	Ayrshire	DEAE Cellulose
12,5	Davies et Law	(1977 b)	Ayrshire	DEAE Cellulose
10,2	Barry et Donnelly	(1979)	Frisone	Hydroxyapatite
9,5	Barry et Donnelly	(1980)	Frisone	Hydroxyapatite
12,8	Davies et Law	(1980)	Ayrshire-Frisone	DEAE Cellulose
10,8	Mc Lean <u>et al</u>	(1982)	Frisone	Electrophorèse
12,4	Mc Lean <u>et al</u>	(1982)	Jersey	Electrophorèse
10,9	Mc Lean <u>et al</u>	(1984)	Frisone	Electrophorèse
12,3	Mc Lean <u>et al</u>	(1984)	Jersey	Electrophorèse

CASEINE γ (% pour 100% de caséine)

4,1	Rolleri <u>et al</u>	(1956)	Brune Suisse	Electrophorèse
5,2	Rolleri <u>et al</u>	(1956)	Guernesey	Electrophorèse
8,5	Rolleri <u>et al</u>	(1956)	Holstein	Electrophorèse
3,1	Rolleri <u>et al</u>	(1956)	Ayrshire	Electrophorèse
4,8	Rolleri <u>et al</u>	(1956)	Jersey	Electrophorèse
2,0	Davies et Law	(1977 a)	Ayrshire	DEAE Cellulose
2,1	Davies et Law	(1977 b)	Ayrshire	DEAE Cellulose
3,4	Barry et Donnelly	(1979)	Frisone	Hydroxyapatite
4,9	Barry et Donnelly	(1980)	Frisone	Hydroxyapatite
3,2	Davies et Law	(1980)	Ayrshire-Frisone	DEAE Cellulose
8,6	Mc Lean <u>et al</u>	(1982)	Jersey	Electrophorèse
8,5	Mc Lean <u>et al</u>	(1982)	Frisone	Electrophorèse
8,5	Mc Lean <u>et al</u>	(1984)	Jersey	Electrophorèse
8,5	Mc Lean <u>et al</u>	(1984)	Frisone	Electrophorèse

 β LACTOGLOBULINE (g/l)

3,1	Rolleri <u>et al</u>	(1956)	Brune Suisse	Electrophorèse
3,5	Rolleri <u>et al</u>	(1956)	Guernesey	Electrophorèse
3,0	Rolleri <u>et al</u>	(1956)	Holstein	Electrophorèse
3,1	Rolleri <u>et al</u>	(1956)	Ayrshire	Electrophorèse
3,9	Rolleri <u>et al</u>	(1956)	Jersey	Electrophorèse
3,7	Haenlein <u>et al</u>	(1973)	Guernesey	Electrophorèse
2,5	Haenlein <u>et al</u>	(1973)	Holstein	Electrophorèse
2,2	Cerbulis et Farrell	(1975)	Guernesey	Kjeldahl
1,6	Cerbulis et Farrell	(1975)	Ayrshire	Kjeldahl
2,3	Cerbulis et Farrell	(1975)	Brune Suisse	Kjeldahl
1,6	Cerbulis et Farrell	(1975)	Milking Shorthorn	Kjeldahl
2,8	Cerbulis et Farrell	(1975)	Jersey	Kjeldahl
1,8	Cerbulis et Farrell	(1975)	Holstein	Kjeldahl
3,4	Babajimopoulos et Mikolajcik	(1977)		Immunodiffusion simple (Oudin)
3,4	Babajimopoulos et Mikolajcik	(1977)		Immunodiffusion radiale (Mancini)
3,5	Babajimopoulos et Mikolajcik	(1977)		Electroimmunodiffusion (Laurell)
3,1	Davies et Law	(1980)	Ayrshire-Frisone	Filtration sur gel
3,0	Mc Lean <u>et al</u>	(1984)	Frisone	Immunodiffusion radiale (Mancini)
3,6	Mc Lean <u>et al</u>	(1984)	Jersey	Immunodiffusion radiale (Mancini)

TENEURS DES DIFFERENTES FRACTIONS PROTEIQUES DU LAIT.

Teneur	Référence	PROTEINES TOTALES (g/l)		
		Race	Méthode de dosage	
α LACTALBUMINE (g/l)				
1,1	Rolleri <u>et al</u> (1956)	Brune Suisse	Electrophorèse	
1,5	Rolleri <u>et al</u> (1956)	Jersey	Electrophorèse	
1,1	Rolleri <u>et al</u> (1956)	Guernesey	Electrophorèse	
1,3	Rolleri <u>et al</u> (1956)	Holstein	Electrophorèse	
1,1	Rolleri <u>et al</u> (1956)	Ayrshire	Electrophorèse	
2,8	Haenlein <u>et al</u> (1973)	Holstein	Electrophorèse	
2,7	Haenlein <u>et al</u> (1973)	Guernesey	Electrophorèse	
1,3	Beck et Tucker (1977)	Holstein-Frisone	Radioimmunologie	
1,2	Davies et Law (1980)	Ayrshire-Frisone	Filtration sur gel	
0,9	Mc Lean <u>et al</u> (1984)	Frisone	Immunodiffusion radiale (Mancini)	
1,1	Mc Lean <u>et al</u> (1984)	Jersey	Immunodiffusion radiale (Mancini)	
SERUM ALBUMINE (g/l)				
0,4	Rolleri <u>et al</u> (1956)	Brune Suisse	Electrophorèse	
0,4	Rolleri <u>et al</u> (1956)	Guernesey	Electrophorèse	
0,4	Rolleri <u>et al</u> (1956)	Holstein	Electrophorèse	
0,4	Rolleri <u>et al</u> (1956)	Jersey	Electrophorèse	
0,3	Rolleri <u>et al</u> (1956)	Ayrshire	Electrophorèse	
1,5	Haenlein <u>et al</u> (1973)	Holstein	Electrophorèse	
1,4	Haenlein <u>et al</u> (1973)	Guernesey	Electrophorèse	
0,2	Babajimopoulos et Mikolajcik (1977)		Immunodiffusion simple (Oudin)	
0,2	Babajimopoulos et Mikolajcik (1977)		Immunodiffusion radiale (Mancini)	
0,2	Babajimopoulos et Mikolajcik (1977)		Electroimmunodiffusion (Laurell)	
0,4	Davies et Law (1980)	Ayrshire-Frisone	Filtration sur gel	
IMMUNOGLOBULINES G (g/l)				
0,7	Rolleri <u>et al</u> (1956)	Brune Suisse	Electrophorèse	
0,8	Rolleri <u>et al</u> (1956)	Guernesey	Electrophorèse	
0,9	Rolleri <u>et al</u> (1956)	Holstein	Electrophorèse	
0,8	Rolleri <u>et al</u> (1956)	Jersey	Electrophorèse	
0,6	Rolleri <u>et al</u> (1956)	Ayrshire	Electrophorèse	
1,4	Haenlein <u>et al</u> (1973)	Holstein	Electrophorèse	
1,6	Haenlein <u>et al</u> (1973)	Guernesey	Electrophorèse	
LACTOFERRINE (g/l)				
0,9	Davies et Law (1980)	Ayrshire-Frisone	Filtration sur gel	
PROLACTINE (g/l)				
18,9.10-3	Beck et Tucker (1977)	Holstein-Frisone	Radioimmunologie	

Références bibliographiques

- ADDA J., BLANC-PATIN E., JEUNET R., GRAPPIN R., MOCQUOT G., RICORDEAU G., 1967. Essais d'utilisation d'un spectrophotomètre infrarouge (infrared milk analyser) permettant de déterminer la teneur du lait en matière grasse, matière azotée et lactose. *Bull. Tech. Inf.*, 225, 947-958.
- ADDA J., BLANC-PATIN E., JEUNET R., GRAPPIN R., MOCQUOT G., POUSSARDIEU B., RICORDEAU G., 1968. Essais d'utilisation de l'infrarouge milk analyser. *Lait*, 48, 145-153 et 293-302.
- ADDEO F., MERCIER J.C., RIBADEAU DUMAS B., 1977. The caseins of buffalo milk. *J. Dairy Res.*, 44, 455-468.
- AIMUTIS W.R., EIGEL W.N., 1982. Identification of λ -casein α_s plasmin derived fragments of bovine α_{s1} -casein. *J. Dairy Sci.*, 65, 175-181.
- ALAIS C., RIBADEAU DUMAS B., SAINT-LEBE L., 1961. Etude de la réaction des protéines du lait avec le « noir amido ». Application au dosage rapide des matières azotées du lait. *Lait*, 41, 241-273.
- ALAIS C., 1984. Science du lait, principes et techniques laitières. 4^e édition, Sepaic, Paris.
- ANDREWS A.T., 1979. The formation and structure of some proteose peptone components. *J. Dairy Res.*, 46, 215-218.
- ASCHAFFENBURG R., DREWRY J., 1959. New procedure for the routine determination of the various non-casein proteins of milk. 15^e Cong. Int. Lait., 3, 1631.
- ASHWORTH V.S., 1966. Determination of protein in dairy products by Dye-Binding. *J. Dairy Sci.*, 49, 133-137.
- BABAJIMOPOULOS M., MIKOLAJCZIK E.M., 1977. Quantification of selected serum protein of milk by immunological procedures. *J. Dairy Sci.*, 60, 721-725.
- BARREFORS P., EKSTRAND B., FAGERSTRASS L., LARSSON RAZNIKIEWICZ M., SCHAAR J., STEFFNER P., 1985. Fast protein liquid chromatography (FPLC) of bovine caseins. *Milchwissenschaft*, 40, 257-260.
- BARRY J.G., DONNELLY W.J., 1979. A method for the quantitative analysis of bovine casein. *Biochem. Soc. Trans.*, 7, 529-531.
- BARRY J.G., DONNELLY W.J., 1980. Casein compositional studies. 1. The composition of casein from Friesian herd milks. *J. Dairy Res.*, 47, 71-82.
- BASCH J.J., DOUGLAS F.W., PROCINO L.G., HOLSINGER V.H., FARRELL H.M., 1985. Quantitation of caseins and whey proteins of processed milks and comparison with Harland-Ashword procedure. *J. Dairy Sci.*, 68, 23-31.
- BECK N.F.G., TUCKER H.A., 1977. Relationships between radioimmunoassays of α -lactalbumin and prolactin in bovine skim milk. *J. Dairy Sci.*, 60, 542-545.
- BEEBY R., 1980. The use of fluorescamine at pH 6.0 to follow the action of chymosin on K-casein and to estimate this protein in milk. *N Z. J. Dairy Sci. Technol.*, 15, 99-108.
- BEECHER G.R., 1970. Ammonia determination : reagent modification and interfering compounds. *Anal. Biochem.*, 36, 243-246.
- BEITZ D.C., PHILLIPS M.E., EKLUND S.H., 1977. A nephelometric procedure for determination of fat and protein in milk. *J. Dairy Sci.*, 60, 701-705.
- BIETZ J.A., 1974. Micro Kjeldahl analysis by an improved automated ammonia determination following manual digestion. *Anal. Chem.*, 46, 1617-1618.
- BIGGS D.A., 1967. Milk analysis with the infrared milk analyzer. *J. Dairy Sci.*, 50, 799-803.
- BIGGS D.A., 1972 a. Precision and accuracy of infrared milk analysis. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 55, 488-497.
- BIGGS D.A., 1972 b. Infrared milk analyser. *J. Dairy Sci.*, 55, 650-651.
- BIGGS D.A., 1978. Instrumental infrared estimation of fat, protein and lactose in milk : collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 61, 1015-1034.
- BIGGS D.A., 1979. Infrared estimation of fat, protein and lactose in milk : evaluation of multispec instrument. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 62, 1202-1207.
- BLANC B., 1982. Les protéines du lait à activité enzymatique et hormonale. *Lait*, 62, 350-395.
- BORTREE A.L., CARROLL E.J., SCHALM O.W., 1962. Whey protein patterns of milk from cows with experimentally produced mastitis. *J. Dairy Sci.*, 45, 1465-1471.

- BOSSET J.O., BLANC B., PLATTNER E., 1976. Le dosage des protéines du lait et de ses principaux dérivés : méthodes et appareillages tirés de la littérature parue entre 1964 et 1974. *Trav. Chim. Alim. Hyg.*, 67, 226-261.
- BRIGNON G., CHTOUROU A., RIBADEAU DUMAS B., 1986. Contamination of human whole casein by whey proteins : quantitative aspects. *Lait* (sous presse).
- BROWN P.B., CLARK R.M., LABARRE D.J., ROSS S.R., 1983. A comparison of methods for protein analysis of human milk. *Fed. Proc.*, 42, 1330.
- CERBULIS J., FARRELL H.M., 1975. Composition of milks of dairy cattle. I. Protein, lactose and fat contents and distribution of protein fraction. *J. Dairy Sci.*, 58, 817-827.
- CHURCH F.C., SWAISGOOD H.E., PORTER D.H., CATIGNANI G.L., 1983. Spectrophotometric assay using ophtaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *J. Dairy Sci.*, 66, 1219-1227.
- DAVIES D.T., 1974. The quantitative partition of the albumin fraction of milk serum proteins by gel chromatography. *J. Dairy Res.*, 41, 217-228.
- DAVIES D.T., LAW A.J.R., 1977 a. An improved method for the quantitative fractionation of casein mixtures using ion exchange chromatography. *J. Dairy Res.*, 44, 213-221.
- DAVIES D.T., LAW A.J.R., 1977 b. The composition of whole casein from the milk of Ayrshire cows. *J. Dairy Res.*, 44, 447-454.
- DAVIES D.T., LAW A.J.R., 1980. The content and composition of protein in creamery milks in south-west Scotland. *J. Dairy Res.*, 47, 83-90.
- DELLAMONICA E.S., HOLDEN T.F., CALNHOUN M.J., ACETO N.C., 1965. Effect of season on the whey protein nitrogen distribution of pooled milk. *J. Dairy Sci.*, 48, 1585-1590.
- DESCHREIDER A.R., MEAUX R., 1973. Utilisation d'une électrode ionique pour le dosage de l'azote par la méthode de Kjeldahl. *Analisis*, 2, 442-445.
- DILL C.W., Mc GILL R., LANE G.T., BRYANT J.N., THOMPSON Y., 1972. Distribution changes in bovine skim milk proteins during forced milk release. *J. Dairy Sci.*, 55, 200-203.
- DONNELLY W.J., 1977. Chromatography of milk proteins on hydroxyapatite. *J. Dairy Res.*, 44, 621-625.
- DRIOU A., GOBBILLON G., LINDEN G., 1985. Dosage de la poudre de lait écrémé par méthode immunologique dans les produits alimentaires pour animaux. *Sci. Aliments*, 5, 73-88.
- DYDENKOV A., 1966. Modification of Kofrani method for determination of quantity of protein substances in milk and sweetened condensed milk. 17th Int. Dairy Cong. B, 183-185.
- EGLI H.R., MEYHACK U., 1984. Measurements of the principal constituents of solid and liquid milk products by means of near infrared analysis. *Challenges to contemporary dairy analytical techniques*. The Royal Society of Chemistry, Burlington House, London, 49, 103-116.
- FOLIN O., CIOCALTEU V., 1927. On Tyrosine and Tryptophane determinations in proteins. *J. Biol. Chem.*, 73, 627-650.
- FORSUM E., 1976. Determination of α -lactalbumin in human milk. *J. Dairy Sci.*, 59, 14-18.
- FOX K.K., HOLSINGER V.H., PALLANSCH M., 1963. Fluorimetry as a method of determining protein content of milk. *J. Dairy Sci.*, 46, 302-309.
- GOULDEN J.D.S., 1964. Analysis of milk by infrared absorption. *J. Dairy Res.*, 31, 273-284.
- GRAPPIN R., JEUNET R., 1971. Essais de l'appareil « pro-milk automatique » destiné au dosage en série de la matière azotée du lait. *Lait*, 51, 35-49.
- GRAPPIN R., JEUNET R., 1976 a. Calibrage des méthodes de dosage de routine des protéines du lait. *Rev. Lait. Fr.*, 347, 663-667.
- GRAPPIN R., JEUNET R., 1976 b. Essais de l'appareil Milko Scan 300 utilisé pour le dosage en série de la matière grasse et des protéines du lait. *Lait*, 56, 498-520.
- GRAPPIN R., 1976 c. Guide pour l'évaluation des méthodes analytiques de routine. *Lait*, 56, 608-621.
- GRAPPIN R., JEUNET R., 1979. Méthodes de routine pour le dosage de la matière grasse et des protéines du lait de chèvre. *Lait*, 59, 345-360.

- GRAPPIN R., PACKARD V.S., GINN R.E., 1980. Repeatability and accuracy of Dye-binding and infrared methods for analyzing protein and other milk components. *J. Food Prot.*, 43, 374-375 and 380.
- GROSCLAUDE F., MAHÉ M.F., MERCIER J.C., RIBAUDEAU DUMAS B., 1972. Caractérisation des variants génétiques des caséines α_{s1} et β -bovines. *Eur. J. Biochem.*, 26, 328-337.
- GUIDRY A.J., PEARSON R.E., 1979. Improved methodology for quantitative determination of serum and milk proteins by single radial immunodiffusion. *J. Dairy Sci.*, 62, 1252-1257.
- HAENLEIN G.F.W., SCHULTZ L.H., ZIKAKIS J.P., 1973. Composition of proteins in milk with varying leucocyte contents. *J. Dairy Sci.*, 56, 1017-1024.
- HARLAND D.A., COULTER S.T., JENNESS R., 1955. Natural variations of milk serum proteins as a limitation of their use in evaluating the heat treatment of milk. *J. Dairy Sci.*, 38, 858-869.
- HUDSON G.J., LUCAS A., 1983. Nitrogen content of human milk : limitations of spectrophotometry for the determination of protein in milk. *J. Dairy Res.*, 50, 269-274.
- HUMPHREY R.S., NEWSOME L.J., 1984. High performance ion-exchange chromatography of the major bovine milk proteins. *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.*, 19, 197-204.
- IWAIDA M., KAWAGUCHI Y., TSUGO T., 1967. Ultraviolet spectrophotometric determination of protein content in milk. *J. Dairy Sci.*, 50, 1322-1327.
- JOISEL F., LANNUZEL B., LEBRETON J.P., BOUTLEUX S., SAUGER F., 1981. Dosage immunonéphéométrique des immunoglobulines G du lait de vache. II. Application à la détection de la présence de colostrum dans les laits de mélange. *Lait*, 61, 568-589.
- JOHNSTON K.A., 1982. Evaluation of the Multispec instrument for infrared estimation of milk fat, protein and lactose in raw milk. *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.*, 17, 141-146.
- KAMINOGAWA S., YAMAUCHI K., 1972. Acid protease of bovine milk. *Agric. Biol. Chem.*, 36, 2351-2356.
- KRAMME D.G., GRIFFEN R.H., HARTFORD C.G., CORRADO J.A., 1973. Automated Kjeldahl Nitrogen determination. A comprehensive method for aqueous dispersible samples. *Anal. Chem.*, 45, 405-408.
- KROGER M., KATZ E.E., WEAVER J.C., 1978. Determining protein content of ice cream and frozen desserts. *J. Dairy Sci.*, 61, 274-277.
- KWAI HANG K.F.N.G., HAYES J.F., 1982. Effects of potassium dichromate and sample storage time on fat and protein by milko-Scan and on protein and casein by a modified MKII method. *J. Dairy Sci.*, 65, 1895-1899.
- KWAI HANG K.N.F.G., KROEKER E.M., 1984. Rapid separation and quantification of major caseins and whey proteins of bovine milk by polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Dairy Sci.*, 67, 3052-3056.
- LAKIN A.L., 1974. Etude comparée des quantités de colorants fixées par les protéines du lait dans les conditions habituelles des procédés de fixation des colorants. XIX^e Cong. Int. Lait., Vol. 1 F, 303-304.
- LAURELL C.B., 1966. Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. *Anal. Biochem.*, 15, 45-52.
- LEBRETON J.P., JOISEL F., BOUTLEUX S., LANNUZEL B., SAUGER F., 1981. Dosage immunonéphéométrique des immunoglobulines G dans le lait de vache. I. Mise au point technique du dosage. *Lait*, 61, 465-480.
- LEFIER D., COLLIN J.C., 1982. Contribution au dosage des caséines K de vache par une méthode immunoenzymatique. *Lait*, 62, 541-548.
- LIN R.H., RANDOLPH H.E., 1978. Determination of nitrogen in milk by microdiffusion of Kjeldahl digests. *J. Dairy Sci.*, 61, 870-873.
- LONNERDAL B., FORSUM E., HAMBRAEUS L., 1976. The protein content of human milk. I. A transversal study of Swedish normal material. *Nutr. Rep. Int.*, 13, 126-134.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.R., RANDALL R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- LUKE H.A., 1967. Collaborative testing of the dye-binding method for milk protein. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 50, 560-564.

- Mc GANN T.C.A., MATHIASSEN A., O'CONNELL J.A., 1972. Applications of the Pro-Milk MK II part. III. Rapid estimation of casein in milk and protein in whey. *Lab. Pract.*, 21, 628-650.
- Mc GRATH R., 1972. Protein measurement by Ninhydrin determination of amino acids released by alkaline hydrolysis. *Anal. Biochem.*, 49, 95-102.
- Mc LEAN D.M., GRAHAM E.R.B., Mc KENZIE H.A., 1982. Estimation of casein composition by electrophoresis. 21st Int. Dairy Cong., Moscow, 1 (2), 221.
- Mc LEAN D.M., GRAHAM E.R.B., PONZONI R.W., 1984. Effects of milk protein genetic variants on milk yield and composition. *J. Dairy Res.*, 51, 531-546.
- MANCINI G., CARBONARA A.O., HEREMANS J.F., 1965. Immunochemical quantitation of antigens by single Radial Immunodiffusion. *Immunochem.*, 2, 235-254.
- MARIER J.R., TESSIER H., ROSE D., 1963. Sialic acid as an index of the K-casein content of bovine skim milk. *J. Dairy Sci.*, 46, 373-379.
- MASSEYEF R., 1978. L'immunoenzymologie. Rapports. Dosages enzymologiques. Principes et applications. *Ann. Biol. Clin.*, 36, 375-382.
- MERCIER J.C., MAUBOIS J.L., POZNANSKI S., RIBADEAU DUMAS B., 1968. Fractionnement préparatif des caséines de vache et de brebis par chromatographie sur DEAE cellulose, en milieu urée et 2-mercaptoéthanol. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 50, 521-530.
- MICHLAK W., CYNALOWSKA H., OCZKOWICZ H., 1978. Collaborative testing among laboratories routinely testing fat and protein in milk. *J. Dairy Sci.*, 61, 1634-1636.
- MORRIS G.F., CARSON R.B., SHEARER D.A., JOPKIEWICZ W.T., 1968. Comparison of the automatic Dumas (Coleman model 29A Nitrogen Analyzer II) and Kjeldahl methods for the determination of total nitrogen in agricultural materials. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 51, 216-219.
- NAGASAWA T., KIYOSAWA I., KUWAHARA K., FUKUWATARI Y., SUZUKI T., 1972. Gel electrophoresis patterns of human milk protein with duration and temperature of storage of the milk. *J. Dairy Sci.*, 55, 289-293.
- NAGASAWA T., KIYOSAWA I., FUKUWATARI Y., KITAYAMA T., UECHI M., HYODO Y., 1973. α -lactalbumin and serum albumin in human milk. *J. Dairy Sci.*, 56, 177-180.
- NAKAI S., WILSON H.K., HERREID E.O., 1964. Spectrophotometric determination of protein in milk. *J. Dairy Sci.*, 47, 356-358.
- NAKAI S., CHILE H., 1970. Spectrophotometric determination of protein and fat in milk simultaneously. *J. Dairy Sci.*, 53, 276-278.
- NOBLE R.C., SHAND J.H., WEST I.G., 1979. The use of liquid scintillation counter in colorimetric analysis. *Lab. Pract.*, 28, 393-396.
- NOBLE R.C., SHAND J.H., 1980. Quantification of protein, fat and lactose concentrations in milk samples using a liquid scintillation counter. *Proc. Nutr. Soc.*, 39, 78A.
- NOBLE R.C., SHAND J.H., WEST I.G., 1981. Novel determination of protein, fat and lactose of milk by liquid scintillation counter. *J. Dairy Sci.*, 64, 14-18.
- PEARCE R.J., 1983. Analysis of whey proteins by high performance liquid chromatography. *Aust. J. Dairy Technol.*, 38, 114-117.
- PORTER R.M., 1965. Fluorometric determination of protein in whole milk, skim milk serum. *J. Dairy Sci.*, 48, 99-100.
- RANDOLPH H.E., ERWIN R.E., RICHTER R.L., 1974. Influence of mastitis on properties of milk. VII. Distribution of milk proteins. *J. Dairy Sci.*, 57, 15-18.
- RIBADEAU DUMAS B., 1968. Simultaneous determination of α_{S1} , β and K-caseins in whole casein by using carboxypeptidase A. *Biochim. Biophys. Acta*, 168, 274-281.
- RIBADEAU DUMAS B., 1979. Progrès récents dans la biochimie des protéines du lait. *Rev. Lait. Fr.*, 371, 1-15.
- RITTENBURG J.H., GHAFAR A., SMITH C.J., ADAMS S., ALLEN J.C., 1984. The estimation of casein in milk by an enzyme linked immunosorbent assay. *Challenges to contemporary dairy analytical techniques*. The royal society of chemistry, Burlington House, London, 49, 319-320.
- ROEPER J., 1974. Formol titration method of estimating true protein and casein in skim milk. *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.*, 9, 49-50.

- ROLLERI G.B., LARSON B.L., TOUCHBERRY R.W., 1956. Protein production in the bovine breed and individual variations in the specific protein constituents of milk. *J. Dairy Sci.*, 39, 1683-1689.
- ROSE D., DAVIES D.T., YAGUCHI M., 1969. Quantitative determination of the major components of casein mixtures by column chromatography on DEAE-Cellulose. *J. Dairy Sci.*, 52, 8-11.
- ROWLAND S.J., 1938. The precipitation of the proteins in milk. *J. Dairy Res.*, 9, 30-41.
- SCHANBACHER F.L., SMITH K.L., 1974. Electroimmunodiffusion on cellulose acetate : a rapid method for analysis of bovine lactoferrin in chromatography effluents. *Anal Biochem.*, 59, 235-247.
- SCHMIDT D.G., 1982. Association of caseins and casein micelle structure. Chap. 2. In *Developments in Dairy chemistry*, 61-85. Ed. by P.F. Fox. Applied Science Publishers, London and New York.
- SHAH P.C., MORSE G.E., 1964. Studies on albumin in « mastitic » milk : factors affecting the presence of blood-serum albumin in « Mastitic » milk. *Am. J. Vet. Res.*, 25, 714-718.
- SHERBON J.W., 1967. Rapid determination of protein in milk by Dye binding. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 50, 542-547.
- SHERBON J.W., 1974. Pro-milk method for the determination of protein in milk by Dye binding. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 57, 1338-1341.
- SHIPE W.F., 1984. Fluorimetric methods : Applications and limitations *Challenges to contemporary dairy analytical techniques*. The royal society of chemistry, Burlington House, London, 49, 167-178.
- SMITH A., CHESWORTH J.M., HENDERSON G.D., RODWAY R.G., 1979. Use of Laurell electrophoresis for the quantitative measurement of albumin in mastitic milk. *J. Dairy Res.*, 46, 547-550.
- SNOEREN T.M.H., VAN RIEL J.A.M., 1979. Milk proteinase, its isolation and action on α_{s2} and β -casein. *Milchwissenschaft*, 34, 528-531.
- TESSIER H., ROSE D., MARIER J.R., 1963. Turbidimetric method for estimating sum of β and K-caseins in whole casein. *J. Dairy Sci.*, 46, 651-655.
- UDY D.C., 1956. A rapid method for estimating total protein in milk. *Nature*, 178, 314-315.
- URBAN W.C., 1971. Modification of the Kjeldahl nitrogen determination method. *Anal Chem.*, 43, 300-301.
- WANG P.T., STONE W.K., 1967. Automatic Dumas procedure for nitrogen in milks products. *J. Dairy Sci.*, 50, 937-938.
- WOLFSCHOON A.F., VARGAS O.L., 1977. Formol titration for the determination of the protein content in raw and pasteurized milk. *Rev. Inst. Lactinios Candido Tostes*, 32, 3-13.
- WOLFSCHOON A.F., VARGAS O.L., 1978. Reaction mechanism of milk protein determination by formaldehyde titration. *Milchwissenschaft*, 33, 480-482.
- YVON M., VAN HILLE I. PÉLISSIER J.P., GUILLOTEAU P., TOULLEC R., 1984. *In vivo* milk digestion in calf abomasum. II. Milk and whey proteolysis. *Reprod. Nutr. Dev.*, 24, 835-843.