

République Algérienne Démocratique Et Populaire

Université Abdelhamid Ibn
Badis-Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

TAKARLI HAYET

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN BIOLOGIE

Spécialité: Biochimie Appliquée

THÈME

*Détermination rapide et spécifique du taux d'hydrolyse
du lactose par méthode enzymatique et HPLC.*

Soutenue publiquement le 02/07/2018

DEVANT LE JURY

Président	NEBACHE Salim	M.C.B	U. Mostaganem
Encadreur	BENBOUZIANE Bouasria	M.C.B	U. Mostaganem
Examinateur	MEDJAHED MOSTEFA	M.A.A	U. Mostaganem

Thème réalisé au Laboratoire de Microbiologie N°03 Site III. Univ-Mosta

REMERCIEMENT :

Au terme de ce travail, je tiens à remercier dieu le tout puissant de m'avoir donné le courage la volonté et la patience pour achever ce travail.

J'ai l'honneur et le plaisir de présenter ma profonde gratitude et mes sincères remerciements à mon encadreur Mr **Bouasria Benbouziane** (MCB) pour son précieux conseil et son aide durant toute la période du travail. Grâce à lui j'ai entamé le chemin de la recherche scientifique merci pour tout.

J'exprime toute ma reconnaissance à Mr **Nebbache Salim** (MCB) pour avoir bien voulu accepter de présider le jury de ce mémoire. Que Mr **Medjahed Mustapha** (MAA), trouve ici l'expression de mes vifs remerciements pour avoir bien voulu juger ce travail

Mes remerciements les plus sincères et les plus profonds sont adressés Mr Mohamed-Cherif Bentahar pour son aide, ces conseils et pour tous les informations, merci infiniment.

Un très grand merci à Mr : Djilali Benbouziane de m'avoir ouvert les portes de son laboratoire et d'avoir mis à ma disposition les moyens nécessaires pour la réalisation de mes études, et pour son aide durant toute la période du travail.

Je remercie également Mme Mokhetar Meriem, et le chef de département Mr : Kadim, et tous ceux qui ont contribué de prêt ou de loin à la réalisation de mon travail.

Merci infiniment ...

DÉDICACES :

J'adresse mes sincères remerciements à tous les professeurs, intervenants et toutes les personnes qui par leurs paroles, leurs conseils et leurs critiques ont guidée mes réflexions.

Mr Nebbache Salim responsable de parcours de biochimie appliquée, Mr Dahmouni, Mr Benakriche, Mme Dalache, Mme Belhakem, Mr Nemmiche, Mme Tisourass, Mme Amir, Mme Hafida.

Chaleureusement aux personnes qui ont consenties aux efforts et aux sacrifices pour mettre mon instruction et mon éducation :

A chère maman que dieu ait son âme et j'espère qu'il fier de moi.

A mon cher papa pour son soutien inconditionnel, son amour et constance m'ont donné les repères dont j'avais besoin.

A ma grand sœur Isma qui a éclairé mon chemin et qui m'a beaucoup encouragée.

Je remercie très spécialement ma sœur Nouria et Rachida qui ont toujours été là pour moi.

A mon chère frère Kader et ma belle-sœur Nabila, mes nièce Hajouja , Nesrine, Ritedje et Yasmine , mon neveu Mohamed Anis.

A mes grands-parents Aicha et Abdelkader, et ma tante Kheira.

Mon oncle Mustapha et sa famille.

A mes cousin(e) : Fatima, Kaoutar, Cherifa, Faiza, Zoulikha, Salima , Sid Ahmed, Sif eldinne,

Je tiens à remercier tous mes amies que j'aime tant Yousra , Imene , Sabrina , Sara , Khadidja , Meriem , Nadia , Hanane , Samira , Malika , Wassila , Nesrine pour leur amitié , leur soutien inconditionnel et leur encouragement.

HAYET Takarli

Sommaire

Introduction	1
1. Lait	2
1.1. Composition du lait :	2
1.1.1. L'eau :	2
1.1.2. La matière grasse :	2
1.1.3. Glucides :	3
1.1.4. Protéines :	3
1.1.5. Les minéraux du lait et les oligo-éléments :	3
1.1.6. Les enzymes :	4
2. Lactose :	5
2.1. Structure :	5
2.2. La synthèse du lactose :	5
2.3. La digestion du lactose :	6
2.3.1. Digestion par lactase intestinale :	6
2.3.2. Digestion bactérienne :	7
2.4. Propriété physicochimique du lactose :	7
2.4.1. Pouvoir sucrant :	7
2.4.2. Pouvoir réducteur :	8
2.5. Les dérivés du lactose :	8
2.6. L'intolérance au lactose :	9
2.6.1. Les symptômes :	9
3. Les méthodes de dosage :	10
3.1. Polarimétrie :	10
3.2. Gravimétrie :	10
3.3. Infra-rouge :	10

3.4.	Enzymatique :	11
3.4.1.	NAD Enzymatique :	11
3.4.2.	pH différentiel :	11
3.5.	HPLC :	12
3.5.1.	Historique :	12
3.5.2.	Définition de la chromatographie.....	12
3.5.3.	Principe de la HPLC.....	12
3.5.4.	Appareillage	13
4.	Matériel et méthode :	18
4.1.	Echantillon de travail :	18
4.1.1.	<i>Lait reconstitué</i> :	18
4.2.	Plan de travail et d'échantillonnage :	18
4.3.	Méthode HPLC :	20
4.3.1.	Protocole :	20
4.3.1.2.	Limites des méthodes de détection du lactose	21
4.4.	Méthode enzymatique	22
4.4.1.	Presentation du kit – klolac magazyme :	22
4.4.2.	Avantages du K-LOLAC vis à vis des processus standards :	23
4.4.3.	Principe de kit klolac :	23
4.4.4.	Composition du kit k-lolac :	23
4.4.5.	PREPARATION DE SOLUTIONS REACTIVES/SUSPENSIONS :	24
4.4.6.	Préparation des réactifs :	24
4.4.7.	ÉQUIPEMENT (RECOMMANDÉ) :	25
4.4.8.	Préparation des échantillons :	25
4.4.9.	CALCULE :	28
4.5.	Les enzymes :	29
4.5.1.	MAXILACT (DSM food) LGi 5000 :	29

4.5.2.	Ha-Lactase (CHR-HANSEN) 5200 NLU/l :	29
4.5.3.	Nola fit (CHR-HANSEN) 5500 BLU/l :	29
5.	Résultat et discussion	32
5.1.	Analyse physico-chimique :	32
5.1.1.	Poudre de lait 0%	32
5.2.	Mesure de pH :	32
5.3.	Sans traitement enzymatique :	32
5.4.	Méthode enzymatique :	33
5.4.1.	Comparaison de trois enzymes à une dose de 1000 µl :	33
5.4.2.	Ha-Lactase	34
5.4.3.	Maxilact	35
5.4.4.	Nola fit 5500	36
5.4.5.	Différent concentration Maxilact VS Nola fit :	37
5.5.	La méthode d'HPLC :	38
	Conclusion :	40
I.	Ajustement de kit :	42
i.	Échantillons avec (A2-A1) supérieur à 0,300 ou (A3-A2) supérieur à 1,500 :	42
II.	PRÉPARATION D'ÉCHANTILLON :	42
i.	Dilution de l'échantillon : Table de dilution	42
	Référence bibliographique :	44
	Résumé :	48
	Abstract :	48

Liste des tableaux :

Tableau 1 : Composition moyenne du lait de vache (mathieu, 1998)	2
Tableau 2 : La composition minérale de lait de vache (Croguenne Thomas, 2008).....	3
Tableau 3 : Les principaux oligo-éléments (Croguenne Thomas, 2008).....	4
Tableau 4 : Le pouvoir sucrant de différent carbohydrate (Croguenne Thomas, 2008)	7
Tableau 5 : Les types de l'intolérance au lactose (Ibrahim & Gyawali, 2013).....	9
Tableau 6 : Les résultat d'analyse physico-chimique	32
Tableau 7 : Mesure de pH.....	32

Liste des figures :

Figure1 : Structure biochimique du lactose (Ibrahim & Gyawali, 2013)	5
Figure 2 : la synthèse du lactose (Pougheon 2001).	6
Figure 3 : la digestion par lactase (JoëlScher, September 2012)	6
Figure 4 : la digestion bactérienne (cas de déficience en lactase) (JoëlScher, September 2012)	7
Figure 5 : principaux dérivés du lactose (Croguenne Thomas, 2008).	9
Figure 6 : Principe de fonctionnement d'une chaîne HPLC (SAAD, 2013).....	13
Figure 7 : Les organes d'une chaîne HPLC (SAAD, 2013).....	13
Figure 8 :Mind Map du protocole de travail et d'échantillonnage	19
Figure 9 : l'appareille HPLC (Shimadzu Prominence – i (LC – 2030C 3D).....	20
Figure 10 : Chromatogramme HPAEC-PAD pour l'analyse d'un lait «sans lactose» (Bray Business,M,2017)	21
Figure 11 : Les voies biochimiques des principaux kits de tests enzymatiques disponibles sur le marché et utilisés pour doser le lactose dans le lait et les produits laitiers d'après (Trani et al., 2017).	22
Figure 12 : le kit séquentiel dosage enzymatique du lactose K-LOLAC(Bray Business,M,2017)	22
Figure 13 : Les 3 enzymes (Maxilact , Ha-lactase et Nola fit).....	30
Figure 14 : Température vs. Activité relative pH :6.5 Dosage : 800 NLU/l Substrat perméat de sérum (5% lactose)	30
Figure 15 : Quantité de lactose restant g/L selon différente enzyme	34
Figure 16 : Quantité de lactose restant g/L selon différente doses Ha-lactase	35
Figure 17 :Quantité de lactose restant g/L selon différente doses de Maxilact	35
Figure 18 :Quantité de lactose restant g/L selon différente doses Maxilact.....	36
Figure 19 : Quantité de lactose restant g/L selon différente doses Maxilact vs Nola fit	37
Figure 20 : Résultat qualitatif de l'HPLC	38

Liste des abréviations :

ATP : Adénosine triphosphate

BLU : Bifido lactase units

CO₂ : Dioxyde de carbone.

g/l : Gramme par litre .

G6-PDH : Glucose-6-phosphate déshydrogénase

GOX : glucose oxydase.

H₂ : Hydrogène.

HK : Hexokinase.

HPAEC : la chromatographie par échange d'ions à haute performance.

HPLC : high performance liquid chromatography.

IR : Indice de réfraction.

Kg : Kilogramme.

Mg : Milligramme.

Mmol : Milli mole.

NAD : Nicotinamide –adénine dinucléotide.

NADP : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate.

NAPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate.

nm : Nanomètre.

PAD : Détection ampérométrique pulsée.

PGDH : Hydroxyprostaglandin dehydrogenase.

pH : Potentiel hydrogène.

p/p : Proportion poids/poids.

P/V : proportion poids / volume.

HPAEC-PAD : Chromatographie ionique avec détecteur par ampérométrie pulsée

uM : micromole.

UV : ultra-violet.

Revue

Bibliographique

Introduction

Introduction

L'Algérie est un pays de tradition laitière. Le lait et les produits laitiers occupent une place prépondérante dans la ration alimentaire des algériens.

Le lait est un complexe nutritionnel qui contient des substances différentes qui sont en solution, en émulsion ou en suspension dans l'eau, le lactose est le glucide principal dans le lait, présente la source d'énergie des jeunes enfants.

Près de 65% de la population mondiale est intolérante au lactose, ce dernier causé par le déficit enzymatique de la lactase intestinale qui dégrade le lactose (disaccharide) en glucose et galactose. L'enzymes responsable de cette dégradation située dans la bordure en brosse intestinale, chez la plupart des adultes l'activité de la lactase diminue après l'enfance.

Dans le marché, il existe des laits et produits laitier dé lactosé par la β galactosidase commerciale isolée de la levure comme *Klyveromyces Lactis* ou bien des bactéries comme *Bifidobacterium Bifidum*, grâce à ces enzymes les concentrations de lactose dans les produits peuvent être réduite à $< 0,01$ %.

Il existe nombreuses méthodes et techniques pour déterminer le taux d'hydrolyse du lactose parmi ces méthodes il existe : la méthode gravimétrique, infra-rouge, polarimétrique, mais les plus rapides et spécifiques sont la méthode enzymatique, et l'HPLC.

1. Lait

Le lait était défini en 1908 au cours du congrès international de la répression des fraudes à Genève comme étant " Le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée " (Pougheon 2001) . Le lait est un liquide blanc, opaque, de saveur légèrement sucrée, constituant un aliment complet et équilibré, sécrété par les glandes mammaires de la femme et par celles des mammifères femelles pour la nutrition des jeunes (aboutayeb, 2009).

1.1. Composition du lait :

Tableau 1 : Composition moyenne du lait de vache (mathieu, 1998)

Constituant du lait	Teneur en gramme par litre
Constituant minéraux	
Eau	902
Constituant salins minéraux	6,9
Gaz dissous	0,1
Constituant organique	
Constituant salinorganique	1,7
Lactose	49
Matière grasse	38
Protéine	
Caséine	32
Protéines dites soluble	26
Constituants azotes non protéique	6

1.1.1. L'eau :

L'eau est le constituant le plus important du lait, en proportion. La présence d'un dipôle et de doubles d'électrons libres lui confère un caractère polaire. Ce caractère polaire est ce qui lui permet de former une solution vraie avec les substances polaires telles que les glucides, les minéraux et une solution colloïde avec les protéines hydrophiles du sérum. Puisque les matières grasses possèdent un caractère non polaire, elles ne pourront se dissoudre et formeront une émulsion du type huile dans l'eau (Carole Lapointe-Vignola, 2002).

1.1.2. La matière grasse :

La matière grasse du lait est majoritairement présente sous forme de globules gras de diamètre compris entre 0,2 et 15 μm (Jeantet Romain, 2006). Les matières grasses du lait se composent principalement de triglycérides, de phospholipides et d'une fonction insaponifiable constituée en grande partie de cholestérol et de β -carotène (Carole Lapointe-Vignola, 2002).

1.1.3. Glucides :

Le lait contient des glucides libres dont le principal est le lactose et des glucides associés aux protéines. La concentration en lactose dans les laits de mammifère est inversement proportionnelle à la teneur en minéraux avec lesquels il participe à l'équilibre de la pression osmotique (Jeantet Romain, 2006).

1.1.4. Protéines :

Le lait de vache contient 3,2 à 3,5 % (p/p) de protéines réparties en deux fractions distinctes :

- Les caséines qui précipitent à pH 4,6 représentent 80% des protéines totales.
- Les protéines sériques, soluble à pH 4,6, représentent 20% des protéines totales. (Jeantet Romain, 2006)

1.1.5. Les minéraux du lait et les oligo-éléments :

a) Les minéraux :

Le lait contient une grande partie des minéraux indispensables à l'organisme (calcium, phosphore, magnésium, sodium, potassium).

La composition minérale de lait de vache présenter dans **Tableau 2** ci-dessous: (Croguenne Thomas, 2008)

Tableau 2 : La composition minérale de lait de vache (Croguenne Thomas, 2008).

Élément minéraux	Concentration ($mg.kg^{-1}$)	Concentration ($mmol.kg^{-1}$)
Calcium	1043-1283	26 -32
Magnésium	97-146	4 -6
Phosphate inorganique	1805-2 185	19 -23
Phosphore total	930-992	30 -32
Citrate	1323-2 079	7 -11
Sodium	391-644	17 -28
Potassium	1212-1 681	31 - 43
Chlorure	772-1 207	22- 34

b) Les oligo-éléments :

Le lait en contient également de nombreux : zinc, cuivre, iode, manganèse, sélénium, etc... La plupart sont présents à l'état de trace (Croguenne Thomas, 2008).

Les principaux oligo-éléments d'intérêt nutritionnel présenté dans le **Tableau 3**

Tableau 3 : les principaux oligo-éléments (Croguenne Thomas, 2008).

Les oligo-éléments	Lait de vache
<i>Zinc</i>	<i>3800</i>
<i>Fer</i>	<i>460</i>
<i>Cuivre</i>	<i>150</i>
<i>Manganèse</i>	<i>30</i>
<i>Iode</i>	<i>80</i>
<i>Sélénium</i>	<i>30</i>

1.1.6. Les enzymes :

Les enzymes du lait proviennent du sang, de la membrane du globule gras constituée en partie d'élément membranaires des cellules sécrétrices, des somatiques et des microorganismes. Les principales enzymes du lait peuvent être classées en deux groupes, les hydrolases et oxydo-réductases (Croguenne Thomas, 2008)

2. Lactose :

Le lactose est glucide essentiel du lait maternel, du lait de vache et de la plupart des lait industriels 1^{ère} âge, découvert en 1633 dans les produits laitiers. Il fournit à lui seul 30 à 35 de l'apport énergétique des trois premiers mois de vie. Il constitue ainsi le principal nutriment que l'intestin du nouveau-né doit ingérer et absorber (Chevallier, Fagnou, & Chouchana, 1996).

2.1. Structure :

Le lactose est un disaccharide constitué de D- galactose et de D-glucose reliés par une liaison osidique β (1-4) (β -D-galactopyranosyl (1-4) D-glycopyranose [α ou β]) (Croguenne Thomas, 2008)

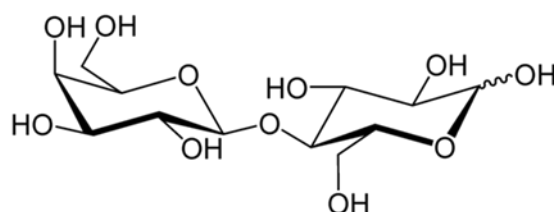


Figure1 : Structure biochimique du lactose (Ibrahim & Gyawali, 2013) .

L'établissement de la liaison osidique mobilise le groupement hydroxyde porté par le carbone anomérique (C1) du résidu galactose qui de ce fait perd sa propriété réductrice. Ainsi, dans la molécule de lactose, seul le glucose conserve sa fonction réductrice. La structure hémiacétal du résidu glucose conduit à un équilibre en solution entre les deux anomères α et β qui diffèrent par la configuration de leur carbone anomérique (C1 du résidu glucose) (Croguenne Thomas, 2008)

2.2. La synthèse du lactose :

Le lactose est synthétisé dans les cellules des acini à partir du glucose sanguin. Celui-ci est en grande partie produit par le foie, qui pour ce faire, utilise une partie de l'acide propionique résultant des fermentations dans le rumen, un des compartiments de l'estomac des ruminants, de certains constituants des repas des repas de la vache tels l'amidon. Il provient aussi pour une faible part de l'hydrolyse des sucres ingérés. Saccharose par exemple, qui passent dans le sang au travers de la paroi intestinale.

Les cellules lactogènes ont la faculté d'isomériser, autrement dit de transformer, une partie du glucose prélevé en galactose, d'unir leurs molécules et ainsi de produire du lactose. Celui-ci est ensuite transféré jusqu'à l'alvéole de l'acinus par les vacuoles de l'appareil de golgi des cellules lactogènes (mathieu & guy, 1998).

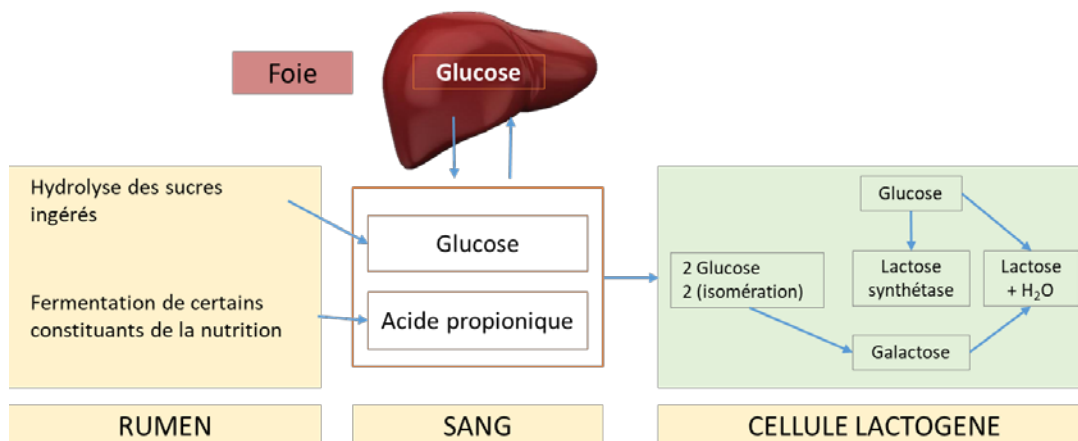


Figure 2 : la synthèse du lactose (Pougheon 2001).

2.3. La digestion du lactose :

2.3.1. Digestion par lactase intestinale :

Le lactose ingéré est hydrolysé par une lactase (la bêta- galactosidase neutre) produite par l'expression du gène de la lactase-phlorizin hydrolase, enzyme située au niveau de la partie externe de la membrane microvillositaire (bordure en brosse de la cellule intestinale), à l'extrémité des villosités intestinales. L'activité de cette enzyme est plus élevée dans le jéjunum et dans l'iléon distal (Chevallier et al., 1996).

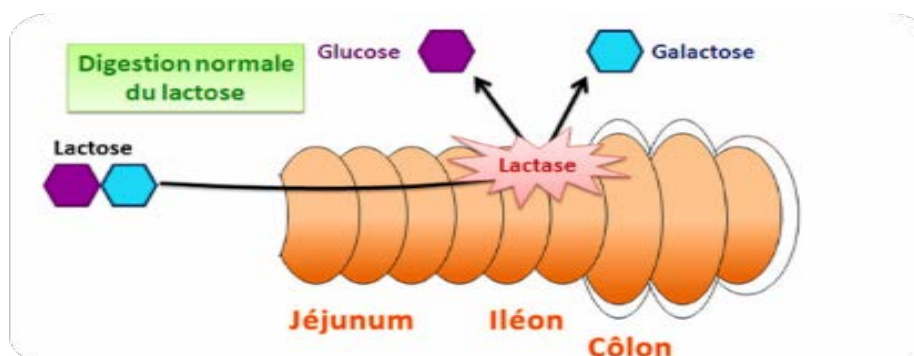


Figure 3 : la digestion par lactase (JoëlScher, September 2012)

2.3.2. Digestion bactérienne :

La fraction de lactose non digéré parvenant au niveau du côlon est physiologiquement rapidement fermentée par la flore colique. Les voies biochimiques de cette fermentation sont multiples et dépendent des genres microbiens et des espèces pré-dépendent des genres microbiens et des espèces présentes. Elles conduisent à la production de lactate, d'acide gras volatils et de gaz (H₂, CO₂). Ces gaz et le volume liquidien accompagnant le lactose (du fait de son pouvoir osmotique) entraînent des symptômes d'intolérance (borborygmes, ballonnements).

Cette fermentation colique permet la plupart du temps de diminuer la charge osmotique dans le côlon. Mais quand cette dernière est dépassée, elle aboutit à une diarrhée "malgré fermentation (Marteau & Marteau, 2005).

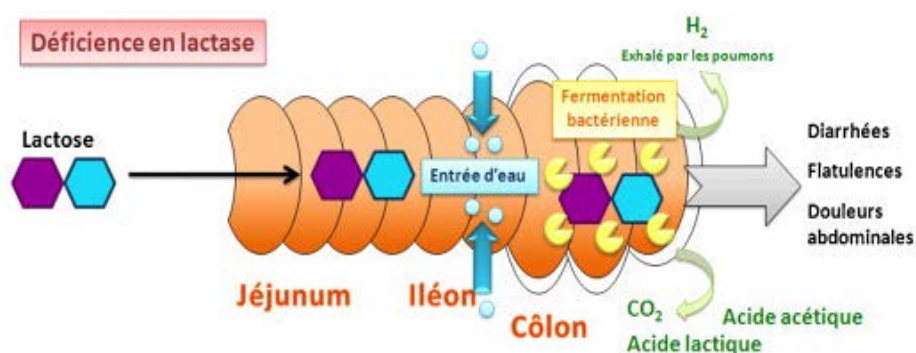


Figure 4 : la digestion bactérienne (cas de déficiency en lactase) (JoëlScher, September 2012)

2.4. Propriété physicochimique du lactose :

2.4.1. Pouvoir sucrant :

Le pouvoir sucrant du lactose est faible. En solution modèle il n'est que le tiers de celui d'une solution de saccharose et le quart de celui d'une solution de fructose.(Croguenne Thomas, 2008)

Tableau 4 : le pouvoir sucrant de différent carbohydrate (Croguenne Thomas, 2008)

Carbohydrate	Pouvoir sucrant relatif
Saccharose	1,0 (référence)
Fructose	1,3
Glucose	0,7
Galactose	0,6
Lactose	0,3

Selon (Croguenne Thomas, 2008) Le pouvoir sucrant varie en fonction de nombreux paramètres :

- La concentration lorsque la concentration en glucide augmente l'écart relatif entre leur pouvoir sucrant diminue.
- La température (la sensation sucrée est accentuée à froide).
- Les associations a d'autre substances (sels, acides, autres glucides, ect).
- La stéréochimie du lactose (pouvoir sucrant du lactose β est supérieur à celui du lactose α).

(Croguenne Thomas, 2008) monter que le pouvoir sucrant du lactose est amélioré par sonhydrolyse partielle ou totale en glucose et galactose, ce qui est réalisé pour lutter par exemple contre les problèmes d'intolérance.

2.4.2. Pouvoir réducteur :

Le lactose est un sucre réducteur du fait de la présence d'un groupe aldéhyde libre, contrairement au saccharose, ce pouvoir augmente suite à l'hydrolyse puisque le glucose possède un pouvoir réducteur supérieur et que s'y ajoute celui du galactose (Pougheon & Goursand, 2001).

2.5. Les dérivés du lactose :

L'hydrolyse, l'oxydation, la réduction, l'isomérisation, la condensation sur groupements aminés ou la fermentation sont autant de voies qui permettent de transformer le lactose et ainsi d'augmenter son champ d'application.

Par ailleurs , le lactose peut servir de substrat pour la production en condition aérobie de biomasse (levure) ou d'enzymes microbiennes (Croguenne Thomas, 2008).

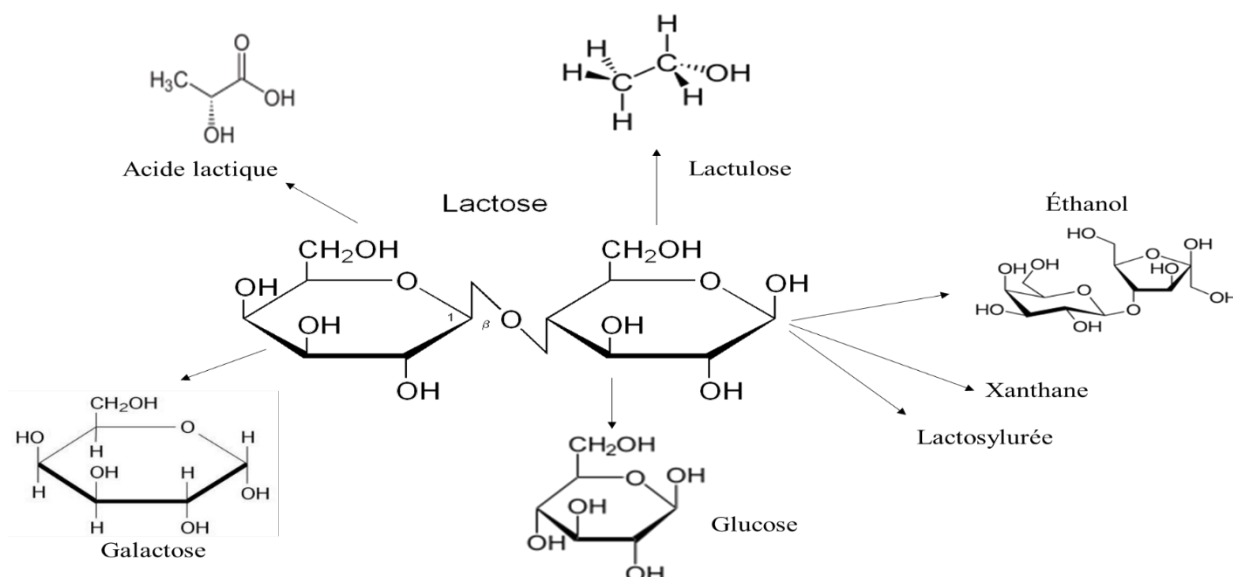


Figure 5 : principaux dérivés du lactose (Croguenne Thomas, 2008).

2.6. L'intolérance au lactose :

L'intolérance au lactose est une incapacité de digérer le sucre du lait. C'est-à-dire de le scinder sous l'action d'une lactase en glucose et galactose. Lorsque le lactose n'est pas hydrolysé, il n'est pas absorbé et l'intestin grêle le délivre au côlon où il est fermenté avec production d'acide organique et de gaz comme le gaz carbonique et l'hydrogène (Dupont, 1995).

Il existe 3 différents types d'intolérance au lactose, ces derniers sont présentés dans le Tableau 5 :

Tableau 5 : les types de l'intolérance au lactose (Ibrahim & Gyawali, 2013).

Type	Pathogénèses
Primaire	Réduction génétiquement prédéterminée de l'activité enzymatique pendant l'enfance ou l'adolescence.
Secondaire	Incapacité temporaire à digérer le lactose causée par une affection qui entraîne une lésion de la muqueuse intestinale ou une réduction de la surface muqueuse fonctionnelle .
Congénitale	Activité enzymatique absente du moment de la naissance.

2.6.1. Les symptômes :

Les symptômes, générés par l'arrivée dans le côlon du lactose non hydrolysé. Sont nombreux : douleur abdominale, météorisme, flatulence, diarrhée, nausée, mais aussi céphalée et constipation (Dainese-Plichon, Schneider, Piche, & Hébuterne, 2014)

Revue bibliographique

3. Les méthodes de dosage :

La détection du lactose est très importante en raison des maladies d'intolérance au lactose. Il est donc important de quantifier le lactose avec précision dans ces produits. La méthode choisie doit être économique, rapide et sensible. Un nombre considérable de méthodes pour déterminer les glucides dans le lait a été mis au point, y compris des méthodes plus anciennes et moins sensibles, comme l'analyse gravimétrique, polarimétrique, enzymatique ou spectrophotométrique, ainsi que des méthodes plus spécifiques et plus sensibles comme HPLC-RI et HPAEC-PAD (Gambelli, 2017).

Les méthodes les plus courantes utilisées pour quantifier le lactose dans le lait sont décrites ci-dessous :

3.1. Polarimétrie :

La méthode polarimétrique est basée sur la mesure de la rotation spécifique de la lumière polarisée par des molécules chirales telles que le lactose dans un filtrat de lait écrémé et déprotéiné.(Gambelli, 2017)

3.2. Gravimétrie :

Les méthodes gravimétriques sont fondées sur la diminution du sulfate de cuivre en oxyde cuivreux précipité par l'addition d'hydroxyde de potassium en présence d'aldoses et de cétooses. La teneur en lactose est calculée après pesée de l'oxyde cuivreux formé, à l'aide de tableaux empiriques qui permettent la conversion de l'oxyde cuivreux formé en lactose (Gambelli, 2017)

3.3. Infra-rouge :

Les méthodes spectroscopiques infrarouges sont basées sur l'absorption de l'énergie infrarouge par les groupes hydroxyles (OH) des molécules de lactose. La détermination du lactose dans l'infrarouge moyen (MIR) est effectuée à 1042 cm^{-1} . Les premiers instruments étaient entièrement basés sur des filtres, utilisant des paires (échantillon et référence) de filtres optiques pour sélectionner une bande de longueurs d'onde de mesure de la graisse, des protéines et du lactose (Gambelli, 2017).

(Gambelli, 2017) montre que les instruments plus récents utilisent un interféromètre pour acquérir des informations spectrales complètes dans la région MIR en utilisant la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) ; de cette façon, il est possible d'obtenir des capacités étendues de calcul et de manipulation de données.

3.4. Enzymatique :

Un grand nombre de méthodologies enzymatiques capables de quantifier le lactose ont été rapportées. Ils ont été caractérisés par la réaction commune de l'hydrolyse enzymatique du lactose en glucose et galactose, suivie de la détermination enzymatique de l'un des monosaccharides libérés. La quantité de lactose dans l'échantillon est donnée par la différence entre la teneur en monosaccharides avant et après l'hydrolyse.(Gambelli, 2017)

3.4.1. NAD Enzymatique :

La méthode enzymatique la plus utilisée pour mesurer le galactose est basée sur son oxydation par β -galactose déshydrogénase en acide galacturonique en présence de nicotinamide-adénine dinucléotide (NAD) qui est réduit en NADH, tel que rapporté par la réaction suivante :



L'absorbance du NADH à 340 nm est calculée comme la différence entre les lectures avant et après l'ajout de l'enzyme galactose déshydrogénase. Bien que cette méthode UV soit spécifique et précise, comme les mesures du NADH nécessitent une lecture dans le domaine UV, le remplacement du NAD par le Thio-NAD et la mesure dans le domaine visible à 405 ou 415 nm peuvent également être effectués. Cette variation permet de quantifier simultanément les concentrations de D-galactose dans plusieurs échantillons en utilisant des microplaquettes plutôt que des spectrophotomètres UV (Gambelli, 2017).

3.4.2. pH différentiel :

La technique du pH différentiel pour la détermination du lactose et de la lactulose dans les échantillons de lait est basée sur les changements de pH dus à des réactions enzymatiques. La détermination du lactose est effectuée en mesurant le changement de pH causé par la réaction du glucose et de l'ATP en présence d'hexokinase (HK) avant et après le traitement de l'échantillon avec β -galactosidase.

La détermination de la lactulose s'effectue en traitant l'échantillon avec un mélange de β -galactosidase et de glucokinase en présence d'ATP. Après 3 h, le changement de pH est mesuré, HK est ajouté et le changement de pH est surveillé pendant 4 h pour observer la formation de d-fructose-6-phosphate. (Gambelli, 2017)

3.5. HPLC :

3.5.1. Historique :

La première description de la méthode de séparation chromatographique est donnée dans le cadre d'une communication présentée en 1903 et a été appliquée en 1906. En 1930-31, la méthode est introduite en pratique dans les laboratoires par Kuhn et Elederer à Heidelberg en Allemagne. En quelques années, la chromatographie en phase liquide sur colonne devient une technique rendant possible de nombreuses découvertes concernant différentes disciplines.

En 1938, Reichstein introduit la chromatographie liquide pour séparer des substances incolores.

Avant les années 1970, un petit nombre de méthode chromatographique est utilisé dans les laboratoires. Ultérieurement, des colonnes ouvertes sont utilisées pour initier l'introduction de chromatographie liquide à haute performance (HPLC) dans la séparation des composés chimiques complexes.(SAAD, 2013)

3.5.2. Définition de la chromatographie

D'après (SAAD, 2013) La chromatographie est un ensemble de procédés applicables à des mélanges moléculaires ou ioniques, basés sur des différences de distribution des solutés entre une phase stationnaire et une phase mobile continue : les deux phases étant mises en contact intime et à contre-courant.

3.5.3. Principe de la HPLC

Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution d'abord, puis elle sera introduite dans la phase mobile liquide (éluant). Grâce à la répartition sélective des solutés entre la phase mobile et la phase stationnaire, chaque soluté est donc soumis à une force de rétention exercée par la phase stationnaire, et une force de mobilité due à la phase mobile. Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans un tube appelé colonne chromatographique (SAAD, 2013).

Revue bibliographique

HPLC System

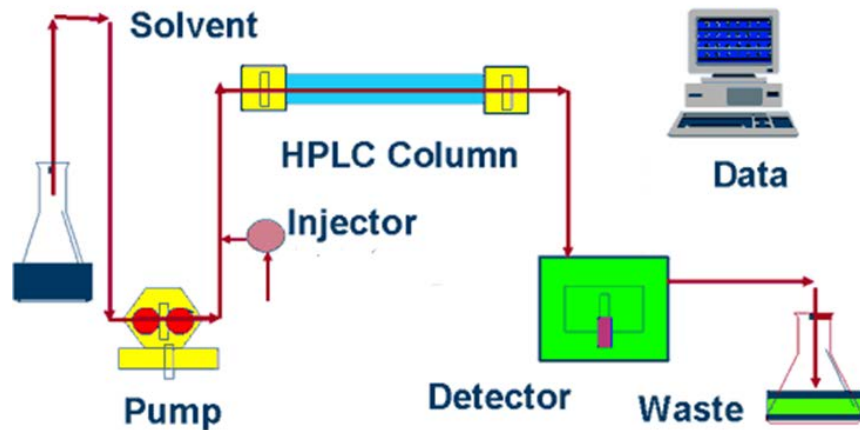


Figure 6 : Principe de fonctionnement d'une chaîne HPLC (SAAD, 2013)

(SAAD, 2013) montré que la phase mobile, poussée par une pompe sous forte pression, parcourt le système chromatographique. Le mélange à analyser est injecté puis transporté à travers le système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire. En sortie de colonne, grâce à un détecteur approprié, les différents solutés sont représentés par des pics. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme.

3.5.4. Appareillage

Les différentes composantes d'une chaîne HPLC sont présentées dans **Figure 7**. Tous les organes du système sont liés à un micro-ordinateur qui pilote tous les processus.

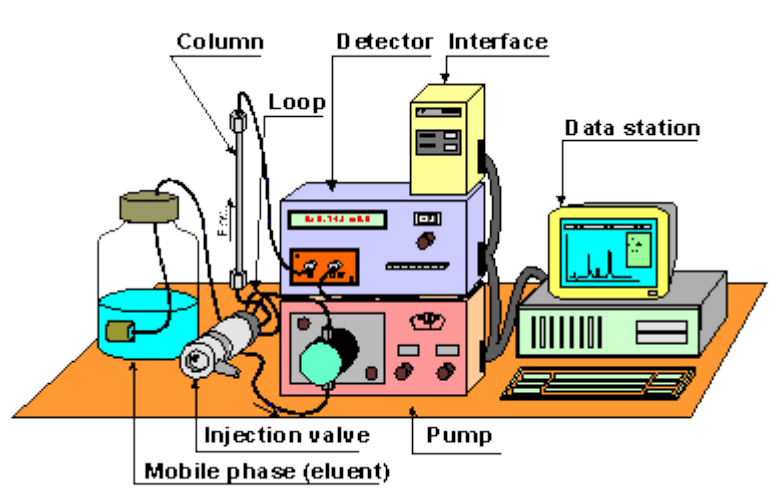


Figure 7 : Les organes d'une chaîne HPLC (SAAD, 2013).

L'appareillage se compose d'un réservoir contenant la phase mobile, d'un système de pompage, d'un injecteur, d'une colonne chromatographique (éventuellement thermostatée), d'un détecteur et d'un système d'acquisition des données (avec un logiciel pour traiter les signaux).(SAAD, 2013)

a) Le réservoir de la phase mobile :

Il contient la phase mobile en quantité suffisante. Plusieurs flacons d'éluant (solvant de polarités différentes) sont disponibles pour pouvoir réaliser des gradients d'éluant (mélange de plusieurs solvants à des concentrations variables) à l'aide de la pompe qui réalise le mélange demandé. (SAAD, 2013)

b) La pompe :

Elle doit fournir la phase mobile à un débit constant à une certaine pression pour atteindre la colonne. Elle permet de travailler soit :

- En mode isocratique, c'est à dire avec 100% d'un même éluant tout au long de l'analyse.
- En mode gradient, c'est à dire avec une variation des constituants du mélange d'éluant.

Les pompes actuelles ont un débit variable de quelques μL à plusieurs mL/min.

(SAAD, 2013) évoquent que la pression à imposer dépend des facteurs suivants :

- Débit de la phase mobile.
- Viscosité du modificateur organique.
- Taille des grains de la phase stationnaire.
- Géométrie de la colonne.

c) L'injecteur :

L'injection de l'échantillon se fait de deux manières :

- **Manuelle** : l'injecteur comporte une vanne à plusieurs voies montées sur le parcours de la phase mobile, juste avant la colonne. L'échantillon à analyser est introduit avec une micro-seringue dans un petit volume tubulaire appelé boucle ; l'échantillon est ainsi inséré avec un flux de phase mobile.
- **Automatique** : l'injection se fait automatiquement, l'injecteur utilisé comporte une vanne à boucle d'échantillonnage d'une capacité fixe, cette boucle permet d'introduire l'échantillon sans modifier la pression dans la colonne (SAAD, 2013).

d) La colonne :

La colonne est l'élément majeur de la chaîne HPLC. Le choix d'une colonne HPLC est lié aux paramètres suivants :

- Type de la phase stationnaire.
- Longueur.
- Diamètre des particules (dp).
- Débit de la phase mobile supportable.

(SAAD, 2013) évoquent que en chromatographie liquide à haute performance de phase inversée, la phase stationnaire est apolaire et la phase mobile modérément polaire, l'efficacité de remplissage est fortement affectée par la qualité du gel de silice de la phase stationnaire. On peut utiliser une colonne de type C18, qui a plusieurs avantages et est fréquemment utilisée pour les analyses des produits pharmaceutiques par HPLC.

La Phase stationnaire apolaire, est formée d'un gel de silice dans lequel on a greffé des fonctions chimiques le plus souvent de chaînes alkyles à 18 atomes de carbone, hydrophobes.

La phase stationnaire est maintenue entre deux disques frittés, on distingue deux types de phase stationnaire :

- **La phase stationnaire normale**

La phase normale est constituée de gel de silice. Ce matériau est très polaire. Il faut donc utiliser un éluant apolaire. Ainsi lors de l'injection d'une solution, les produits polaires sont retenus dans la colonne, contrairement aux produits apolaires qui sortent en tête (SAAD, 2013).

- **La phase stationnaire inversée**

La phase inverse est majoritairement composée de silice greffée par des chaînes linéaires de 8 ou 18 atomes de carbones (C8 et C18). Cette phase est apolaire et nécessite donc un éluant polaire tels que l'acétonitrile, le méthanol et l'eau. Dans ce cas, ce sont les composés polaires qui seront élués en premier. Contrairement à une phase normale, il n'y a pas d'évolution de la phase stationnaire au cours du temps, et la qualité de la séparation est donc maintenue constante.

L'augmentation du nombre de chaîne greffé par unité de surface fait diminuer le temps de rétention et augmenter la séparation des signaux ainsi que le facteur de la sélectivité. A des pH supérieurs à 8, les greffons se trouvent instables. Pour les composés ionisés, il faut ajuster le pH pour que les composés gardent leur forme neutre nécessaire à leur rétention par la colonne.

Revue bibliographique

Les gels de silice sont stables dans une grande gamme de pH mais ils ne supportent pas des pH trop extrêmes. Il y a des risques de dissolution pour des pH trop acides ou trop basiques, on se limite donc à la gamme de pH comprise entre 2 et 12. (SAAD, 2013)

e) Le détecteur

Le détecteur est relié à la sortie de la colonne. Les solutés en sortie de la colonne chromatographique sont en solution très diluée dans une phase éluant dont la nature et la composition varient d'une analyse à l'autre, de ce fait un détecteur est nécessaire puisqu'il permet de suivre en continu la séparation et de mesurer la concentration des solutés. Le choix d'un détecteur dépend à la fois des caractéristiques physiques des composés à séparer et des conditions opératoires. Le détecteur suit l'apparition des analytes. Le signal obtenu est enregistré en fonction du temps. (SAAD, 2013)

Il existe différents types de détecteurs : (SAAD, 2013)

- Détecteur UV-visible.
- Réfractomètre.
- Détecteur à fluorescence.
- Détecteur à barrette de diodes (DAD).

f) L'enregistreur

L'enregistreur reçoit un signal électrique proportionnel à la concentration de l'analyte qui traverse le détecteur. Ce signal est traité, amplifié puis utilisé pour tracer le chromatogramme. Pour qu'un pic soit exploitable, on considère généralement que le rapport signal / bruit doit être au moins de trois.

Le bruit se traduit par des oscillations plus ou moins marquées autour de la ligne de base, ce bruit de fond aléatoire provient de diverses causes :

- La variation de température.
- De la pression.
- L'instabilité électronique.

Par ailleurs on doit avoir une ligne de base aussi proche que possible de l'horizontale (SAAD, 2013)

Matériels et méthodes

4. Matériel et méthode :

Le lactose présente dans les produits lactés n'est pas absorbé tel quel par la muqueuse intestinale mais doit être préalablement hydrolysé en glucose et galactose par lactase.

Parmi les méthodes les plus rapides et spécifique pour la détermination du taux du lactose hydrolysé on'a la méthode enzymatique et HPLC.

4.1. Echantillon de travail :

4.1.1. Lait reconstitué :

Une quantité de 100 g de poudre du lait 0 % est dissoute dans une quantité d'eau distillée, ensuite mise sous agitation rapide, puis complétée avec l'eau jusqu'à atteindre 1 L. La préparation a été pasteurisée à une température de 80 C ° puis le contenu de flacon a été refroidi sous un courant d'eau froide.

Les essais ont été réalisés selon les instructions du manuel publié par le producteur, Me-gazym et la lecture a été effectué en utilisant un spectrophotomètre (JENWAY, ça, US) réglé à 340 nm.

4.2. Plan de travail et d'échantillonnage :

Le protocole général de l'expérimentation et d'échantillonnage est montré dans le Mind Map suivant **Figure 8** . Les tests ont été effectué en triplicata pour chaque essai.

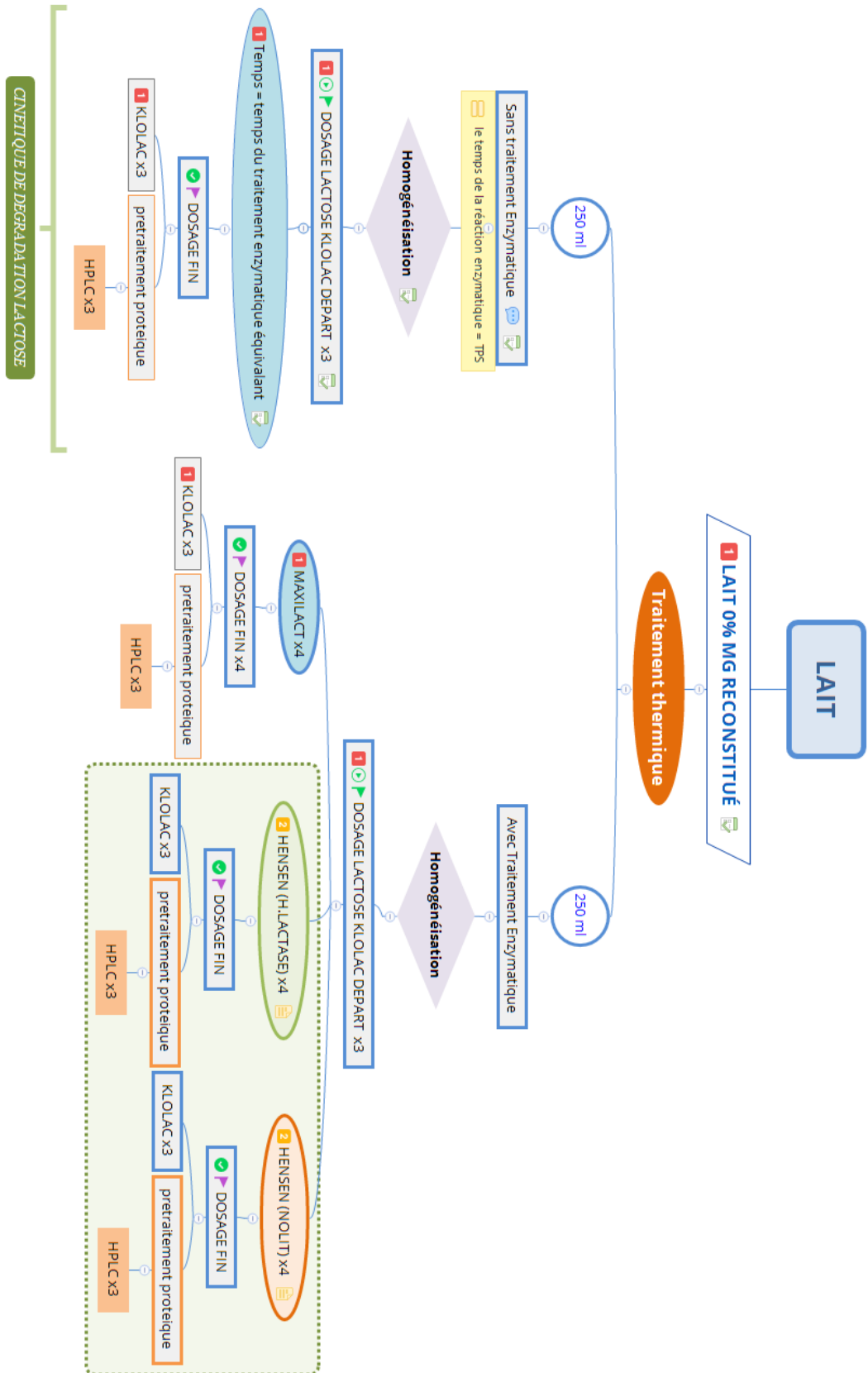


Figure 8 :Mind Map du protocole de travail et d'échantillonnage

4.3. Méthode HPLC :

Les analyses ont été réalisés à l'aide d'une Shimadzu Prominence – i (LC – 2030C 3D) ; composé de deux pompes LC-20ADxr, un auto-échantillonneur SIL-20ACxr, un four CTO-20AC, un détecteur SPD-M20A PDA et un système contrôleur CBM-20A. et une colonne : C8 25 cm x 4,6 mm, 5 μ m (RESTEK).

L'eau et l'acétonitrile acidité (pH=3) ont été utilisé comme phase mobile avec un gradient isocratique de 75% d'acétonitrile et un débit de 0.8 mL/min. Le lactose a été identifié selon le temps de rétention et le spectre UV. La quantification du lactose a été déterminée en utilisant la courbe d'étalonnage du standard.



Figure 9 : l'appareille HPLC (Shimadzu Prominence – i (LC – 2030C 3D))

4.3.1. Protocole :

4.3.1.1. Préparation des échantillons

Déproteïnisation

	Volume
Dans un tube d'ependorf de 1,5 ml introduire successivement	
L'eau distillé	900 μ l
Lait	500 μ l
Solution Carrez II	50 μ l
Solution Carrez I	50 μ l

Mode opératoire :

L'injection de 5 μ l de l'échantillon (surnagent clair) dans la boucle de l'injection à l'aide de la seringue. Le débit du solvant est fixé à 0,8 ml/min, et la durée de la chromatographie est de 30 min.

4.3.1.2. Limites des méthodes de détection du lactose

Les méthodes de détection typiquement utilisées pour l'HPLC (ELSD et RI) manquent de sensibilité, la chromatographie d'échange d'ions (HPAEC-PAD) est onéreuse en terme de fonctionnement et nécessite une expertise technique ; quant aux méthodes enzymatiques classiques, elles manquent de spécificité pour déterminer le lactose dans les échantillons réels.

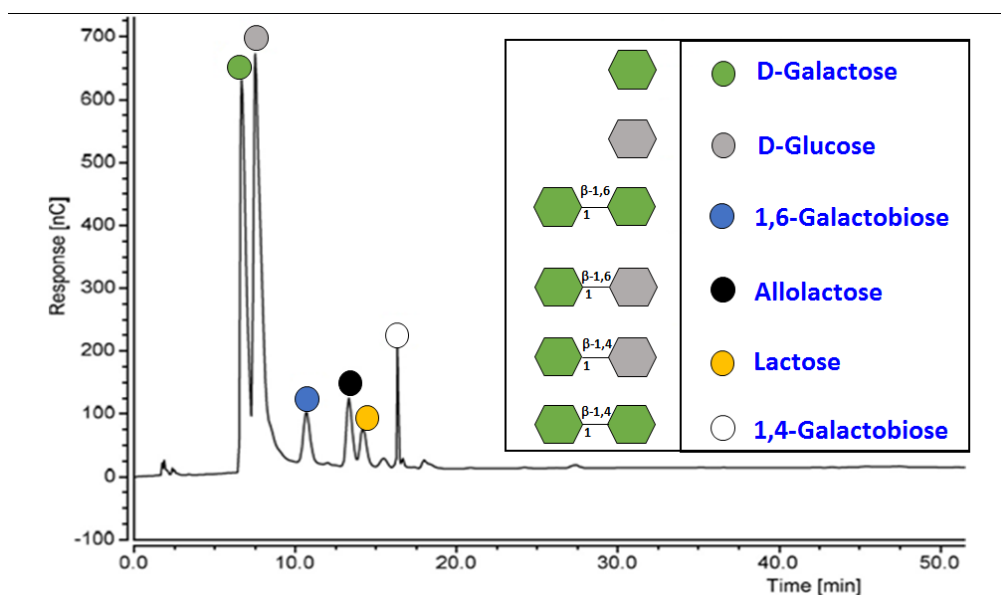


Figure 10 : Chromatogramme HPAEC-PAD pour l'analyse d'un lait «sans lactose» (Bray Business,M,2017)

4.4. Méthode enzymatique

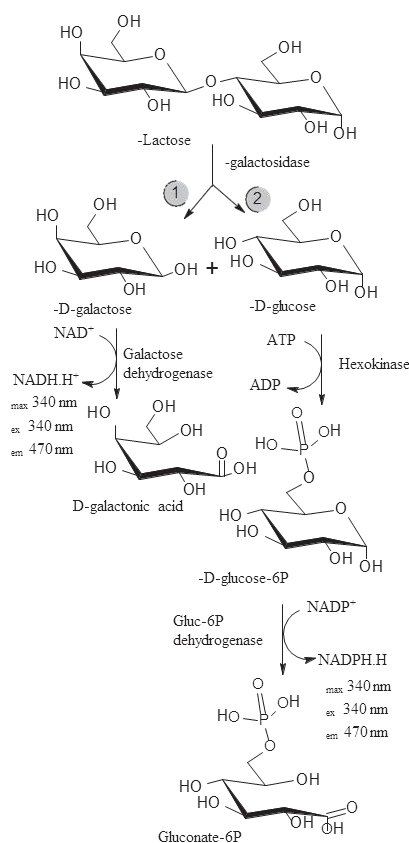


Figure 11 : Les voies biochimiques des principaux kits de tests enzymatiques disponibles sur le marché et utilisés pour doser le lactose dans le lait et les produits laitiers d'après (Trani et al., 2017).

4.4.1. Présentation du kit – klolac magazyme :

Est un kit séquentiel de dosage enzymatique du lactose utilisant une β -galactosidase hautement sélective, qui permet un dosage précis dans les produits sans lactose ou à faible teneur en lactose. Permettant ainsi un résultat avec des seuils de détection plus bas. (Bray Business, M,2017)



Figure 12 : le kit séquentiel dosage enzymatique du lactose K-LOLAC(Bray Business,M,2017)

4.4.2. Avantages du K-LOLAC vis à vis des processus standards :

- **EFFICACE** : 1^{er} est enzymatique séquentiel du lactose, ce qui réduit significativement le temps passé par les analystes à manipuler ainsi que le coût des réactifs.
- **SÉLECTIF** : Utilisation d'une β -galactosidase MZ104 qui hydrolyse le lactose plus sélectivement que toute autre méthode.
- **SENSIBLE** : Quantification du lactose à des seuils plus faibles que tout autre kit de dosage enzymatique disponible, indispensable pour les produits "low-lactose" et "lactose-free".
- **PRÉCIS** : Méthode incluant une pré-incubation (15 mn) supprimant le bruit de fond du glucose, ce qui permet un dosage rapide, précis dans les produits "low lactose" et "lactose-free". (Bray Business, M.2017)

4.4.3. Principe de kit klolac :

K-Lolac mesure en réalité l'absorbance du NADPH, produit issu de plusieurs réactions en chaîne à partir du glucose (*Figure 12*). Ce dernier est lui-même issu de l'hydrolyse du lactose par la bêta-galactosidase du kit. Un calcul permet ensuite de déterminer la quantité de lactose en fonction de l'absorbance du NADPH.

Pour éviter une surestimation, une étape de prétraitement élimine le glucose « libre » de l'échantillon. Ensuite, la MZ104, une β -galactosidase très sélective du lactose, le transforme en glucose.

4.4.4. Composition du kit k-lolac :

- Flacon 1** : Tampon A (8 mL, pH 8,0) avec Azoture de sodium (0,02 %) p/v) en tant que conservateur.
- Flacon 2** : Glucose oxydase (GOX) et catalase, lyophilisée poudre.
- Flacon 3** : Tampon B (8 mL, pH 7,6) avec l'Azoture de sodium (0,02 %) p/v) en tant que conservateur.
- Flacon 4** : NADP + plus ATP.
- Flacon 5** : Hexokinase plus glucose -6 -phosphate déshydrogénase + suspension de 6-phosphogluconate déshydrogénase (1,4 mL).

Flacon 6 : Suspension de β -galactosidase MZ104 (1,4 mL).

Flacon 7 : Solution étalon de lactose (5 mL, 0,25 mg/ml 0,02 % poids/volume d'azoture de sodium).

4.4.5. PREPARATION DE SOLUTIONS REACTIVES/SUSPENSIONS :

1. Utilisez le contenu du flacon 1 tel que fourni.
2. Dissoudre le contenu du flacon 2 dans 14 ml d'eau distillée.
3. Utilisez le contenu du flacon 3 tel que fourni.
4. Dissoudre le contenu du flacon 4 dans 4 ml d'eau distillée. Pour éviter les cycles répétés de congélation/décongélation, la quantité est divisée en aliquotes de taille appropriée et stockées dans des tubes tube à essai.

Stable pendant > 1 an à 4 ° C ou stable pendant > 2 ans à -20 ° C.

5 et 6. Utilisez le contenu des flacons 5 et 6 tel que fourni. Conservez ensuite les bouteilles dans une position verticale. Agiter la bouteille pour mélanger le contenu avant utilisation.

7. Utilisez le contenu du flacon 7 tel que fourni.

Remarque :

La solution étalon de lactose (flacon 7) est dosée uniquement en cas de doute sur la précision du spectrophotomètre utilisé ou lorsque l'on soupçonne que l'inhibition est provoquée par des substances présentes dans l'échantillon. Les interférences dans le test peuvent être testées en ajoutant une quantité connue de la solution étalon de lactose à l'échantillon avant la préparation de l'échantillon et en évaluant la récupération de celle-ci. (Bray Business, M.2017)

4.4.6. Préparation des réactifs :

4.4.6.1. Solution concentrée de Carrez I : 200 mL

Dissoudre 30 g d'hexacyanoferrate (II) trihydraté de potassium ($K_4 [Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$) (Sigma n° de catalogue 60279) dans 200 mL d'eau distillée. Stable pendant > 3 ans température ambiante.

4.4.6.2. Solution concentrée de Carrez II : 200 mL

Dissoudre 60 g de sulfate de zinc heptahydraté ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) (code Sigma n° 31665) dans 200 ml d'eau distillée. Stable pendant > 3 ans température ambiante.

4.4.6.3. Peroxyde d'hydrogène (~ 30 % p/p, n° de référence Sigma H1009) :

Utiliser tel que fourni. Stable pendant > 3 ans à 4 ° C.

4.4.7. ÉQUIPEMENT (RECOMMANDÉ) :

4.4.7.1. Verrerie :

- Flacon volumérique.
- Béchers.
- Microtubes de polypropylène de 1,5 ml.
- Tube en polypropylène.
- Microcuvette.
- Spatule
- Verre de montre.

4.4.7.2. Appareillage :

- Balance analytique (JA3003N)
- Mélangeur vortex. (Hanna Instruments)
- Bain-marie (Raypa)
- Micro centrifugeuse (SIGMA)
- Micropipette (20µl, 50 100 µl, 1000µl).
- Spectrophotomètre UV (JENWAY)
- Agitateur chauffant (Stuart).
- pH mètre .(Inolab)
- Haute à flux laminaire (Telstar AV-100)

4.4.8. Préparation des échantillons :

a) Déproteinisation (section A) :

	Volume
Pipetter dans un microtube de polypropylène de 1,5 mL	
<i>Eau distillée (à ~ 25°C)</i>	<i>0,90 ml</i>
<i>échantillon de lait</i>	<i>0,50 mL</i>
<i>Solution concentrée de Carrez II</i>	<i>0,05 mL</i>
<i>Solution concentrée de Carrez I</i>	<i>0,05 mL</i>

Boucher le tube, mélanger au vortex, puis centrifuger à 13000 tr/min pendant 10 min. Le surnageant est soigneusement pipeté pour l'utiliser dans la section B.

b) PRÉTRAITEMENT DE GLUCOSE OXYDASE/CATALASE :

	Volume
Pipetter dans un tube à essai de 13 mL	
<i>Eau distillée (à ~ 25 ° C)</i>	<i>0,40 mL.</i>
<i>Surnageant clair (de la section A)</i>	<i>1,00 mL</i>
<i>Solution 1 (tampon A)</i>	<i>0,10 mL</i>
<i>Suspension 2 (mélange GOX/catalase)</i>	<i>0,20 mL</i>
<i>Peroxyde d'hydrogène (30 % w/w)</i>	<i>0,10 mL</i>

Boucher immédiatement les tubes, mélanger le contenu sur un mélangeur vortex et incuber à température ambiante (~ 22 ° C) pendant 15 min.

Après 15 min, desserrer lentement le bouchon pour libérer la pression et resserrer. Incuber dans un bain d'eau bouillante à 100 ° C pendant 5 min.

Transférer la solution dans un tube à centrifuger de 1,5 mL et centrifuger à 13000 tr/min pendant 10 min.

Pipetter soigneusement 0,1 mL du surnageant clair pour l'utiliser comme « solution d'échantillon » dans la « réaction de détermination enzymatique » (section C).

c) RÉACTION DE DÉTERMINATION ENZYMATIQUE :

Longueur d'onde : 340 nm

Cuvette : trajet lumineux de 1 cm (verre ou plastique, 1,5 ml semi-micro)

Température : 25 ° C

Volume final : 1,17 mL (D-glucose) ; 1,19 mL (lactose)

Solution d'échantillon : 0,5-25 µg de D-glucose ou 1-50 µg de lactose par cuvette (dans un volume d'échantillon de 0,1-0,4 mL)

Lire contre l'air (sans cuvette dans le chemin de la lumière) ou contre l'eau.

Pipetter dans des cuvettes	Blanc	Échantillon
<i>Eau distillée (à ~ 25 ° C)</i>	1,00 mL	0,90 mL
<i>Solution d'échantillon B</i>	–	0,10 mL
<i>Solution 3 (tampon B)</i>	0,10 mL	0,10 mL
<i>Solution 4 (NADP +/ATP)</i>	0,05 mL	0,05 mL

Mélanger, lire les absorbances des solutions (A1) après environ 3 minutes et démarrer la réaction par addition de :

Pipetter dans des cuvettes	Blanc	Échantillon
<i>suspension 5 (HK/G-6-PDH/6 -PGDH)</i>	0,02 ml	0,02 ml

Mélanger et lire l'absorbance des solutions (A2) à la fin de la réaction (environ 10 min). Puis ajouter :

Pipetter dans des cuvettes	Blanc	Échantillon
<i>suspension 6 (β-galactosidase)</i>	0,02 ml	0,02 ml

Mélanger et lire l'absorbance des solutions (A3) à la fin de la réaction (~ 15 min). Si la réaction ne s'est pas arrêtée après 15 min, continuer à lire les absorbances à intervalles de 5 min jusqu'à ce que les absorbances restent les mêmes.

Pipetter dans des cuvettes	Blanc	Échantillon
<i>Eau distillée (à ~ 25 ° C)</i>	1,00 mL	0,90 mL
<i>Solution d'échantillon (voir section B, page 7)</i>	–	0,10 mL
<i>Solution 3 (tampon B)</i>	0,10 mL	0,10 mL
<i>solution 4 (NADP +/ATP)</i>	0,05 mL	0,05 mL

Mélanger, lire les absorbances des solutions (A1) après environ. 3 minutes et démarrer la réaction par addition de :

suspension 5 (HK/G-6-PDH/6 -PGDH)	0,02 mL	0,02 mL
-----------------------------------	---------	---------

Mélanger et lire l'absorbance des solutions (A2) à la fin de la réaction (environ 10 min). Puis ajouter :

suspension 6 (—galactosidase)	0,02 mL	0,02 mL
-------------------------------	---------	---------

Mélanger et lire l'absorbance des solutions (A3) à la fin de la réaction (~ 15 min). Si la réaction ne s'est pas arrêtée après 15 min, continuer à lire les absorbances à intervalles de 5 min jusqu'à ce que les absorbances restent les mêmes (réaction terminée ou continuer à augmenter de façon linéaire par rapport au temps, fluage **).

4.4.9. CALCULE :

- Déterminer la différence d'absorbance (A2-A1) pour le blanc et l'échantillon.
- Soustraire la différence d'absorbance de l'ébauche de la différence d'absorbance de l'échantillon, obtenant ainsi $\Delta A_{D-glucose}$.
- Déterminer la différence d'absorbance (A3-A2) pour le blanc et l'échantillon. Soustraire la différence d'absorbance de l'ébauche de la différence d'absorbance de l'échantillon, obtenant ainsi $A_{lactose}$. (Bray Business, M.2017)

Remarque :

D'après (Bray Business, M.2017) La valeur de $\Delta A_{lactose}$ doit, en règle générale, être d'au moins ~ 0,05 unité d'absorbance pour obtenir des résultats suffisamment précis. Alors que le dosage est linéaire jusqu'à un $\Delta A_{lactose}$ de 0,02, le degré d'erreur dans la mesure devient très significatif en dessous d'une absorbance de 0,05. La concentration de D-glucose et de lactose peut être calculée comme suit :

$$C = \frac{V \times PM}{\epsilon \times d \times v \times 2} \times F \times \Delta A$$

Avec :

V = Volume finale [ml]

PM	=	Poids moléculaire du D-glucose ou lactose [g/mol]
ϵ	=	Coefficient d'extinction du NADPH à 340 nm
	=	6300 [1 x mol ⁻¹ x cm ⁻¹]
d	=	Trajet de la lumière [cm]
v	=	Volume de l'échantillon [ml]
2	=	2 moles de NADPH produit pour chaque mole de D-glucose ou lactose
F	=	Facteur de dilution
	=	5,4 [pour toute préparation standard de lait liquide]
	=	

Dans le cas du lactose on obtient

$$C = \frac{1,17 \times 180,6}{6300 \times 1,0 \times 0,1 \times 2} \times F \times \Delta A_{Lactose}$$
$$= 0,3233 \times 5,4 \times \Delta A_{Lactose}$$

4.5. Les enzymes :

4.5.1. MAXILACT (DSM food) LGi 5000 :

Est une β -galactosidase (EC3.2.1.23) isolée à partir d'une souche sélectionnée de *Kluyveromyces lactis* qui est traitée de telle sorte qu'elle n'est plus présente dans le produit fini.

4.5.2. Ha-Lactase (CHR-HANSEN) 5200 NLU/l :

Est une β -galactosidase (EC3.2.1.23) neutre standardisée liquide hautement purifiée produite par fermentation sur un milieu végétal à l'aide d'une souche sélectionnée de *Kluyveromyces lactis* qui est traitée de telle sorte qu'elle n'est plus présente dans le produit fini.

4.5.3. Nola fit (CHR-HANSEN) 5500 BLU/l :

NOLA™ Fit 5500 est une β -galactosidase (EC3.2.1.23) de *Bifidobacterium bifidum* au large spectre standardisée liquide hautement purifiée produite par fermentation sur un milieu végétal à l'aide d'une souche sélectionnée de *Bacillus licheniformis* qui est traitée de telle sorte qu'elle n'est plus présente dans le produit fini. Le produit hydrolyse le lactose en un mélange de glucose et galactose. Le produit est une lactase haut de gamme adaptée à la production de laits fermentés et fromages et permet d'éviter les mauvais goûts typiquement associés au lait UHT et produits laitiers longue conservation sans lactose.

Contrairement à la lactase neutre habituellement produite par une levure, ce produit continue d'hydrolyser le lactose jusqu'à un pH de 4.5 environ. Elle conserve également une activité

élevée à la fois à des températures plus basses et plus hautes. L'activité du produit est exprimée en Bifido Lactase Units (BLU), selon une méthode propre à Chr. Hansen.

Dosage : 500-18000 BLU/l de lait

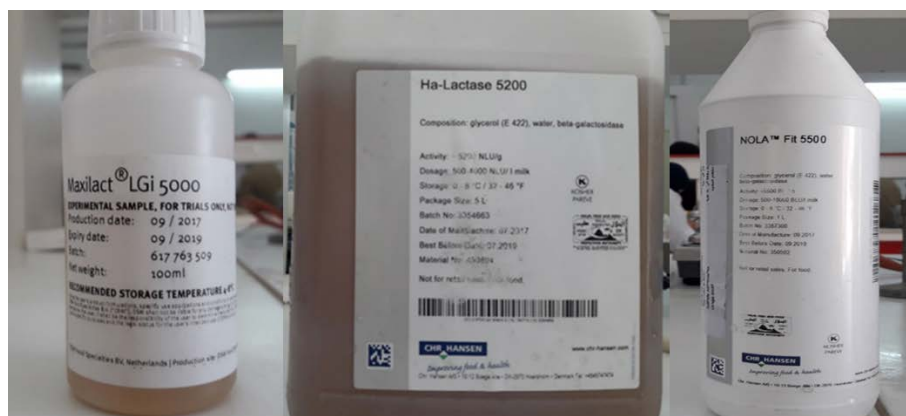


Figure 13: Les 3 enzymes (Maxilact , Ha-lactase et Nola fit)

4.5.3.1. Température/temps/dosage

Le degré d'hydrolyse souhaité peut être obtenu en utilisant la bonne combinaison temps, température et dosage pendant la réaction. La température optimale de Ha-lactase™ est comprise entre 35-45°C. Au-dessus de 50°C l'enzyme est dénaturé. La **Figure 14** illustre l'incidence de la température sur l'activité (substrat: perméat de sérum).

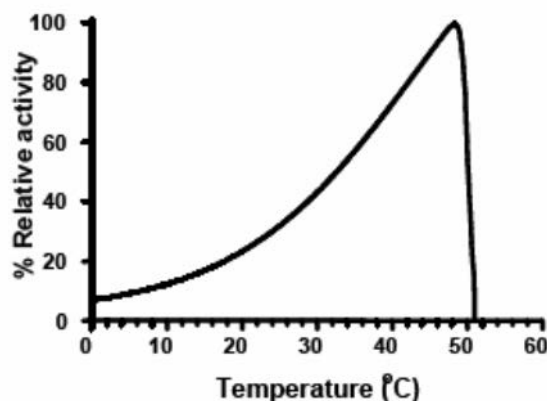


Figure 14 : Température vs. Activité relative pH :6.5 Dosage : 800 NLU/l Substrat perméat de sérum (5% lactose) (magazyme)

Il est souvent préférable de conduire l'hydrolyse à basse température afin de minimiser les risques microbiens.

Résultats et discussion

5. Résultat et discussion

5.1. Analyse physico-chimique :

5.1.1. Poudre de lait 0%

Tableau 6 : les résultat d'analyse physico-chimique

	MG %	Protéines %	Densité	ESD	% Eau
1	0	4	1039.6	105	0
2	0.04	4.08	1040.7	107	0
3	0.03	4.09	1040.6	107	0

5.2. Mesure de pH :

Tableau 7 : mesure de pH

Echantillon	pH
Sans traitement enzymatique	6,996
Maxilact	6,985
Nola fit	6,986
Ha- lactase	7,011

5.3. Sans traitement enzymatique :

La teneur en lactose mesuré dans l'échantillons du lait sans traitement enzymatique est de : $37,98 \pm 0,85$ g/l, selon (mathieu,1998) la valeur de lactose égale à 49 g/l.

5.4. Méthode enzymatique :

Les enzymes sont ajoutées dans le lait hydrolysent le lactose naturellement en utilisant de la β -galactosidase. et galactose sont les principaux sucres formés, mais les réactions de trans-glycosylation conduisent également à la formation d'une gamme de di- et trisaccharides. En effet, le taux de conversion est très rarement de 100 %. Tous dépend de la nature de l'enzyme, la concentration utilisée et les conditions de la réaction (T° et pH) .

Aussi les méthodes analytiques développées pour les produits laitiers "standards" ne sont pas réellement adaptées aux produits "lactose- free". C'est pour cela nous avons opté pour le nouveau kit K-LOLAC a été développé afin de répondre aux besoins des fabricants de produits à faible teneur en lactose ou sans lactose ([Brevet UK Application No. GB1710170.0](#)).

Les méthodes de détection typiquement utilisées pour l'HPLC manquent de sensibilité en terme de fonctionnement et nécessite une expertise technique pour déterminer le lactose dans les échantillons réels ;

5.4.1. Comparaison de trois enzymes à une dose de 1000 μ l :

L'utilisation d'une concentration fixe et à température de 4-6 C° avec un pH 7 durant toute la nuit pour les trois différentes enzymes à 1000 μ l/L a engendré une diminution significatives et respectives pour les échantillons traités par Maxilact 1,85 g/l, **Nola fit** 2,78, **Ha-lactase** 2,29 comme le montre la figure ci-dessous **Figure 15** . Et d'après ces résultats Maxilact est mieux que Nola fit et Ha-lactase, et par rapport à Nola fit et Ha-lactase, Ha-lactase est la meilleur, ces résultats montrent que les enzymes d'origine *klyveromyces lactis* donne des très bons résultats que les enzymes d'origines *Bifidobactérium* .

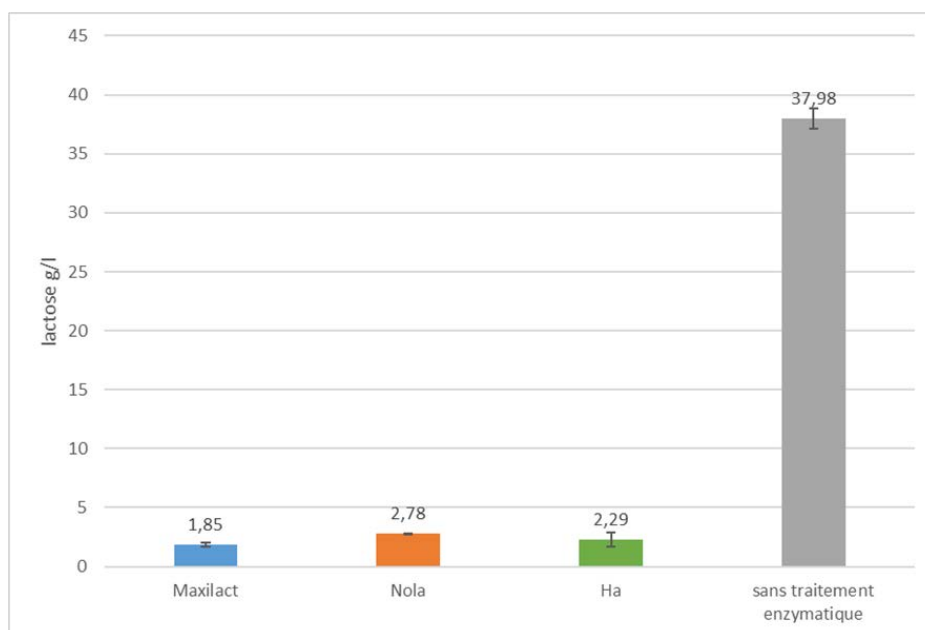


Figure 15 : Quantité de lactose restant g/L selon différente enzyme

5.4.2. Ha-Lactase

L'action de Ha-lactase a été dosé sur un échantillon de lait 0% et comparé avec un lait sans traitement enzymatique, donc la quantité de lactose diminué de 37,98 à 2,29 ce qui montre hydrolyse de lactose en D-glucose et D-galactose par l'enzyme Ha-lactase. Ces résultats sont prometteuse si on s'appuie sur les travaux réalisés et publié par le NIH National Institutes of Health (2010). Pour gérer l'intolérance au lactose, une quantité allant jusqu'à 12 grammes de lactose (1 verre de lait) est généralement bien tolérée alors nos résultats se rapproches d'une concentration inferieur de 0,2 g/L surtout pour la Maxilact *Figure 17* donc on rentre dans la gamme de free lactose.

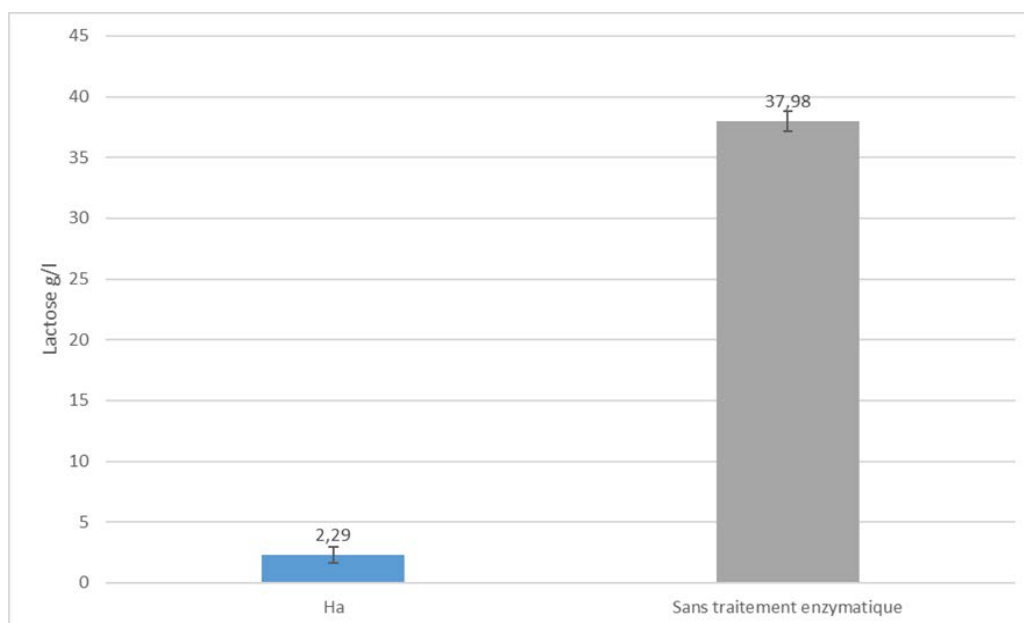


Figure 16 : Quantité de lactose restant g/L pour Ha-lactase et sans traitement enzymatique

5.4.3. Maxilact

Afin d'optimiser la concentration des enzymes utilisés, les résultats démontrent que la quantité de lactose diminue en fonction de concentration d'enzymes ensuite elle se stabilise à 1500 – 2000 μ l. cette stabilisation résulte d'inhibition de la β - galactosidase (Maxilact) par le D-Galactose (d'hydrolyse de lactose).

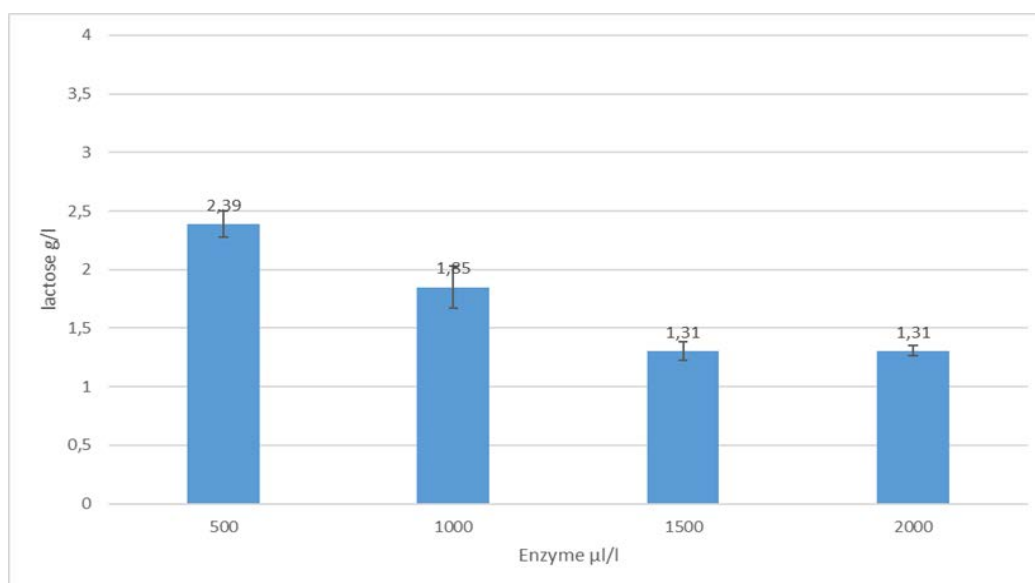


Figure 17 :Quantité de lactose restant g/L selon différente doses de Maxilact

5.4.4. Nola fit 5500

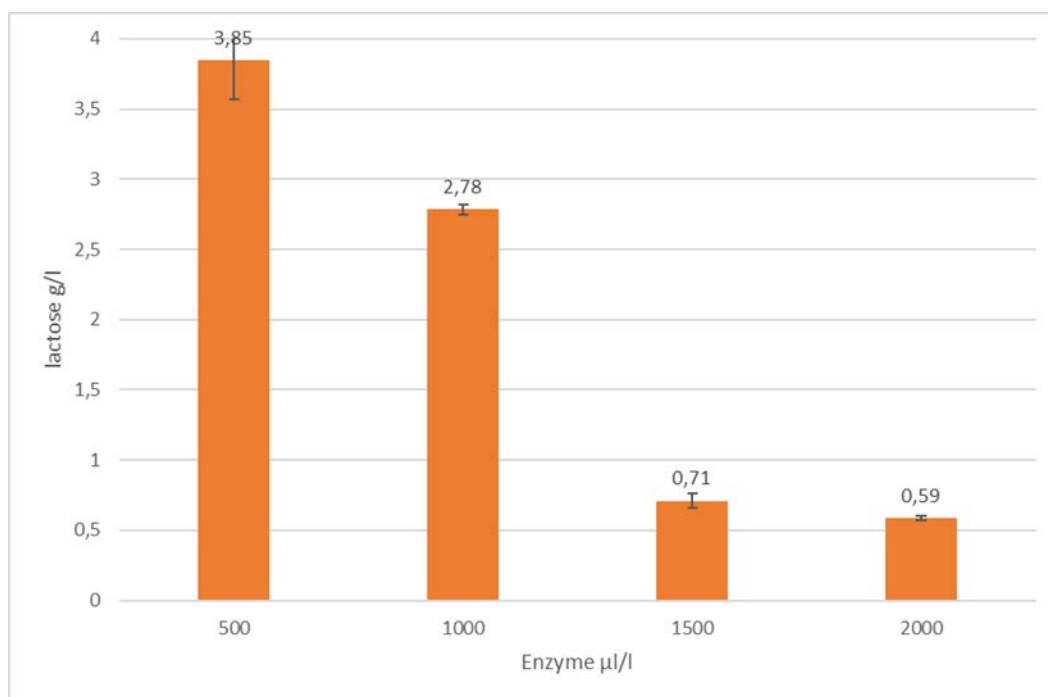


Figure 18 :Quantité de lactose restant g/L selon différente doses Nola fit

Selon les résultats, une diminution de quantité de lactose en fonction de la dose d'enzyme de Nola, puis une forte diminution de la quantité de lactose pour la dose de 1500 μl et 2000 μl , ensuit, elle se stabilise.

5.4.5. Différent concentration Maxilact VS Nola fit :

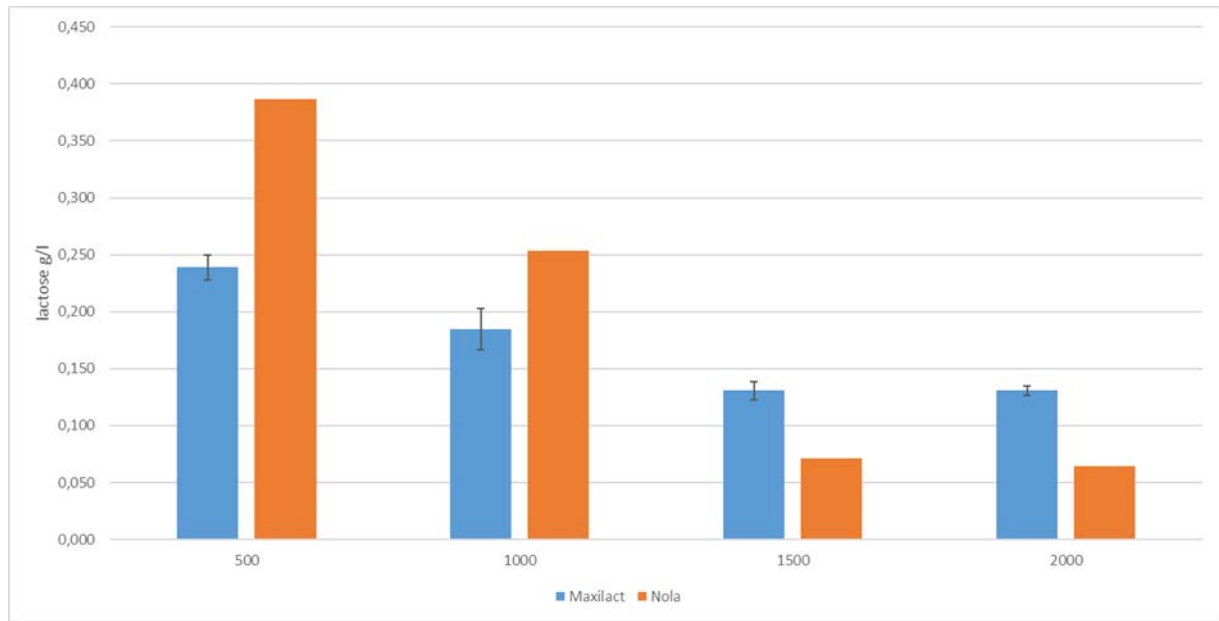


Figure 19 : Quantité de lactose restant g/L selon différente doses Maxilact vs Nola fit

Maxilact hydrolyse à des faibles quantités, selon cette étude, la quantité de lactose restante à dose de 500 µl et 1000 µl et mieux que Nola fit. Par contre Nola hydrolyse à des doses plus élevé et donne des très bons résultats que Maxilact.

5.5. La méthode d'HPLC :

Les méthodes de détection typiquement utilisées pour HPLC manque de sensibilité, cela ne nous a pas empêché de développer une nouvelle technique au niveau du laboratoire HPLC site III (Univ-Mosta), afin de comparer nos résultats.

Comme le montre la figure ci-dessous, le pic obtenu pour les différents enzymes concernant le lactose détecté est un résultat qualitatif. En attendant les résultats quantitatifs. Nous avons pu développer une méthode pour comparer nos résultats par rapport au méthode enzymatique K-LOLAC.

Les méthodes enzymatique classiques tels de Bertrand manquent de spécificité pour déterminer les concentrations du lactose dans les échantillons surtout quand il s'agit de faible concentration de lactose

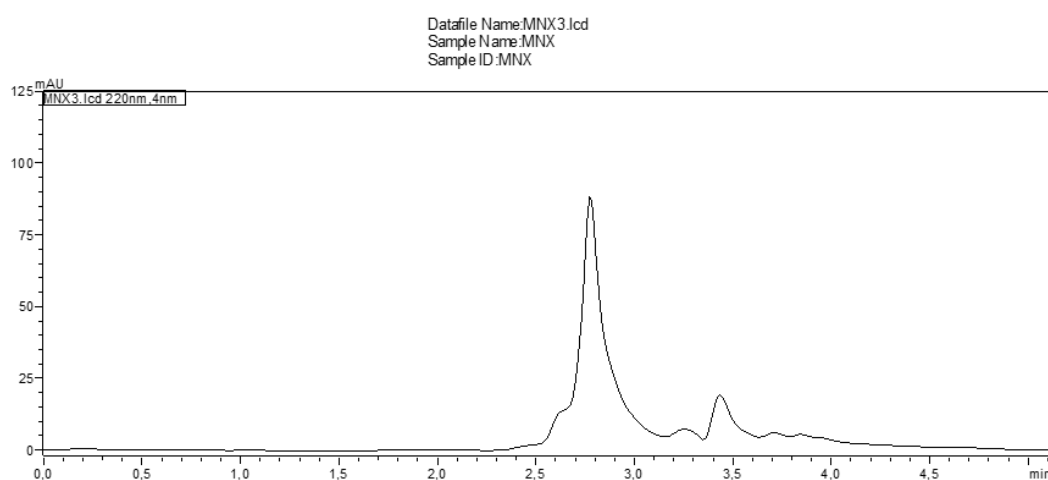


Figure 20 : Résultat qualitatif de l'HPLC .

Conclusion

Conclusion :

Certaines personnes digèrent mal le lactose contenu dans le lait car leur organisme ne produit plus ou pas suffisamment de lactase. Le lactose reste dans l'intestin sans avoir été digéré, ce qui peut entraîner des troubles gastro-intestinaux quelques minutes voire quelques heures après la consommation de lait.

La fabrication de lait et de produits laitiers appauvris ou exempts de lactose, une opportunité de gagner de nouveaux marchés dans des pays fortement concernés par sa «maldigestion» en Asie ou en Afrique. C'est la raison pour laquelle que les scientifiques dressent, dans la revue International Dairy Journal, un état des lieux des voies technologiques adaptées à la fabrication de tels produits.

La mise en œuvre d'une lactase (EC 3.2.1.23) sous forme libre a été proposée dès les années soixante-dix lorsque les premières bêta-galactosidases d'origine microbienne ont été mises sur le marché. Il s'agit classiquement d'enzymes issues de *Kluyveromyces lactis* ou de *K. fragilis*. De nombreuses autres enzymes ont également été proposées.

Pour limiter les développements microbiens intempestifs, les laits de consommation sont préférentiellement hydrolysés une douzaine d'heures à basse température.

Le but de cette étude était la détermination du taux de lactose hydrolysé. L'étude comprend deux parties :

- Dé lactosage de lait par trois enzymes différents
- Détermination du taux de lactose par une méthode classique HPLC et une méthode enzymatique kit K-Lolac (megazyme).

Les perspectives de poursuite de cette étude sont très larges car la recherche sur les produits laitiers sans lactose est très intéressante, parmi les perspectives :

- Lancer une étude de marché des produits sans lactose
- Étudier les possibilités de l'utilisation de Maxillact[®], Nola fit et Ha-lactase chez les industriels.
- Étudier l'intolérance au lactose
- Étudier les effets de température et de pH sur l'hydrolyse de lactose.

Annexe :

I. Ajustement de kit :

i. Échantillons avec (A2-A1) supérieur à 0,300 ou (A3-A2) supérieur à 1,500 :

Les recommandations pour retraiter les échantillons qui ont généré des différences d'absorbance (A2-A1) au-dessus de 0.300 ou (A3-A2) au-dessus de 1.500 lorsqu'ils sont traités selon la procédure de dosage standard (sections A, B et C) tableau ci-dessous. Les recommandations suggérées dépendent de la combinaison des deux valeurs d'absorbance générées :

(A2-A1)	(A3-A2)	Recommandation
> 0.300	<1.500	Répéter la « Préparation de l'échantillon » (section A) et augmenter la seconde incubation de la section B (glucose oxydase/catalase) à 30 min. Il s'agit d'une incubation suffisante pour éliminer jusqu'à 90 mg/ml de D-glucose de l'échantillon « Lait » d'origine (section A). Sinon, diluez l'échantillon d'origine avec de l'eau distillée et répétez la « Préparation de l'échantillon » (section A).
> 0.300	> 1.500	Diluez convenablement l'échantillon d'origine avec de l'eau distillée et répétez la « Préparation de l'échantillon » (section A).
<0.300	> 1.500	Diluer de façon appropriée l'échantillon après le prétraitement avec la glucose oxydase/catalase (section B) avec de l'eau distillée avant la « Réaction de détermination enzymatique » (section C) pour obtenir une différence d'absorbance (A3-A2) entre ~ 0,05 et ~ 1,500.

II. PRÉPARATION D'ÉCHANTILLON :

i. Dilution de l'échantillon : Table de dilution

La quantité de lactose présente dans la cuvette doit être comprise entre 1 et 50 ug (ou entre 0,5 et 25 ug pour le D-glucose), c'est-à-dire dans les 0,1 mL de l'échantillon analysé. La solution d'échantillon doit donc être suffisamment diluée pour donner une concentration en lactose comprise entre 0,01 et 0,50 g/L (ou entre 0,005 et 0,25 g/L pour le D-glucose).

Concentration estimée de D-glucose et / ou de lactose (g/L)	Dilution avec de l'eau	Facteur de dilution (F)
<0,05	Aucune dilution requise	1
0,05-0,5	1 + 9	dix
0,5-5	1 + 99	100
> 5	1 + 999	1000

Si la valeur de $\Delta A_{\text{Glucose}}$ et / ou $\Delta A_{\text{Lactose}}$ est trop faible (par exemple <0,05), préparer une solution échantillon plus concentrée. En variante, le volume d'échantillon à pipetter dans la cuvette peut être augmenté jusqu'à 0,4 mL et le volume d'eau distillée doit être réduit en conséquence de sorte que le volume final du dosage reste le même.

III. Considérations générales.

(a) **Échantillons liquides** : limpides, légèrement colorés et approximativement neutres, les échantillons liquides peuvent être utilisés directement dans le test.

(b) **Échantillons acides** : si plus de 0,1 mL d'un échantillon acide doit être utilisé non dilué, le pH de la solution doit être augmenté à env. 7,6 en utilisant NaOH 2 M, et la solution a été incubée à température ambiante pendant 30 minutes.

(c) **Dioxyde de carbone** : les échantillons contenant une quantité significative de dioxyde de carbone doivent être dégazés en augmentant le pH à env.

7.6 avec NaOH 2 M et agitation douce, ou en agitant avec une baguette de verre.

(d) **Echantillons colorés** : un échantillon blanc supplémentaire, c'est-à-dire un échantillon sans β -galactosidase, peut être nécessaire dans le cas d'échantillons colorés.

e) **Échantillons fortement colorés** : s'ils sont utilisés non dilués, les échantillons fortement colorés doivent être traités par l'ajout de 0,2 g de PVPP/10 mL d'échantillon. Agiter vigoureusement le tube pendant 5 minutes, puis filtrer à travers le papier-filtre Whatman n° 1.

(f) **Échantillons solides** : homogénéiser ou écraser les échantillons solides dans de l'eau distillée et filtrer si nécessaire.

Référence bibliographique :

A

Aboutayeb, r. (2009). technologie du lait et dérivés laitiers. *technologie du lait et dérivés laitiers*.

B

Bray Business, (2017). LACTOSE ASSAY PROCEDURE “Sequential Method” A Procedure for the Measurement of Lactose in Low-Lactose & Lactose-Free Dairy Products and in Conventional Dairy Products. Megazyme.

(Brevet UK Application No. GB1710170.0).

C

Carole Lapointe-Vignola. (2002). science et technologie du lait : transformation du lait. *science et technologie du lait : transformation du lait*.

Chevallier, B., Fagnou, C., & Chouchana, A. (1996). Intolérance au lactose chez le nourrisson. *Journal de Pédiatrie et de Puériculture*, 9(3), 137-141. doi:10.1016/s0987-7983(96)80017-x

Croguenne Thomas, J. R., Brulé Gérard. (2008). Fondements physicochimiques de la technologie laitière. 160 p.

D

- Dainese-Plichon,Schneider,Piche & Hébuterne, X. (2014). Malabsorption et intolérance au lactose chez l'adulte. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 28(1), 46-51. doi:10.1016/j.nupar.2013.12.002
- Dupont, C. (1995). Allergie aux protéines du lait de vache ou intolérance au lactose ? *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*, 35(3), 304. doi:10.1016/s0335-7457(05)80517-9

G

- Gambelli, L. (2017). Milk and Its Sugar-Lactose: A Picture of Evaluation Methodologies. *Beverages*, 3(4), 35. doi:10.3390/beverages3030035

I

- Ibrahim & Gyawali, R. (2013). Milk and Dairy Products in Human Nutrition: Production, Composition and Health. *Milk and Dairy Products in Human Nutrition: Production, Composition and Health*, 246-260. doi:10.1002/9781118534168.ch12

J

- Jeantet Romain , Schuck Pierre, Brulé Gérard. (2006). science des aliment : biochimie , microbiologie , procédés , technologie de produit laitérie. *science des aliment : biochimie , microbiologie , procédés , technologie de produit laitérie*.

JoëlScher,(September 2012). Lactose maldigestion: Clinical presentation and treatment *Médecine et nutrition*, 47(4), 201-209.

M

Marteau, A., & Marteau, P. (2005). Entre intolérance au lactose et maldigestion. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 40, 20-23. doi:10.1016/s0007-9960(05)80203-2

mathieu, & guy, (1998). produire du lait biologique : réussir la transition. *produire du lait biologique : réussir la transition*.

N

National Institutes of Health. [NIH Consensus Development Conference Statement: Lactose Intolerance and Health](#). *NIH Consensus State Sci Statements* 2010; Feb 24;27(2).

P

Pougheon , G. (2001). le lait , nutrition et santé. *le lait , nutrition et santé*.

Pougheon, S., & Goursand, J. (2001). Le lait: caractéristiques physicochimiques. In *lait, nutrition et santé*. . Paris: Tec et Doc. Lavoisier.

S

SAAD,(2013). *Étude de la séparation des fluoroquinolones par HPLC: Application à l'étude de leur dégradation par rayonnement gamma* (Mastère en chimie analytique), Université Tunis El Manar,

T

Trani, Gambacorta, Loizzo , Cassone, A., Fasciano, , Zambrini, , & Faccia, M. (2017). Comparison of HPLC-RI, LC/MS-MS and enzymatic assays for the analysis of residual lactose in lactose-free milk. *Food Chemistry*, 233, 385-390. doi:10.1016/j.foodchem.2017.04.134

Résumé :

L'intolérance au lactose provient d'un déficit en lactase. Le lactose non transformé par la lactase, se retrouve au niveau de l'intestin où il se fermente, cela entraîne des symptômes digestifs. Les personnes souffrant d'intolérance au lactose se sentent souvent mieux quand elles ajoutent des enzymes de lactase à leur régime alimentaire. Et pour cela on a décidé de faire un lait délactosé (sans lactose) pour les intolérants au lactose. Dans cette recherche on a utilisé trois enzymes différentes (Maxilact, Nola fit, Ha-lactase) puis déterminer le taux de lactose hydrolysé par une méthode classique HPLC et méthode enzymatique par l'utilisation d'un kit K-lolac. D'après les résultats ; Maxilact à une dose de 1000µl donne des très bons résultats par rapport à Ha-lactase et Nola fit . et concernant Maxilact et Nola dans le cas de différentes doses, Maxilact à dose de 500 µl la quantité restante de lactose est mieux par rapport à Nola fit, par contre à dose de 1500µl à 2000µl Nola hydrolyse mieux que Maxilact et concernant les méthodes utilisées pour déterminer le taux de lactose la meilleure méthode c'est la méthode enzymatique (Kit K-lolac megazyme) car la méthode enzymatique détecte des petites doses de lactose.

Mot clé : *Lactose – lactase – intolérance au lactose - méthode enzymatique – HPLC*

Abstract :

Lactose intolerance is caused by lactase deficiency. Lactose not transformed by lactase is found in the intestine where it ferments and causes digestive symptoms. People with lactose intolerance often feel better when they add lactase enzymes to their diet. And for this reason we decided to make a lactose-free milk for lactose intolerants. In this research three different enzymes (Maxilact, Nola fit, Ha-lactase) are used and the hydrolyzed lactose level is determined by a classical HPLC method and enzymatic method using a K-lolac kit. According to the results; Maxilact at a dose of 1000µl gives very good results compared to Ha-lactase and Nola fit . and concerning Maxilact and Nola in the case of different doses, Maxilact at 500 µl dose the remaining amount of lactose is better compared to Nola made, on the other hand at dose from 1500µl to 2000µl Nola hydrolyses better than Maxilact and concerning the methods used to determine the lactose level the best method is the enzymatic method (Kit K-lolac megazyme) because the enzymatic method detects small doses of lactose.

Keyword : *Lactose - lactase - lactose intolerance - enzyme method – HPLC*

