LE LAIT

REVUE GÉNÉRALE DES QUESTIONS LAITIÈRES

SOMMAIRE

Mémoires originaux :

Ch. PORCHER. — La méthode synthétique dans l'étude du lait. Le lait au point de vue colloïdal. Recherches sur le mécanisme de l'action de la présure (*à suivre*) 793

S. ORLA-JENSEN. — Recherches sur la pasteurisation basse du lait. Une nouvelle réaction pour contrôler la température de chauffage (*à suivre*) 816

H. STASSANO et P. ROLLET. — Des avantages de la filtration sur le nettoyage mécanique du lait au moyen d'essoreuses centrifuges 831

A. BAKKE. — La vitamine C dans le lait concentré sucré (*suite*) 837

A. LATAIX. — Contribution à l'étude de la réfractométrie des lacto-sérums (*suite et fin*) 844

Bibliographie analytique :

1^o Journaux, Revues, Sociétés savantes 858

2^o Brevets. 880

Bulletin bibliographique :

1^o Journaux, Revues, Sociétés savantes 882

2^o Brevets. 889

Documents et informations :

GRANVIGNE et DENIZOT. — Rapport sur les opérations de contrôle du concours laitier-beurrer effectuées par la station agronomique de Dijon, à Châtillon-sur-Seine, les 14 et 15 septembre 1928 890

Le commerce des produits laitiers et de la réfrigération au Canada 897

MOINE. — Les centres de consultations de nourrissons et le déclin de la mortalité infantile 902

TRENDTEL. — Enrichissement du lait en vitamines d'une façon simple 903

Un laboratoire ambulancier aux Etats-Unis 904

MÉMOIRES ORIGINAUX

LA MÉTHODE SYNTHÉTIQUE DANS L'ÉTUDE DU LAIT LE LAIT AU POINT DE VUE COLLOÏDAL RECHERCHES SUR LE MÉCANISME DE L'ACTION DE LA PRÉSURE

par **Ch. PORCHER**,

Docteur ès sciences physiques

(Suite)

CHAPITRE IV

ÉTAT DE LA CASÉINE DANS LE LAIT

De tout ce que nous avons dit dans certaines pages qui précèdent, il résulte que la caséine existe dans le lait à l'état de sel de calcium. Evidemment, et certains auteurs n'ont pas manqué de le faire remarquer, il est difficile d'admettre que la caséine soit uniquement à l'état de sel calcique, puisque, dans le lait, il est également une forte proportion de bases alcalines : potasse et soude. Nous pouvons *a priori* plus que supposer qu'il en est ainsi pour les laits extrêmement peu riches en calcium, tel que le lait de femme par exemple. Dans ce dernier, il ne semble pas, en

effet, qu'il y ait suffisamment de chaux pour que la caséine soit entièrement à l'état de caséinate calcique, et l'on se trouve dans la nécessité de penser qu'elle y est partiellement sous la forme de sel alcalin potassique, ce qui est une raison de plus à ajouter à celles que nous verrons plus loin pour comprendre que le lait de femme ne coagule pas par la présure.

Néanmoins, pour le lait de vache, l'argument de la présence d'une forte proportion de bases alcalines : potasse et soude, lequel nous conduirait à admettre l'existence d'un caséinate alcalin, ne paraît pas valable ; nous y avons répondu en montrant que l'ensemble du système salin du lait engendrait un équilibre duquel il résultait pour certains sels telle forme plutôt que telle autre.

LE COMPLEXE : CASÉINATE DE CALCIUM + PHOSPHATE DE CALCIUM.

— C'est Hammersten qui, le premier, a considéré que la caséine se trouvait dans le lait sous la forme d'un système : caséinate de calcium + phosphate de calcium. Toutes les fois, en effet, que l'on précipite la caséine en milieu neutre, en évitant soigneusement l'acidification qui conduirait à une décalcification du sel de cette protéine, on la trouve salifiée sous la forme calcique et, en même temps, on constate que du phosphate de calcium s'y trouve associé. Mais, il ne s'agit pas d'union chimique, car, nous l'avons montré, le phosphate de calcium, physiquement et chimiquement, est indépendant du caséinate de calcium. Ces deux sels n'ont de relation qu'au point de vue colloïdal, le caséinate protégeant le phosphate.

Le caséinate de calcium du lait naturel. — Quel est le caséinate de calcium qui se trouve dans le lait ? Autrement dit, quelle est la quantité de base qu'il renferme ? C'est une question importante que se sont posée plusieurs des chercheurs qui ont étudié la nature des combinaisons calciques de la caséine dans le lait.

Déjà HAMMARSTEN avait fait la remarque que le caséinate de calcium du lait se distinguait de certains autres sels de caséine par plusieurs particularités : son existence indéniable à l'état de suspension colloïdale, c'est-à-dire insoluble, son pouvoir d'émulsifier la matière grasse que ne possédaient point les autres sels plus riches en calcium et, pour cette raison plus facilement solubles dans l'eau, plus dispersés, dirions-nous aujourd'hui, et ayant tendance ainsi à se rapprocher des cristalloïdes.

La quantité de calcium combinée à la caséine serait d'environ 1,07 %, ce qui correspond à 1,50 % (1,498 de CaO). Le caséinate obtenu serait neutre au tournesol, mais acide à la phtaléine ; c'est lui qui, pour VAN SLYKE et BOSWORTH, existerait dans le lait. Il serait susceptible de donner des solutions fortement concentrées.

PALMER (165), utilisant la notion du pH, estime qu'il est plus que vraisemblable que le caséinate de calcium naturel du lait a un pH = 6,5.

(165) L. S. PALMER. — The Chemistry of Milk and Dairy Products viewed from a Colloidal Standpoint. — *Industrial and Engineering Chemistry*, 1924, **16**, n° 6, p. 631.

Or, le caséinate qui possède une telle réaction, préparé *in vitro*, renferme environ 1,50 % de chaux, comme celui de VAN SLYKE et BOSWORTH.

Où nous nous séparons des auteurs américains, c'est lorsqu'ils estiment que le caséinate de calcium du lait est un *mélange* d'un caséinate plus basique avec un caséinate plus acide. Pourquoi parler de mélange alors que rien ne nous y autorise ? Nous y reviendrons d'ailleurs.

Nous différons également d'opinion avec eux sur la teneur en calcium du caséinate naturel que nous fixerons à 2 % environ. En effet, si nous prenons un lait que nous dialysons, nous voyons son pH se diriger vers la zone alcaline, devenir > 7 et atteindre 7,05-7,10 et même un peu plus. A ce moment, le lait est débarrassé des phosphates alcalins, facteurs principaux de l'acidité, du chlorure de sodium et, en général, de tous les cristalloïdes, et la liqueur qui reste à l'intérieur du dialyseur est faite, au point de vue qui nous occupe, essentiellement du complexe : caséinate de calcium + phosphate tricalcique. Or, le caséinate dont le pH est voisin de 7 renferme, comme nous le verrons plus loin, 2 % de chaux environ.

Nous devons également rappeler le travail de L. LINDET (142) dans lequel ce savant s'est appliqué à établir les relations entre le phosphore, le calcium et la caséine, en même temps que les formes qui les unissent. Il a montré que l'on pouvait admettre l'existence dans le lait de ce qu'il a appelé le *phospho-caséinate de chaux*, ensemble salin dans lequel la chaux est combinée à la caséine dans la proportion d'environ 1,84 %, proportion un peu plus forte que celle donnée par les auteurs américains. Quant au phosphate de calcium, il y existerait probablement à l'état tricalcique.

Pour PALMER, le système colloïdal : caséinate de calcium + phosphate de calcium est à un degré de dispersion relativement grossier, puisqu'il peut être complètement et facilement éliminé par filtration sur des ultra-filtres relativement perméables ainsi que sur des bougies de porcelaine à pâte serrée.

L'étude de ce que nous avons appelé le *complexe : caséinate de calcium + phosphate de calcium* nous permettra de pénétrer dans la mécanique chimique qui préside à sa formation. Elle fera l'objet de développements importants.

PRÉPARATION DE LA CASÉINE.

La caséine existe dans le lait, nous venons de le voir, sous la forme du complexe : *caséinate de calcium + phosphate de calcium*, dont la composition est sensiblement constante pour le *lait-type* que l'on peut imaginer être la grande moyenne des compositions des laits des diverses races bovines existant dans le monde.

CASÉINE-ACIDE ET CASÉINE-PRÉSURE. — L'industrie prépare deux sortes de caséine qu'elle dénomme : *caséine-acide* et *caséine-présure*.

Nous commencerons par décrire la préparation de la caséine-acide, mais encore faut-il pour marquer, d'ores et déjà, la différence profonde qui existe entre ces deux types de caséine scientifiquement et commercialement connues, montrer comment on les obtient en partant du complexe ci-dessus.

Comment réaliser la précipitation du complexe. — Ce complexe, redisons-le, est à l'état colloïdal. Les micelles de chacun de ses deux constituants sont étroitement liés en solution et *ils le restent lorsqu'on en provoque la précipitation en milieu neutre ou voisin de la neutralité vraie caractérisée par un $\text{pH} = 7$* . Cette précipitation simultanée du caséinate et du phosphate peut être réalisée de différentes façons :

- a) Par le sulfate de magnésium ;
- b) Par un excès d'un sel calcique soluble ;
- c) Enfin par la présure.

La précipitation par la présure n'aboutit pas tout à fait au même résultat que celle réalisée avec le sulfate de magnésium, puisque le ferment-lab attaque le caséinate de calcium, ce que ne fait pas le sel magnésien ; mais, en ne considérant *pour l'instant* le phénomène que sous son côté grossièrement objectif, nous pouvons dire que la présure, elle aussi, précipite le complexe *caséinate de calcium + phosphate de calcium, après une légère altération du caséinate*. Ceci nous suffit *présentement* pour établir la distinction fondamentale entre la *caséine-présure* et la *caséine-acide*.

Le caséinate de calcium ne se séparera du phosphate calcique que dans un milieu acide ; nous verrons tout à l'heure comment.

Il est regrettable de constater, alors que nos connaissances sur la caséine sont assez grandes et qu'elles nous permettent d'y voir un peu plus clair, qu'une confusion soit faite encore par tant d'auteurs entre la *coagulation du lait par les acides* et la *coagulation par la présure*. La différence la plus nette existe cependant entre ces deux processus ; leur allure est conditionnée par les circonstances qui les entourent ; l'analyse des produits obtenus les éloigne fortement l'un de l'autre, et se servir du même mot : *coagulation*, pour les englober, est, nous le pensons, une erreur de jugement à laquelle nous sommes redevables de la confusion que nous venons de signaler.

LA PRÉCIPITATION ACIDE DE LA CASÉINE. — L'acidification du lait peut être réalisée de diverses façons. Nous pouvons laisser le lait devenir *spontanément* acide ou bien, au contraire, ajouter un acide donné dans le but d'en précipiter la caséine.

Pour éviter toute confusion dans l'exposé de ce chapitre, il nous arrivera d'appeler *caséine-lactique*, la caséine obtenue par l'acidification spontanée du lait, et *caséine-acide*, celle qui résulte de l'acidification provoquée par l'apport d'un acide minéral ou organique, *autre que l'acide lactique*. Au fond, l'une et l'autre sont les résultats du même

processus aboutissant à l'apport dans le lait d'un certain nombre d'ions H. La nature de l'anion uni à l'ion H dans l'acide employé importe théoriquement assez peu, et rien n'empêcherait d'utiliser l'acide lactique pour l'acidification provoquée qui est toujours rapide, comme nous le verrons ; mais nous aurions avec lui, du fait de cette rapidité, les mêmes inconvénients qu'avec les autres. Que le lait s'acidifie lui-même, par suite de la formation d'acide lactique, ou qu'on y apporte un acide, organique ou minéral, nous obtiendrons toujours un précipité pour une acidité répondant à un pH déterminé mais, objectivement, ce précipité affecte des aspects différents selon les conditions de l'acidification. Nous devons suivre attentivement la marche de cette dernière pour nous expliquer la composition chimique du précipité de caséine qui se forme.

L'auto-acidification du lait. — On sait que, à sa sortie de la mamelle, du fait des conditions plutôt fâcheuses qui président trop couramment à sa récolte et à sa manutention, le lait est envahi par une flore lactique abondante qui se développe rapidement lorsque les circonstances, — une température assez élevée en est la principale, — sont favorables.

L'acidité lactique spontanée s'accroît lentement et graduellement, puisqu'elle demande, selon la température, entre 10 ou 12 et 48 heures pour aboutir à un taux suffisant. *Le lait forme un bloc homogène* ; c'est comme un coagulum occupant presque tout le volume initial, ne laissant exsuder qu'un peu de sérum, et qu'il faudra briser en menus morceaux pour en séparer la caséine qui devra ensuite être pressée, lavée et séchée.

Quand on prend l'acidité du milieu alors que la « *coagulation* » spontanée semble terminée, on trouve un $pH = 5,3$ environ. Brise-t-on le caillé, comme cela se fait dans l'industrie et au laboratoire, et chauffe-t-on de façon à raffermir les flocons qui se forment pour leur permettre de laisser exsuder le sérum qu'ils avaient englobé, nous voyons le pH diminuer par suite d'une augmentation de l'ionisation de l'acide formé, et le pH du sérum recueilli se rapproche de 4,6-4,7 auquel correspond le point isoélectrique de la caséine.

COSMOVICI (166), examinant le rôle des ions H dans la « *coagulation* » par les acides, montre, quel que soit l'acide employé pour provoquer la précipitation de la caséine, qu'il s'agisse de *coagulation spontanée* ou de *précipitation provoquée*, que la caséine précipite toujours dans le lait au même pH qui oscille entre 5,30 et 5,39. Nous sommes encore assez loin du point isoélectrique 4,6 qui permet seul, comme nous le verrons plus loin, la précipitation complète de la protéine.

On s'explique cette différence lorsqu'on lit le travail de COSMOVICI

(166) N. L. COSMOVICI. — L'action des ions H sur la coagulation du lait. — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1925, 7, 124.

qui ne semble pas avoir poussé la précipitation à fond, mais plutôt s'être arrêté au début de celle-ci quand des « grumeaux très fins apparaissent ». En effet, lorsque les premiers grumeaux se forment, la précipitation n'est pas terminée ; le sérum est encore trouble, laiteux, et un nouvel apport d'acide est nécessaire pour compléter la précipitation, laquelle n'est totale que lorsque la quantité d'acide ajoutée est telle que le point isoélectrique de la caséine est atteint.

Il n'est pas surprenant que COSMOVICI ait obtenu sensiblement le même pH quel que soit l'acide employé par lui : acétique, lactique, phosphorique, sulfurique ou chlorhydrique, dès l'instant qu'il s'arrêtait au même point de l'opération, c'est-à-dire à l'apparition des premiers flocons. A ce moment, dit-il, « le point de la précipitation de la caséine est atteint ». Nous ne saisissons pas exactement la pensée de l'auteur, car ce qui importe, c'est de parfaire la précipitation de la caséine, de l'avoir totale, ce qui n'est réalisable qu'avec un $pH = 4,6$. Disons avec COSMOVICI que pour un $pH = 5,3$, la précipitation *commence*, mais reconnaissons en même temps qu'elle est incomplète.

Qu'il s'agisse de *coagulation spontanée* ou de *précipitation provoquée*, le phénomène qui aboutit à la libération de la caséine, dans l'un comme dans l'autre cas, n'est jamais brusque ; ce n'est que graduellement que la caséine est libérée de ses attaches minérales, et entre la forme salifiée neutre de $pH = 7$ environ, qu'elle affecte dans le lait, et la forme d'acide libre sans aucune minéralisation, théoriquement du moins, de $pH = 4,6$, nous avons des intermédiaires, des caséinates acides dont les pH s'échelonnent de 7 à 4,6.

La vitesse de cette libération est très réduite dans le cas de la *coagulation spontanée* ; elle peut être très grande, au contraire, dans le cas de la *précipitation provoquée*, mais l'essentiel des modifications chimiques qui apparaissent n'est troublé en rien.

Les changements chimiques dans l'acidification spontanée du lait. — Avant COSMOVICI, et sans être aidés par la détermination de l'acidité actuelle, L. L. VAN SLYKE et A. W. BOSWORTH (167) ont suivi très attentivement la marche des changements chimiques produits dans l'acidification spontanée du lait. C'est une analyse bien faite des réactions qui se passent et ils ont particulièrement insisté sur les *états intermédiaires*. Ils ont remarqué notamment que dans une solution contenant de l'acide lactique libre, des lactates et des phosphates, — le lait en train de s'acidifier est dans ce cas, — les lactates et les phosphates réagissent mutuellement formant de l'acide lactique libre et du phosphate bicalcique.

On peut extraire avec l'éther tout l'acide libre de la dite solution,

(167) L. L. VAN SLYKE et A. W. BOSWORTH. — Chemical changes in the Souring of milk. — *New-York Agric. Exp. Stat.*, Tech. Bull. n° 48, Janvier 1916, et *Journ. of biol. Chem.*, 1916, 24, 191.

mais on est incapable de dire avec exactitude à quel moment la transformation du lactate en acide libre commence.

L. L. VAN SLYKE et A. W. BOSWORTH ont vu également que la quantité d'acide dans le sérum n'augmente pas aussi rapidement que l'acide lactique, en raison d'une adsorption limitée de l'acide par les particules de la caséine précipitée, aboutissant à des sels de caséine, — celle-ci fonctionnant comme cathion —, remarquablement dissociables et libérant leur acide au lavage.

Ils ont noté avec soin que la chaux de la caséine ne paraît pas être solubilisée par l'acide lactique aussi rapidement que les phosphates calciques insolubles sont transformés en phosphate monocalcique soluble.

Lorsqu'il s'agit d'acidification provoquée, et en supposant que l'acide employé soit l'acide chlorhydrique, il se fera du chlorure de calcium aux dépens de la chaux des phosphates et des caséinates, au lieu de lactate comme tout à l'heure ; mais dans tous les cas, lorsqu'on est au point isoélectrique, l'acide, quel qu'il soit, a séparé les micelles phosphatiques des micelles caséinatiques.

L'acidification provoquée. — Quand l'acidification est provoquée par l'apport d'un acide, on peut *aller vite*. Très rapidement, en effet, la quantité d'ions H déversés dans le lait est telle qu'on arrive d'abord au $pH = 5,3$ dont parle COSMOVICI, puis au $pH = 4,6$. On précipite la caséine sous forme de flocons volumineux qui se rassemblent au fond de la cuve en formant des masses qui deviennent compactes si on laisse reposer trop longtemps. Celles-ci devront être broyées, disloquées lors du lavage avant le passage à la presse qui, lui-même, est préalable à la dessiccation.

Les caséines acides, dans leur ensemble, la lactique ou les autres, sont théoriquement de la caséine pure. Au surplus, on peut estimer que pratiquement, il en est de même, au laboratoire du moins, puisque le mode de préparation de la caséine, avec tous les soins qu'elle exige, doit nous conduire et nous conduit, en effet, à l'obtention d'un produit déminéralisé.

Sans chercher le fin du fin, reconnaissons qu'il n'est pas exact de dire que le lait *coagule* par les acides ; nous préférons infiniment que l'on dise que les acides *précipitent* la caséine, celle-ci, encore une fois, devant être considérée comme un acide insoluble. Ce n'est point là une question de mots, puisqu'il s'y joint implicitement des considérations sur l'état de la caséine dans le lait et le mécanisme de la réaction (168).

Au contraire de la *caséine-acide*, la *caséine-présure* obtenue en partant du lait est toujours chargée en substances minérales, et elle

(168) Ch. PORCHER. — La caséine. Caséine acide et caséine à la présure. Transformation de la caséine acide en caséine à la présure. — *Chimie et Industrie*, 1928, 19, Avril : p. 589 ; mai : p. 809.

ne peut pas ne pas l'être. C'est là un point important sur lequel nous saurons insister dans la suite de notre travail.

La caséine-acide pure et les caséines-acides industrielles. —

La *caséine-acide* est une espèce chimique toujours identique à elle-même, avons-nous dit. Voilà pour le côté scientifique. *Mais comment concilier cette uniformité de type chimique avec la variété de composition des caséines-acides que nous donne l'industrie ?* Comment la concilier, en effet, avec ce que disent BEAU et BOURGAIN après E. DUCLAUX : qu'il y a autant de caséines que de modes de préparation, en particulier, que d'agents coagulants ?

Rien n'est plus facile à expliquer et la confusion qui peut se faire entre les deux conceptions dont il est ici question, celle de la caséine-acide, pure espèce chimique, et celle des nombreuses sortes de caséines-acides que le commerce nous offre, résulte de ce qu'on ne sait pas ou qu'on ne veut pas distinguer la préparation du corps pur de la préparation industrielle ; et si, dans ces dernières années, des progrès ont été réalisés dans l'obtention de la caséine, sous la pression des circonstances engendrées par la guerre, c'est parce que l'industrie s'est efforcée de se rapprocher du laboratoire, d'en suivre les directives, ce qui d'ailleurs est très souvent réalisable.

Ainsi que nous l'avons dit un peu plus haut, nous ne nous occuperons pour l'instant que de la préparation des caséines-acides, celle de la caséine à la présure venant tout naturellement se placer après l'étude que nous ferons de l' emprésurage du lait ou du complexe. Nous n'insisterons ici que sur la préparation au laboratoire, la préparation industrielle, dans son détail, devant être l'objet d'une étude ultérieure.

Quelques remarques générales, l'une, visant la *fraîcheur* du lait, l'autre, son *écrémage*, doivent être présentées avant d'aller plus loin.

Nous ne parlerons pas de l'*espèce* de lait, puisque nous avons fait remarquer antérieurement que, pour préparer la caséine en vue d'obtenir les meilleurs rendements avec le plus de facilité, il faut s'adresser au lait de vache. C'est avec lui que la précipitation acide de la caséine est le plus facilement obtenue, et le taux extrêmement bas de la globuline dans ce lait, — très au-dessous de 0 gr., 50 par litre, — nous permet d'avancer que la caséine préparée pourra être tout à fait pure.

Le lait devra être *rais*, c'est-à-dire récemment traité, sans acidité lactique.

La matière grasse est l'impureté la plus fâcheuse, et la caséine doit en être débarrassée autant que possible. Un seul passage à l'écumeuse laisse dans le lait écrémé de 0 gr., 50 à 0 gr., 75, quelquefois 1 gramme, et même plus si l'écumeuse est mal réglée. Lorsqu'on précipite la caséine par un acide, les flocons de la protéine englobent plus de 50 % de la graisse résiduelle et, dans les opérations successives de redissolution de la caséine dans les alcalis et de réprécipitation par un nouvel apport

d'acide, on n'arrive pas à débarrasser totalement la protéine de la graisse qu'elle avait entraînée lors de sa précipitation initiale (169).

Il est recommandé de faire passer plusieurs fois le lait à travers la centrifuge et de l'additionner au préalable d'une faible quantité d'une solution diluée de soude. On chauffe à 35°-40° tout au plus avant de centrifuger. Ce procédé, nous dit TAGUE (170), dans son livre, enlèverait pratiquement toute la graisse. Le peu qui restera partira en solution dans les dissolvants des graisses : éther, éther de pétrole, benzène, toluène ou acétone, qui sont utilisés dans les derniers temps de la préparation de la caséine.

PRÉPARATION DE LA CASÉINE AU LABORATOIRE.

LA TECHNIQUE DE HAMMARSTEN. — Le premier auteur qui se soit occupé de la préparation de la caséine pure en vue de recherches scientifiques est HAMMARSTEN (99).

Le lait, étendu de quatre volumes d'eau distillée, est additionné ensuite d'une quantité suffisante d'acide acétique pour que le taux de celui-ci atteigne environ 0,075-0,100 %. Avec un tel degré de dilution, non seulement la caséine se sépare sans perte appréciable, nous dit l'auteur, mais elle se dépose extraordinairement vite, et forme en peu de temps une masse compacte au-dessus de laquelle se trouve le sérum dilué, liquide jaune verdâtre qui peut être facilement siphonné. De l'eau distillée remplace en égal volume le liquide extrait ; on agite le mélange, on laisse déposer et on recommence les opérations jusqu'à ce que les eaux de lavage ne renferment sensiblement plus de sels de Ca. On dissout alors la caséine dans la plus petite quantité d'ammoniaque N/10 possible. La solution est filtrée sur amiante ; elle passe clair ou légèrement opalescente. La caséine en est précipitée par l'acide acétique dilué comme s'il s'agissait du lait origine. Lavages, redissolutions et reprécipitations sont recommencées deux à trois fois. La caséine, la dernière fois, est lavée jusqu'à ce que toute trace d'acide soit enlevée. On filtre, on traite par l'alcool, puis l'éther, comme il sera dit plus loin en détail.

HAMMARSTEN a le soin de faire remarquer que si l'on se sert d'eau ordinaire qui est toujours un peu calcaire, les chiffres donnés ci-dessus pour l'acide acétique doivent être quelque peu relevés.

Ce qu'il faut noter déjà dans la technique de HAMMARSTEN, c'est le soin qu'il apporte à fixer la quantité d'acide nécessaire pour précipiter la caséine. Il remarque bien que si l'on reste en-deçà des chiffres donnés ci-dessus, la précipitation est incomplète, d'où perte importante, alors que si l'on va au-delà, on tombe dans un autre inconvénient qui peut conduire à la redissolution, par l'excès d'acide, d'une partie de la caséine fraîchement précipitée.

L'importante notion du point isoélectrique nous permet aujourd'hui de régler avec beaucoup de précision la précipitation de la caséine de

(169) H. JEPHCOOTT et N. RATCLIFFE. — Fat in commercial casein. *Proceed. of the World's Dairy Congress*. 2-10 octobre 1923, 2, 1271.

(170) E. L. TAGUE. — *Casein, its Preparation, Chemistry and technical Utilization*. D. van Nostrand Co. Ed. New-York, 1926.

façon à la réaliser exactement à ce point caractérisé par un $pH = 4,6-4,7$, correspondant à une concentration en ions $H = 2,5 \times 10^{-5}N$.

Réserve faite de cette observation, la technique de ceux qui préparent de la caséine au laboratoire suit dans ses lignes essentielles celle qui a été indiquée en premier lieu par HAMMARSTEN. L'observation d'une acidité stricte lors de la précipitation, d'une alcalinité non moins stricte lors de la redissolution, est donc facilitée aujourd'hui par notre connaissance du pH et les moyens de l'obtenir d'une façon précise.

Nous reviendrons tout à l'heure, en exposant le détail de la technique de la préparation telle que nous l'effectuons dans notre laboratoire, sur ces divers points. Mais, auparavant, nous donnerons la technique de VAN SLYKE et BAKER (171, 172) qui n'est qu'une amélioration de celle qui avait été exposée par VAN SLYKE et BOSWORTH quelques années auparavant en 1912 (173).

La technique de L. L. van Slyke et J. C. Baker. — Alors que HAMMARSTEN diluait le lait avant de l'acidifier, l'idée qui a guidé VAN SLYKE et BAKER était de *se rapprocher par une acidification provoquée de ce qui est réalisé spontanément par la fermentation lactique régulière du lait*. Ils avaient constaté que la technique de HAMMARSTEN ne conduisait pas à une caséine tout à fait pure. En suivant ses indications, le produit préparé contenait rarement moins de 0,30-0,40 % de cendres, consistant surtout en phosphate de calcium et de magnésium inclus dans le précipité, avec peut-être aussi un peu de caséinate de calcium. Leur technique, au contraire, conduirait, disent-ils, à une caséine pure. Elle se ramène à ceci : *addition graduelle d'acide dans la masse du lait refroidi à 15° pendant que le liquide est agité violemment* par un agitateur tournant qui est placé sur le côté pour éviter l'écume excessive résultant inmanquablement du tourbillon qui se forme lorsque l'agitateur est placé au centre. Celui-ci fait 2.000 à 3.000 révolutions par minute. On prend soin que la température ne s'élève point. L'acide est apporté *très lentement au fond du liquide* par un tube capillaire de 1,5 millimètres à 2 millimètres de diamètre intérieur et dont l'extrémité est effilée ; ce tube est en relation avec la burette graduée qui contient l'acide.

VAN SLYKE et BAKER ont essayé différents acides. Après avoir travaillé avec l'acide lactique, l'acide acétique et l'acide chlorhydrique, leur préférence va à l'acide lactique normal ou à un mélange de 1 partie

(171) L. L. VAN SLYKE et J. C. BAKER. — Studies relating to milk. I. The preparation of pure casein. *New-York Agric. Exper. Stat.*, décembre 1918, Techn. Bull. n° 65.

(172) L. L. VAN SLYKE. — The Chemistry of Casein. — *Proceedings of the World's dairy Congress*, 1923, 2, 1145.

(173) L. L. VAN SLYKE et A. W. BOSWORTH. — Composition and properties of some casein and paracasein compounds and their relations to cheese. *New-York Agric. Exper. Stat.*, décembre 1912, Techn. Bull. n° 26.

d'acide chlorhydrique normal et de 1 à 2 parties d'acide acétique normal. L'acide acétique pur ne donnerait pas toujours une coagulation satisfaisante dans le lait non dilué. Certains auteurs lui reprochent de donner un coagulum mou, difficile à laver (a).

VAN SLYKE et BAKER font remarquer que l'acide chlorhydrique seul donne des résultats excellents, mais ce qu'on peut lui objecter, *c'est le danger qui résulte du moindre excès d'acide.*

Les divers acides employés. — Cet excès n'est cependant pas à craindre si les opérations sont suivies avec le potentiomètre. Un certain nombre d'acides ont été employés dans la préparation de la caséine, qu'il s'agisse de celle qui est faite au laboratoire ou dans l'industrie. On a eu recours successivement dans le cadre des **acides minéraux** aux acides *chlorhydrique, sulfurique, nitrique* et dans le cadre des **acides organiques**, aux acides *lactique, acétique, formique* et *propionique*, voire même l'acide *tartrique* et l'acide *citrique*. Mais de tous ces acides, il semble que l'on n'ait conservé que HCl , SO_4H_2 , l'acide acétique et l'acide lactique. Leur degré d'ionisation étant laissé de côté, *il faut penser à la solubilité de leurs sels calciques*; or, tandis que chlorure, lactate et acétate de calcium sont très solubles dans l'eau, le sulfate de calcium l'est fort peu. Si SO_4H_2 semble être un excellent précipitant, il conduit par contre à l'obtention d'une caséine assez riche en cendres, et contenant notamment des sulfates. Nous ferions incidemment la même remarque si l'on s'avisait de recourir à l'acide phosphorique qui ne peut être employé comme précipitant pour la caséine, d'abord en raison de son prix élevé, ensuite du fait de la richesse en cendres qu'aurait le produit. L'acide nitrique, qui est fortement ionisé comme HCl , donne malheureusement, si on ne l'emploie pas avec toute l'attention voulue, des dérivés nitrés, jaunes, d'où, pour la caséine préparée, une couleur anormale.

Ces remarques que nous estimons intéressantes sur l'emploi des acides dans la préparation de la caséine étant formulées, revenons maintenant à la technique de VAN SLYKE et BAKER.

L'apport d'acide en raison de l'effilure du tube est très lent et comme le liquide est fortement agité, il n'y a pas de flocons grossiers. Les auteurs suivent l'apport acide en procédant de temps à autre à la centrifugation du liquide. Si des flocons trop gros sont formés, la sédimentation est rapidement obtenue, ce qui est un inconvénient. Il faut ajouter l'acide pendant que l'agitateur tourne à 2.000-3.000 tours, vitesse avec laquelle une coagulation appréciable n'est pas obtenue à l'arrivée de l'acide. Lorsqu'on arrive au moment où la précipitation est près d'être atteinte, on arrête l'arrivée de l'acide, et on diminue la vitesse de l'agitateur à environ 500 révolutions par minute.

VAN SLYKE et BAKER utilisent le pourpre de bromo-crésol comme indicateur pour déceler le moment où l'on approche de la précipitation.

a) Sans doute n'ont-ils pas ajusté leur addition d'acide acétique au point isoélectrique.

Quelques centimètres cubes du lait acidifié sont dilués avec un égal volume d'eau distillée et on centrifuge jusqu'à ce que la caséine soit complètement séparée. L'addition d'eau distillée en accentuant l'ionisation de l'acide ajouté augmente par cela même la concentration en ions H du lait acidifié, et si celui-ci avant la dilution est près du point isoélectrique, la dilution lui permet de l'atteindre. Tant que cette épreuve ne provoque aucune séparation de la caséine, on continue l'apport d'acide que l'on arrête dès qu'on a un résultat positif.

Pour éviter la formation de l'écume qui est toujours à craindre bien que l'agitateur ne soit pas placé au centre du flacon, on ajoute quelques gouttes d'alcool octylique et on s'efforce en même temps de réduire les vibrations. Quand on en est arrivé au point signalé par l'épreuve de la dilution, c'est-à-dire juste avant l'acidité qui va déclencher la précipitation de la caséine, nous avons vu qu'on diminuait la vitesse de l'agitateur à environ 500 révolutions par minute. On laisse tourner pendant 3 heures et au bout de ce temps, en même temps qu'on reprend l'agitation rapide, on fait arriver de nouveau l'acide. Dans ces conditions, les particules de caséine sont obtenues dans le plus petit état possible de division. L'addition d'acide est continuée jusqu'à ce que l'épreuve de la centrifugation sur quelques centimètres cubes de lait acidifié donne une solution limpide, presque transparente, tranchant sur le culot de caséine.

Il faut environ, disent L. L. VAN SLYKE et BAKER, 90 cm³ d'acide lactique normal ou d'un mélange d'une partie d'acide chlorhydrique normal et de deux parties d'acide acétique normal pour chaque litre de lait. Si l'on utilise l'acide chlorhydrique normal seul, il n'en faut que 75 cm³.

Quand la précipitation est complète, le mélange est encore agité pendant 2 à 4 heures, mais lentement.

La caséine précipitée est lavée avec des portions successives d'eau dans une essoreuse (1) jusqu'à ce que l'eau de lavage soit un peu trouble, nuageuse; à ce moment la caséine ne se sépare plus complètement de l'eau, par suite de l'absence d'électrolytes. Cette caséine contient toujours du phosphate de calcium et de magnésium à l'état colloïdal, et ces sels ne peuvent être complètement enlevés que par un traitement spécial.

Quand on est arrivé au trouble de l'eau de lavage, la caséine est essorée et battue de nouveau en suspension avec de l'eau, puis on y ajoute de la soude N/10 jusqu'à ce que la solution résultante ait une réaction neutre de $pH = 7$. Les phosphates de calcium et de magnésium restent en suspension, et peuvent être pour la plupart enlevés par la centrifugation. Cependant, il en reste assez en suspension pour donner à la solution centrifugée une légère opalescence. Cette solution est alors diluée de façon qu'elle ne renferme que 1 à 1,5 % de caséine, puis elle est soumise au même traitement que le lait originel, sauf qu'il a été trouvé préférable d'employer l'acide acétique normal sans acide chlorhydrique pour arriver à la réaction de $pH = 4,7$.

La liqueur obtenue à la fin des opérations, après centrifugation de la caséine, est claire comme de l'eau. La caséine est finalement suspendue dans de l'eau à laquelle on ajoute de l'acide acétique dilué de $pH = 4,7$.

Dans cette liqueur, les dernières traces de phosphate sont enlevées par électrolyse, la suspension de caséine étant placée au milieu d'une cellule à trois

(1) On utilise de préférence une centrifuge de grande capacité pour séparer la caséine qu'il deviendra facile de laver dans les tubes mêmes de cette machine.

compartiments séparés les uns des autres par des feuilles de collodion. On ajoute du toluène pour prévenir toute action bactérienne.

Quand ce traitement est terminé, la caséine est centrifugée et essorée, puis traitée successivement d'abord, avec de l'alcool à 70°-80° chaud, neutre, ensuite avec de l'alcool absolu ou au moins à 95°, puis de l'éther absolu, et finalement avec de l'éther de pétrole d'un point d'ébullition élevé, ou avec du benzène et du toluène. Le traitement à l'alcool qui agit comme déshydratant et qui prépare le traitement par l'éther est indispensable. La caséine ne saurait être desséchée avant le traitement à l'alcool, de même qu'après, sans traitement à l'éther, car on obtiendrait alors une poudre rugueuse et non totalement dépourvue de graisse.

VAN SLYKE et BAKER, dans leurs premiers essais, se contentaient de recourir à l'éther pour le traitement final dans la préparation de la caséine, mais ils trouvèrent qu'en dépit des précautions prises, l'abaissement de température causé par l'évaporation rapide de l'éther aboutissait à une condensation de l'humidité de l'air sur les particules de la surface, dont l'effet était de convertir ces fines particules en une croûte qui ne pouvait pas être pulvérisée finement par le broyage. Si l'emploi de l'éther est suivi promptement d'un traitement avec un liquide volatil d'un point d'ébullition plus élevé, — c'est le cas pour les liquides indiqués ci-dessus, éther de pétrole, benzène et toluène, — l'évaporation est ralentie, il n'y a plus de condensation d'humidité, et les particules de caséine qu'on obtient sont d'une extrême finesse.

La technique de VAN SLYKE et BAKER que nous venons d'exposer conduit à l'obtention d'une caséine acide très pure ; mais il est indispensable d'en suivre les prescriptions avec le plus grand soin, car faute de le faire, nous obtiendrions des caséines toujours chargées en matières minérales. C'est ce à quoi aboutit l'industrie dont les techniques sont trop souvent défectueuses et les produits, de charges minérales très différentes.

Comment expliquer, en effet, qu'entre la *caséine-acide*, d'acidification provoquée, et la *caséine-lactique*, d'acidification spontanée, il y ait une grande différence dans la minéralisation. Rien n'est plus simple, et nous n'avons qu'à nous reporter à la technique de VAN SLYKE et BAKER dans les détails de laquelle nous sommes entré un peu plus haut.

A quoi se ramène au fond la préparation de la *caséine lactique* ? A l'attaque, dans la masse entière du lait, de toutes les molécules du caséinate par l'acide lactique fabriqué à leur voisinage immédiat sous l'action des ferments lactiques répandus uniformément dans le liquide. Le processus est lent, il marche de la même vitesse en tous les points ; la décalcification va donc s'exercer progressivement et fatalement et aucune molécule calcique ne sera soustraite à l'action de l'acide lactique qui s'élabore. Avant que le coagulum apparaisse, les phosphates calciques, et ajoutons magnésiens, insolubles, sont solubilisés comme phosphates monométalliques. De son côté, la caséine se décalcifie

graduellement en donnant des caséinates acides de moins en moins riches en calcium jusqu'à en arriver à la caséine presque pure au voisinage du point isoélectrique que le chauffage lors de la cuisson du grain permettra d'atteindre.

Nous avons dit plus haut que VAN SLYKE et BAKERS'étaient efforcés de copier le processus d'acidification spontanée. Dans l'impossibilité de l'imiter totalement, ils ont eu recours à une *addition d'acide extrêmement lente sous une agitation violente*. Celle-ci a pour but de présenter toutes les molécules du complexe caséinate de calcium + phosphate de calcium à l'acide lactique qui est introduit peu à peu dans la masse. En d'autres termes, l'agitation détermine entre l'acide et le complexe, ce contact étroit, intime qui est réalisé dans la fermentation lactique, mais à l'état de repos.

VAN SLYKE et BAKER ont remarqué que pour dissoudre complètement le phosphate calcique, il faut au moins 3 heures ; c'est ce sel qui se solubilise d'abord, la caséine ne lâchant son calcium que graduellement et avec une plus forte acidité. Avant qu'on aperçoive les premiers flocons de caséine, juste avant le moment où ceux-ci vont se former très visiblement, les phosphates calciques et magnésiens sont complètement dissous.

Nous savons que les auteurs américains laissent la liqueur quelques heures en cet état sous une agitation réduite avant de procéder à un nouvel apport d'acide qui déterminera la décomposition totale du caséinate de calcium ; pour que celle-ci soit complète, il faut de 2 à 4 heures.

VAN SLYKE et BAKER notent également ce fait important, c'est que *lorsque les phosphates insolubles calciques et magnésiens ne sont pas complètement dissous avant la précipitation de la caséine, il n'apparaît pas possible de les enlever complètement après la précipitation, tellement ils sont fixés sur la trame protéique*. C'est pourquoi ils prennent soin, rappelons-le, puisque c'est là un temps essentiel de leur préparation, de cesser l'arrivée de l'acide lorsque la liqueur est sur le point de floconner. Ce faisant, ils tiennent à s'assurer de la complète solubilisation des phosphates calciques et magnésiens, avant d'aller plus loin, et ce n'est qu'au bout de quelques heures, alors que cette solubilisation est terminée, qu'ils attaquent le caséinate pour le décalcifier à son tour. Ici encore, pour ce second temps, il est indiqué de laisser les flocons dans la liqueur acide dont le pH est au point isoélectrique. Il n'y a à craindre, font-ils remarquer, aucune hydrolyse, dès l'instant que la température est basse (15°) et qu'il n'y a pas d'excès d'acide.

La rapidité de la précipitation de la caséine et la minéralisation de celle-ci. — Si l'on vient, après le premier temps de l'opération, alors qu'on s'est débarrassé des phosphates calciques et magnésiens, à précipiter *rapidement* la caséine, c'est-à-dire si l'on ne procède pas

lentement comme il a été indiqué plus haut, la caséine obtenue est très minéralisée, mais son contenu en phosphore est faible. Cela indique bien qu'on a enlevé les phosphates minéraux, mais qu'on a retenu du calcium sous forme de caséinate de calcium.

Le facteur *rapidité* apparaît donc comme devant jouer le rôle principal, — toutes autres conditions étant les mêmes, — dans la minéralisation de la *caséine-acide*.

La préparation de VAN SLYKE et BAKER peut être faite en 10 heures, alors que, par la méthode de O. HAMMARSTEN, il faut plus de temps — et elle a l'avantage de recourir au lait écrémé sans dilution ; on diminue donc ainsi la quantité de matière à travailler.

Dans l'industrie, la préparation de la *caséine-lactique* demande bien sensiblement le même temps et même plus, puisque la fermentation lactique exige plusieurs heures, mais la préparation des *caséines-acides* par acidification provoquée est faite beaucoup plus rapidement. Il s'en faut que les précautions indiquées par VAN SLYKE et BAKER soient observées. Souvent on chauffe trop, l'apport d'acide est brutal et sa répartition fort inégale, on agite très irrégulièrement, on provoque des précipitations massives qui englobent, dans la sorte d'éponge obtenue, beaucoup de sérum et la plus grande partie des sels insolubles lesquels ne disparaîtront point au lavage.

Qu'on ne s'étonne pas après cela que la *caséine-acide* d'acidification provoquée soit très minéralisée. *En s'adressant au même lait et aux mêmes proportions d'acide, nous obtiendrons, en faisant seulement varier trois conditions : température de précipitation, rapidité de l'agitation et vitesse de l'arrivée de l'acide, des caséines-acides de charges minérales tout à fait dissemblables.*

Nous reviendrons d'ailleurs à la fin de ce chapitre sur des considérations du même ordre.

La caséine sèche obtenue par VAN SLYKE et BAKER forme une poudre très fine sans qu'il soit besoin de la moudre, et habituellement 90 % passe à travers un tamis de 100 mailles au pouce. Cette caséine se dissout facilement dans les alcalis et dans la chaux. Enfin, il est facile d'obtenir toute la caséine du lait sans grandes pertes alors que dans les autres procédés, celles-ci peuvent être considérables.

Nous ne saurions trop marquer l'intérêt de la technique de VAN SLYKE et BAKER qui met bien en relief les précautions qu'il faut prendre dans la préparation de cette protéine. A notre laboratoire, où nous avons eu à travailler sur des quantités relativement importantes de caséine, nous avons utilisé la méthode par dilution de HAMMARSTEN en la faisant porter sur 10 litres de lait à la fois, mais nous avons toujours pris soin de suivre les opérations au potentiomètre pour être assuré d'effectuer nos précipitations exactement au point isoélectrique $pH = 4,6$

et nos redissolutions dans les alcalis, afin de ne jamais dépasser le $pH = 7$. En effet, quand la caséine est humide, fortement gonflée, elle se dissout très facilement dans les alcalis. Aussi, tout excès de ceux-ci, soude ou ammoniacale, peut être évité. Dans le chapitre qu'il a rédigé dans le livre de SUTERMESITER, R. A. GORTNER fait bien remarquer que le pH de la solution alcaline de caséine ne doit jamais excéder 8,5 (couleur rose franc à la phtaléine du phénol) et qu'il est préférable de ne pas dépasser le $pH = 7,5$. Nous estimons, d'après ce que nous venons de dire, qu'on peut même rester en deçà du $pH = 7$.

Mais, au préalable, nous parlerons d'expériences que nous avons faites dans le but : a) de préciser la quantité d'acide qu'il fallait employer pour arriver au point isoélectrique du lait dilué, et b) de déterminer le rôle de la température.

LES QUANTITÉS D'ACIDE NÉCESSAIRES POUR PRÉCIPITER LA CASÉINE AU POINT ISOÉLECTRIQUE. — Selon, en effet, que l'on opère à la température ordinaire ou à une température plus élevée, par exemple 50° , il faut des quantités d'acide différentes, puisque l'ionisation augmente avec la température. Dans les sortes de mesures dont nous parlons, on doit évidemment prendre en considération le pH du lait originel et ne jamais opérer sur des laits en voie d'acidification. Il faut donc s'adresser à des laits de mélange frais d'un pH moyen de 6,6-6,7.

Nous avons toujours opéré avec HCl N/2. Nous estimons que l'emploi de l'acide chlorhydrique à cette dilution peut très bien convenir pour la précipitation de la caséine, dès l'instant où l'on suit au potentiomètre la marche de la réaction des liqueurs.

Précipitation de la caséine par HCl N/2 :

a) pH initial du lait : 6,60.

Par addition assez lente avec la microburette de HCl N/2, sous l'agitation électrique, deux essais nous montrent qu'on arrive à un $pH = 4,7$ avec $2,4 \text{ cm}^3$ d'acide pour 20 cm^3 de lait.

b) pH du lait originel : 6,74.

Précipitation à la température ordinaire. (18°) : 20 cm^3 de lait + $2,4 \text{ cm}^3$ HCl N/2.
 pH du filtrat = 4,80.

Si la précipitation a lieu à 50° , nous avons un $pH = 4,83$, le même sensiblement que le précédent, avec seulement $1,8 \text{ cm}^3$ de HCl N/2.

Nous augmentons légèrement la quantité d'acide et voici les résultats obtenus :

A la température ordinaire, avec $2,5 \text{ cm}^3$ de HCl, N/2, $pH = 4,58$;

A 50° , avec $1,9 \text{ cm}^3$ de HCl N/2, $pH = 4,62$.

Influence de la rapidité. — De ces deux essais, il résulte que pour précipiter rapidement la caséine du lait au point isoélectrique, à la température ordinaire, il faut pour des laits de $pH = 6,6-6,7$, c'est-à-dire de réaction tout à fait normale, une quantité de HCl N/2 répondant à $120-125 \text{ cm}^3$ pour un litre de lait, soit $60-62 \text{ cm}^3$ 5 de HCl N/1.

Dans leur mode de préparation, VAN SLYKE et BAKER estiment

à environ 75 cm³ la quantité de HCl N/1 nécessaire pour précipiter la caséine d'un litre de lait non dilué. La différence est donc assez grande, mais nous devons nous l'expliquer par ce fait que nous déterminons le pH du sérum acide après une précipitation de la caséine *rapidement* obtenue, alors que les auteurs américains opèrent avec une *extrême lenteur* de façon à rendre aussi complet que possible le jeu de l'acide sur les sels sensibles à son action, notamment les phosphates de calcium et le caséinate de calcium.

Nos expériences ont permis également de nous rendre compte de *l'influence considérable de la température*, puisqu'il faut environ un quart en moins de HCl quand on opère à 50° au lieu de la température ordinaire.

Nous n'oublierons pas de relever la petite différence que nous avons obtenue dans le pH du sérum avec les deux laits qui nous ont servi et dont nous avons parlé plus haut. L'un était un peu plus alcalin, de pH = 6,74 ; aussi, avec la même quantité de HCl N/2 que celle que nous avons utilisée pour le lait un peu plus acide de pH = 6,60, le sérum avait un pH plus grand que celui du dernier, 4,80 au lieu de 4,70.

Cela corrobore l'observation que nous avons présentée tout à l'heure de *la nécessité de prendre en considération le pH du lait originel* et de *ne jamais opérer sur des laits en voie d'acidification*, car les quantités d'acide que l'on aurait à utiliser pour arriver au point isoélectrique pourraient être notablement différentes.

Il est bien évident que lorsque la caséine précipitée a subi un premier lavage, et qu'on la redissout ultérieurement dans de la soude ou de l'ammoniaque afin de la précipiter à nouveau, il faut beaucoup moins d'acide pour obtenir la seconde précipitation, toujours au point isoélectrique, en admettant, bien entendu, que lors de la redissolution de la caséine, la liqueur alcaline ait été amenée à un pH voisin de celui du lait originel.

650 cm³ de lait de pH = 6,60 ont été précipités par 78 cm³ de HCl N/2.

On laisse reposer toute la nuit et le lendemain la caséine est parfaitement rassemblée. On la jette sur un linge et on se contente de la passer à la presse. On obtient ainsi un gâteau peu humide que l'on dissout dans de la soude avec beaucoup de précautions pour avoir un pH ne dépassant pas 6,60 ; la liqueur homogène obtenue a, en effet, un pH = 6,43. Nous n'avons pas poussé plus loin l'addition de soude, puis nous avons ajouté HCl N/2 ; le pH du filtrat est 4,74. Pour y parvenir, il nous a fallu, pour 20 cm³ de la liqueur, 0,6 cm³ de HCl N/2, c'est-à-dire *exactement le quart de la quantité que l'on doit employer pour arriver sensiblement au même résultat lorsqu'on part du lait*.

Il est facile de comprendre pourquoi il en est ainsi. Le lait n'est pas une solution pure de caséinate. A côté du caséinate calcique, il est des sels qui entrent en réaction avec l'acide chlorhydrique ajouté, notamment les phosphates calciques et magnésiens qui sont transformés en

phosphate mono-calciqne et mono-magnésien, les citrates de Ca et de Mg : il est également des matières protéiques comme l'albumine qui servent de tampon.

La quantité d'acide qu'il faut mettre en œuvre pour précipiter la caséine ne sert donc pas uniquement à cette précipitation, mais à d'autres réactions plus complexes encore.

Aussi, quand la caséine a été débarrassée du sérum acide, qu'elle a été lavée, puis redissoute dans l'ammoniaque, la soude, la potasse ou la chaux, l'acide présent n'aura plus qu'à précipiter la caséine de son sel, l'effet tampon du caséinate étant négligeable.

Dans le procédé de VAN SLYKE et BAKER, nous avons vu comment ces auteurs surveillaient l'approche du point isoélectrique, c'est-à-dire le moment où, par une légère modification de celui-ci dans le sens de l'acidité, la caséine allait flocculer nettement.

L'expérience suivante montre la marche descendante du pH , c'est-à-dire la marche vers l'acidité *quand on dilue du lait additionné au préalable de HCl* pour amener le mélange près du point isoélectrique.

20 cm³ de lait sont additionnés de 2,4 cm³ de HCl N/2, puis successivement de 1, 2, 3, 4, et 5 volumes d'eau.

	pH
Lait pur acidifié	4,66
id + 1 volume d'eau.	4,62
+ 2	4,61
+ 3	4,60
+ 4	4,60
+ 5	4,58

L'eau ajoutée avait un $pH = 6,94$, pH tout à fait remarquable pour de l'eau distillée et qui nous fait même penser que cette eau était peut-être très légèrement chargée de sels alcalins provenant des vases, l'eau bi-distillée ayant un pH inférieur.

Notre technique de préparation de la caséine. — Voyons maintenant les conditions dans lesquelles nous préparons la caséine.

Dans une cuve de 100 litres, nous mettons 10 litres de lait écrémé frais. Nous y ajoutons 40 litres d'eau distillée, puis, en mince filet et en agitant vigoureusement avec un fouet à lamelles métalliques comme celui qui sert à battre la crème, on apporte HCl N/2. Il est facile de suivre à l'œil nu la marche de la précipitation, et l'habitude que nous en avons maintenant dans notre laboratoire fait que le virage, — si nous pouvons nous permettre cette expression, étant donné qu'elle s'applique au passage d'une caséine encore gonflée, en imminence de précipitation, à la formation nette de flocons, — se fait pour une masse aussi grande de liquide avec une très petite marge d'acide.

Les premiers flocons diffluent nagent encore dans un liquide laiteux ; nous sommes près du point isoélectrique, entre 4,8 et 5. En ajoutant quelques cm³ de HCl N/2, le liquide s'éclaircit, l'apparence laiteuse disparaît, des flocons très nets se forment qui nagent au milieu d'un sérum jaune verdâtre limpide.

Si on jette quelques cm³ sur un filtre en papier, le sérum tout à fait clair passe très bien, alors que lorsque le liquide était laiteux, il passait difficilement, et encore trouble.

La quantité d'acide employée correspond pour la dilution du lait au chiffre que nous avons donné un peu plus haut. Les flocons se rassemblent rapidement au fond de la cuve pour former une masse assez compacte et le liquide est siphonné. Puis, la masse de caséine impure est jetée sur une passoire munie d'une toile, et lavée avec une grande quantité d'eau distillée. La première eau est un peu trouble, mais rapidement, elle passe claire.

Si le lavage était continué pendant trop longtemps, la caséine se gonflerait et l'eau redeviendrait trouble. Il faut savoir s'arrêter à ce moment. La caséine est jetée dans une grande capsule, puis broyée avec application dans plusieurs litres d'eau distillée qu'on ajoute graduellement et redissoute par de l'ammoniaque fortement dilué et en agitant vigoureusement.

L'apport d'ammoniaque doit être extrêmement surveillé ; *dans aucune circonstance, il ne faut dépasser $pH = 7$* , avons-nous vu. Toutes ces opérations sont d'ailleurs suivies avec le potentiomètre à l'électrode à quinhydrone qui permet de faire des déterminations rapides.

La caséine correspondant aux 10 litres de lait écrémé, les pertes immanquables étant laissées de côté, est amenée ainsi à occuper un volume de 10 litres environ en solution ammoniacale neutre ou légèrement acide de $pH < 7$. On en précipite la protéine par HCl N/2. Nous savons qu'il faut une quantité de cet acide quatre fois moindre que lorsqu'il s'agit de la précipitation initiale. Il est même préférable de diluer la quantité de HCl N/2 nécessaire avec quatre fois son volume d'eau. L'apport de cet acide est fait lentement en battant énergiquement le caséinate avec le fouet métallique. Les flocons que l'on obtient dans ces conditions sont beaucoup plus menus que lors de la première précipitation ; le point isoélectrique est surveillé dans les mêmes conditions que lorsqu'il s'agissait du lait ; on n'a qu'à se reporter à ce que nous avons dit un peu plus haut.

La caséine rassemblée est jetée sur une passoire munie d'un linge, lavée avec une grande quantité d'eau distillée, jusqu'à ce que l'eau de lavage ne donne avec le réactif de NESSLER qu'une coloration jaune extrêmement pâle.

Cette caséine est redissoute une seconde fois dans l'eau ammoniacale, reprécipitée encore par l'acide chlorhydrique, et l'on recommence une troisième fois les opérations :

La caséine a donc été l'objet de quatre précipitations en comprenant celle qui a porté sur le lait.

Le lavage lors de la dernière précipitation doit être tout à fait soigné de façon qu'avec le réactif de NESSLER, on n'obtienne plus de coloration.

La caséine est rassemblée, filtrée sous le vide de manière à recueillir un gâteau épais, ferme, aussi peu humide que possible. Ce dernier est broyé avec soin dans de l'alcool à 90°, alcool qui va se trouver dilué par l'eau du gâteau de caséine, puis on porte, par petites portions, au Soxhlet, en ayant soin de mettre la caséine dans un nouet de toile fine. On lave à l'alcool à plusieurs reprises ; une dizaine de rinçages peuvent être ainsi réalisés.

L'alcool deshydrate la caséine en même temps qu'il la lave. Il se fait un éther, du caséinate d'éthyle, qui est déjà un peu soluble dans l'alcool, si bien que, de ce côté, il y a des pertes, mais elles ne sont pas considérables. Cette réaction entre la caséine

et l'alcool ne semble pas dénaturer la protéine, le caséinate d'éthyle étant très peu stable et se dissociant facilement.

La caséine traitée par l'alcool est filtrée sous le vide, puis le gâteau obtenu comprimé, bien tassé, est broyé ensuite dans de l'éther anhydre. On refait un nouet avec un linge fin pour porter au Soxhlet, et on fait marcher pendant plusieurs heures. La caséine est peut-être ainsi lavée une vingtaine de fois par l'éther. On arrête à ce moment et on recueille la caséine que l'on tasse sous un vide léger pour la débarrasser de la plus grande partie de l'éther qui la mouille ; ensuite, on la porte dans un exsiccateur dans lequel on fait un vide modéré. On obtient ainsi une poudre extrêmement fine, très friable qui pendant longtemps encore sent l'alcool, les nombreux lavages à l'éther n'ayant pas débarrassé la caséine de l'alcool qui l'avait imprégnée, parce qu'il y était resté fixé sous la forme d'éther éthylique.

Nous n'avons jamais observé que la dessiccation de la caséine, avec les précautions que nous prenons, ait déterminé à la surface de la pâte encore humide de l'éther du Soxhlet, comme une croûte difficile à pulvériser. Nous n'avons pas eu besoin de recourir à un traitement par l'éther de pétrole au point d'ébullition élevé (60° par exemple), le benzène ou le toluène, comme le recommandent VAN SLYKE et BAKER, mais nous reconnaissons bien volontiers que l'emploi de ces dissolvants neutres ne peut donner que d'excellents résultats.

L'emploi de l'acétone. — Dans nos dernières préparations, nous avons substitué, à l'éther, l'acétone qui bout à 56°, et la caséine dégraissée par l'acétone s'est fort bien débarrassée de ce produit sous l'action du vide et nous a donné une poudre tout aussi belle que celle que nous obtenions précédemment avec l'éther. Sans doute, pourrait-on même n'employer que de l'acétone qui jouerait le même rôle que l'alcool, d'une part, et l'éther, d'autre part. Avec l'acétone, il n'y a pas de formation de caséinate d'éthyle à envisager.

Un des avantages de l'éther, c'est qu'il s'agit là d'un dissolvant très antiseptique. La caséine que nous obtenons est stérile et, par conséquent, pourrait être employée, en observant toutes les précautions que les recherches microbiologiques imposent, pour faire des solutions qui n'auraient pas besoin d'être stérilisées ou additionnées d'un liquide antifermentescible, comme le toluène ou l'essence de moutarde. L'éther ordinaire, bien qu'anhydre, est toujours chargé plus ou moins d'une certaine quantité de peroxyde d'éthyle. Sans doute, est-ce à celui-ci qu'est due l'action antiseptique si marquée de l'éther que l'on utilise dans certaines recherches de chimie biologique.

La caséine préparée, comme nous venons de le voir, renferme des quantités faibles de cendres, un peu plus cependant que celles qui sont données par le procédé de VAN SLYKE et BAKER. Leur taux oscille entre 0,20 et 0,40 %. C'est une caséine suffisamment pure pour les recherches qui seront exposées dans la suite de ce travail. La technique de notre laboratoire nous permet d'obtenir du premier jet, avec beaucoup

de peine et de temps, il faut le reconnaître, *une quantité importante de caséine*. Nous commençons de très bonne heure le matin pour arriver le soir à laver la caséine dans l'alcool.

Si nous préparions la caséine avec des quantités faibles de lait, un litre ou deux au maximum, ce qui nous permettrait d'assurer plus facilement une violente agitation lors de l'apport acide, et si nous faisons une ou deux précipitations de plus, nous pourrions arriver à obtenir des caséines presque démunies de cendres. Nous en avons obtenu à plusieurs reprises ne renfermant que des traces.

Ne pas partir de caséine commerciale pour préparer de la caséine pure. — Certains auteurs, comme nous-même au début, sont partis de la caséine commerciale pour préparer de la caséine pure : c'est là un procédé que nous ne saurions préconiser, parce que dans les recherches aussi délicates que celles qu'exige l'obtention d'une caséine pure, il est indispensable de la préparer soi-même. La caséine commerciale ne saurait nous donner à ce point de vue toutes les garanties, car nous ignorons de quelle façon elle a été préparée.

Les remarques que nous avons présentées plus haut, au sujet de la technique de VAN SLYKE et BAKER, nous ont permis de relever la grande difficulté, sinon l'impossibilité, de débarrasser totalement une caséine acide mal préparée de ses cendres. Si donc, l'on s'adresse à une caséine commerciale souvent trop minéralisée, les successives opérations de redissolution et de reprécipitation enlèveront sans doute une partie des cendres, mais ne nous permettront pas d'arriver à l'obtention d'une caséine d'un taux minéral extrêmement réduit.

En résumé, la préparation de la caséine au laboratoire exige une acidification provoquée. On n'obtiendrait pas de résultats satisfaisants si on laissait le lait s'acidifier spontanément sous le développement fermentaire lactique. Que la laiterie ait recours à ce procédé, cela se comprend pour des raisons économiques, et d'ailleurs, la qualité de la caséine obtenue et qu'on appelle *lactique*, donne toute satisfaction à l'industrie. Mais, une autre raison va nous montrer les inconvénients dans lesquels on pourrait tomber si l'on voulait préparer de la caséine pure en faisant appel à la fermentation lactique spontanée ; c'est que celle-ci n'est pas toujours sous la dépendance de germes semblables à eux-mêmes. La flore du lait qui s'acidifie est composite, irrégulière, et certains ferments protéolytiques peuvent intervenir pour fausser la fermentation lactique. Dans ce cas, le coagulum qui est obtenu ressemble en partie à celui de la caséine-présure, et le produit final participe donc à la fois de la caséine lactique et de la caséine-présure.

Nous reviendrons plus loin sur ce point intéressant.

PRÉPARATION DE LA CASÉINE DANS L'INDUSTRIE.

Ainsi que nous l'avons dit un peu plus haut, nous n'avons pas ici l'intention d'exposer en détail la fabrication industrielle de la caséine, cette question devant être réservée pour un travail qui paraîtra plus tard ; mais nous estimons cependant nécessaire d'entrer dans quelques considérations qui serviront d'introduction au dit travail.

Nous avons fait remarquer que si la caséine-acide *pure* est une espèce chimique facile à préparer et qui reste identique à elle-même, il n'en est pas ainsi de la caséine *industrielle*. La préparation du corps pur exige, nous l'avons vu, des précautions spéciales qui se ramènent à celles-ci :

a) *La précipitation doit être lente* pour amener la solubilisation graduelle du phosphate de calcium et de la chaux du caséinate ;

b) *Il faut opérer à basse température ;*

c) *La réaction ne doit pas dépasser un certain degré d'acidité caractérisé par un $\text{pH} = 4,6$.*

Ces conditions sont rarement, pour ne pas dire jamais, celles de l'industrie. On nous objectera sans doute qu'il est difficile de s'y conformer. Nous l'acceptons avec cette réserve toutefois qu'il est souvent loisible de faire mieux, et c'est, parce que le pouvant, l'industriel ne le fait pas, que notre critique garde sa valeur.

Selon que la caséine est préparée par *acidification spontanée*, — par *auto-acidification*, dirions-nous encore, et si nous avons recours à l'expression anglaise, par *self-acidification*, — ou que la caséine est obtenue par *acidification provoquée*, nous avons vu pourquoi sa charge minérale, qui théoriquement devrait être nulle, peut être assez considérable ; mais d'autres raisons sont à faire valoir.

Lorsqu'on laisse le lait écrémé s'acidifier graduellement, la caséine, — nous l'avons vu — précipite très lentement, par suite du développement également lent de la fermentation lactique ; elle forme une masse compacte qu'on peut comparer à une sorte d'éponge dans les mailles de laquelle le sérum du lait, avec sa charge saline initiale, mais modifiée, — la chaux du caséinate étant passée à l'état de lactate, et le phosphate calcique étant solubilisé, — se trouve logé ; cette éponge se contracte un peu et laisse exsuder du sérum liquide. Il y a eu précipitation de la caséine en un bloc fragile qu'il est facile de rompre, de briser en petits fragments qui se rassembleront au fond de la cuve. Le sérum jaunâtre surnageant est plus ou moins trouble ; on le filtre comme il est fait dans l'industrie, à travers un linge épais, de façon à retenir les petits morceaux de caséine qui, sans cela, seraient entraînés par le courant de sérum et diminueraient d'autant le rendement.

Il est évident que si la masse des flocons de caséine qui ont une grande tendance à se souder à nouveau, surtout si l'on a employé trop d'acide n'est pas rompue comme il faut, que si, de plus, la caséine est mal cuite et n'est pas lavée, on conçoit que les flocons, en se rétractant,

gardent à leur intérieur du sérum résiduel avec ses matières salines. Ils gardent également du lactose et enfin de l'acide lactique provenant de la fermentation et qui a été l'agent précipitant. Certaines caséines lactiques jetées sur le marché sont ainsi fortement acides, ce qui nuit à leur valeur marchande.

Si l'acidification est provoquée par apport d'un acide autre que l'acide lactique, — acide chlorhydrique, acide sulfurique, acide acétique, acide formique, — mais l'industrie, avons-nous vu, ne fait guère appel qu'aux deux premiers, plus rarement au troisième, — il n'y a plus cette fois de précipitation en masse. Le dépôt de la caséine au sein du sérum du lait, au lieu de se produire fort lentement, apparaîtrait très rapidement sous la forme de flocons. Encore une fois, opposons la précipitation acide spontanée qui est *lente*, ménagée, et demande plusieurs heures, à la précipitation acide provoquée qui est *brusque*. *La rapidité de celle-ci la rend incomplète, en même temps qu'elle favorise l'emprisonnement du sérum dans les flocons.*

Elle la rend incomplète, puisque nous avons vu que si VAN SLYKE et BAKER ont eu besoin de 75 cm³ de HCl N/1 pour amener la précipitation au point isoélectrique de la caséine d'un litre de lait, en procédant *lentement* comme ils l'indiquent, 60-62,5 seulement, entre nos mains, ont été nécessaires pour amener cette même précipitation au point isoélectrique si l'on opère *rapidement*. A la différence, soit 12,5 cm³ à 15 cm³ HCl N/1, répond une certaine quantité de substances minérales, phosphates de calcium et chaux du caséinate, qui n'ont pu être solubilisés.

La rapidité de la précipitation, disons-nous encore, *favorise l'emprisonnement du sérum dans les flocons*. Ceux-ci, en effet, lorsque l'apport d'acide est trop vigoureux, sont gros et ont une tendance à se souder pour donner des masses compactes ; cette tendance s'exagère si la précipitation se fait à une température un peu trop élevée. Ces masses rétractées, élastiques, sont d'un lavage difficile, quelque soin que l'on apporte à les briser. Si le lavage paraît facile, ce n'est qu'en apparence, parce que le grain formé est peu perméable ; on n'en rince que la surface et ainsi on ne parvient pas à le débarrasser du sérum qu'il a emprisonné en se formant.

On s'explique donc, une fois de plus, les grandes variations dans la minéralisation des caséines acides. Si, à l'exemple de VAN SLYKE et de BAKER, on prenait *industriellement* les précautions suivantes sur lesquelles nous estimons utile de revenir : si on précipitait à *froid*, jamais du moins au-dessus de 40°, *lentement*, en *agitant fort*, ce qui amène une dispersion des flocons alors qu'ils se forment, si on *surveillait l'acidité* du milieu pour ne pas dépasser le pH indiqué ci-dessus et qui répond au point isoélectrique, la caséine que l'on obtiendrait alors et que les Américains ont appelée « grain-curd », caséine qui avait été demandée par leur aviation pendant la guerre, serait apte à certains usages auxquels

répondent quelquefois assez mal les caséines industrielles offertes jusqu'ici à la consommation. La caséine du procédé « grain-curd » est d'un lavage facile pouvant être effectué à l'essoreuse et poussé profondément ; elle se presse mieux et se sèche mieux. Ainsi, en ayant recours à la technique que nous venons de résumer, tous les temps de la fabrication sont mécaniques et automatiques, ce qui permet la réduction de la main-d'œuvre et tend à régulariser le produit fabriqué.

Avec le même lait, on peut obtenir toutes sortes de caséines acides ; pour cela, on n'a qu'à faire varier les conditions de la précipitation. Ainsi, nous comprenons maintenant l'assertion de plusieurs auteurs qui ont étudié la caséine, principalement au point de vue industriel, et que nous rappelions plus haut : il y a autant de caséines que de modes de préparations, mais de là à vouloir assigner à telle ou telle d'entre elles comme une formule qui explique sa structure chimique, il y a loin. Une mauvaise technique reste une mauvaise technique. C'est elle qu'il faut améliorer et, du même coup, le schéma du produit obtenu s'en trouve lui-même modifié. C'est dire qu'il est sans valeur (174, 175).

Le travail de la caséine, après précipitation, se ramène essentiellement aux temps suivants :

- a) Laver ;
- b) Presser ;
- c) Sécher.

Mais que de variantes dans l'exécution de ces temps ! Ce que nous venons d'en dire permet de comprendre qu'à ces variantes répondent des variations dans la composition chimique de la caséine envisagée uniquement du côté de sa minéralisation.

Tous ces points seront examinés en détail dans le travail ultérieur dont nous avons déjà parlé. (à suivre).

RECHERCHES SUR LA PASTEURISATION BASSE DU LAIT. UNE NOUVELLE RÉACTION POUR CONTROLER LA TEMPÉRATURE DE CHAUFFAGE

par le Professeur ORLA-JENSEN,

D^r en philosophie et D^r ès-sciences,

avec la collaboration de C. LE DOUS, JOHANNE JACOBSEN

et N. C. OTTE.

(Suite)

Comme l'agglutinine a des tendances à suivre la globuline, il faut d'avance s'attendre à ce que toute l'agglutinine, ou en tout cas une partie importante, s'en aille dans le sérum, et c'est pourquoi il est intéressant

(174) M. FOUASSIER. — Les caséines commerciales, leur extraction, leurs caractères. La caséine alimentaire. *Bull. Soc. Hyg. Alim.* 1928, **16**, 218. et *Ann. des Falsif. et des Fraudes*, 1928, **21**, 340.

(175) Ch. PORCHER et M^{lle} J. BRIGANDO. — Les différences analytiques de la caséine-acide et de la caséine-présure. *Ann. des Falsif. et des Fraudes*, mars 1929, **22**.