MÉMOIRES ORIGINAUX (1)

PHOSPHORE LIPOÏDIQUE ET PHOSPHATIDES
DU LAIT DE VACHE

par

J. E. LOBSTEIN

M. FLATTER

Professeur

Assistant

à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg.

Pour doser les phosphatides du lait, deux séries d'essais ont été effectuées. La plupart des auteurs déterminent le phosphore lipoïdique et l'expriment en lécithine en le multipliant simplement par un facteur voisin de 25 (ce qui correspond à une richesse en phosphore d'environ 4%). Quelques analystes ont cependant essayé d'isoler quantitativement les phosphatides non modifiés du lait.

Nous avons rassemblé dans le tableau I les résultats moyens obtenus par les différents auteurs qui ont dosé le phosphore lipoïdique dans le lait de vache.

Si l'on fait abstraction des travaux de SCHLOSSMANN [18] et de NJEGOVAN [15], qui nient la présence de phosphatides dans le lait, on arrive à la conclusion que le lait de vache renferme en moyenne 650 milligrammes de phosphatides par litre. Mais il convient de souligner que cette moyenne résulte de données fort différentes, les extrêmes étant 230 et 1.500.

Aussi certains auteurs ont-ils essayé d'isoler quantitativement les phosphatides du lait. OSBORNE et WAKEMAN [16], en traitant par de l'alcool les protides précipités d'un lait écrémé, obtiennent un extrait qui cède à l'éther un mélange de mono et de diamino-phosphatides insolubles dans l'acétone. De cette façon, ils arrivent à isoler 27 milligrammes de phosphatides à partir de un litre de lait. En opérant sur des poudres de lait du commerce, BISCHOFF [2] arrive à extraire 275 milligrammes de phosphatides impurs (?) d'une quantité de poudre équivalant à un litre de lait; SASAKI et HRATSUKA (2) n'en retirent que 100 milligrammes de phosphatides saturés, tandis que DIEMAIR, BLEYER et OTT (3) trouvent 266 milligrammes qui se réduisent à 114 par la purification.

Au total, en ce qui concerne la quantité de phosphatides contenus dans le lait, les différents dosages du phosphore lipoïdique aboutissent à des résultats fort discordants, dont la moyenne est voisine de 650 milligrammes par litre de lait, tandis que les essais

(1) Reproduction interdite sans indication de source.

(2) Rinjiro SASAKI et Eikichi HRATSUKA. *Proceed. Imp. Acad. Tokyo* 1931, 99-101.(3) W. DIEMAIR, B. BLEYER et M. OTT. *Biochem. Ztschr.* 1934, 272, 119-132.

TABEAU I
DOSAGE DES PHOSPHATIDES DU LAIT DE VACHE PAR LA DÉTERMINATION
DU PHOSPHORE LIPOÏDIQUE

Auteurs	Méthodes utilisées		Phosphatides (en milligrammes de lécithine par litre de lait)
	Précipitation	Extraction	
Woods [22]	Alcoolique.	Alcoolique du coagulum ; extrait repris par l'éther.	800
Nerking et Hänsel [14]	Id.	Chloroformique du coagulum et du lactosérum.	620
Bordas et Raczkowski [4]	Alcoolique et acétique.	Alcoolique du coagulum ; extrait repris par l'éther.	580
Brodick-Pittard [5]	Ethéro-alcoolique	Chloroformique du lactosérum desséché au SO^4Na^2 anhydre.	300
Mohr, Brockmann et Muller [13].....	Id.	Id.	370
Kieferle et Hindermith [11]	Id.	Id.	230
Hess et Helman [10]	Ethéro-alcoolique	(Le lactosérum constitue l'extrait.)	1.500
Burow [6].....	Ethéro-alcoolique et acétique.	Ethérée du coagulum et du lactosérum.	540
Chapman [7]	Méthode de Röse-Gottlieb [17].		640

d'extraction quantitative donnent respectivement : 27 milligrammes (OSBORNE), 275 milligrammes (BISCHOFF), 100 milligrammes (SASAKI) et 266 milligrammes (DIEMAIR).

L'étude des phosphatides du lait était donc à reprendre. En se plaçant sur le terrain purement analytique, il fallait :

1° Etudier les conditions nécessaires pour effectuer un dosage exact de phosphore lipoiidique ;

2° Mettre au point une méthode pratique d'extraction et de purification des phosphatides du lait.

Tel a été l'objet du présent travail.

DOSAGE DU PHOSPHORE LIPOÏDIQUE DANS LE LAIT DE VACHE

Le dosage du phosphore lipoiidique comporte deux opérations :

1° L'extraction des phosphatides ;

2° Le dosage du phosphore proprement dit.

Nous allons étudier surtout l'extraction des phosphatides, le dosage du phosphore ayant fait l'objet d'une note publiée précédemment (1). Dans le but de rechercher les causes d'erreur, d'origines diverses, nous avons vérifié un certain nombre de procédés déjà employés (procédés de Woods, Hess et Helman, Adam, Röse-Gottlieb) — nous en avons essayé d'autres à titre de comparaison (précipitations acétique et acétonique suivies d'extractions alcooliques des coagulums).

Tous nos essais ont porté sur un lait de grand mélange, celui de la Laiterie centrale de Strasbourg.

Les moyennes de nos résultats sont données dans le tableau II.

TABLEAU II

DÉTERMINATION DU PHOSPHORE LIPOÏDIQUE DANS LE LAIT DE VACHE

Méthodes utilisées	Phosphatides (en milligrammes de lécithine par litre de lait)
Précipitation et extraction alcooliques (méthode de Woods modifiée) (2)	320
Précipitation et extraction éthéro-alcooliques (méthode de Hess et Helman modifiée) (3)	324
Précipitation acétonique et extraction alcoolique	274
Précipitation acétique et extraction alcoolique	269
Méthode d'Adam [1]	306
Méthode de Röse-Gottlieb [17]	294

Moyennes : 293 milligrammes de lécithine par litre.

Si l'on considère le tableau II, d'une part, et si on le compare au tableau I, d'autre part, on peut formuler les conclusions suivantes :

1^o Les chiffres de phosphore lipoïdique que nous avons trouvés sont suffisamment concordants et nous autorisent donc à admettre pour le lait de vache une teneur moyenne de 300 milligrammes de phosphatides par litre

2^o Toutes les méthodes antérieures, à l'exception de celle de Brodrick-Pittard [5], aboutissent à des erreurs par excès. Les résultats qu'elles ont fournis sont sujets à révision ; on ne peut même pas leur reconnaître une valeur relative (de comparaison), comme le pensent TRAUTMANN et KIRCHHOF [21], car l'erreur, qui atteint dans certains cas 400 %, englobe forcément les variations éventuelles du phosphore lipoïdique. La méthode de

(1) M. FLATTER. *Bulletin de la Société de Chimie biologique*, 1933, XV, 607.

(2) La dessiccation des extraits a été effectuée à une température inférieure à 50°, alors que Woods opère au bain-marie bouillant. D'autre part, les extraits desséchés ont été repris par de l'éther rigoureusement anhydre.

(3) L'extrait éthéro-alcoolique est évaporé à sec à basse température et repris par de l'éther anhydre.

BRODRICK-PITTARD elle-même, donne, entre les mains de chimistes différents, des écarts variant de 40 à 60% (Tableau I).

Comment expliquer ces erreurs par excès ?

Pour que la détermination du phosphore lipoidique ait réellement la valeur d'un dosage indirect des phosphatides, il faut :

a) Qu'elle s'effectue sur un extrait totalement dépourvu de toute autre substance phosphorée ;

b) Que cet extrait renferme la totalité des phosphatides.

Il semble que c'est surtout la première condition qui a été rarement observée. En effet, dans le lait de vache, le phosphore des phosphatides représente environ la 75^e partie du phosphore total, et il suffit qu'un coagulum soit mal lavé ou imparfaitement desséché pour qu'il cède à l'alcool ou à l'éther des substances phosphorées étrangères aux lipoides.

Certains auteurs, dont HESS et HELMAN [10], objectent que la dessiccation des extraits rend très difficile un épuisement ultérieur, car les lipoides sont entourés de protides. A l'appui de leur thèse, ils citent l'essai suivant :

Phosphore lipoidique d'un lait desséché à poids constant :

1,77.

Phosphore lipoidique du même lait légèrement humecté :

4,91.

La différence, à notre avis, s'explique, non pas par une plus grande dissolution des phosphatides, mais simplement par la solubilité des phosphates et de la caséine dans les solvants organiques non anhydres.

Du reste, les arguments que HESS et HELMAN donnent en faveur de leur méthode (1) sont loin d'être irréfutables :

1^o L'addition de 0 mgr. 5 de phosphore (à l'état de phosphate monopotassique) à 45 cm³ de lait, ne change évidemment rien au dosage du phosphore lipoidique, puisque, avec le procédé des auteurs, la limite de solubilité des phosphates dans le mélange éther-alcool-eau est déjà atteinte avec les phosphates naturels du lait.

2^o Contrairement aux affirmations de HESS et HELMAN, nous avons toujours trouvé dans l'extrait préparé d'après la méthode de ces auteurs, du phosphore minéral, et peut-être y a-t-il également du phosphore protidique, quoique la réaction de Millon ait été négative. Aussi, en reprenant par l'éther anhydre un extrait dont le phosphore correspondait à 1 gr. 63 de phos-

(1) La méthode de Hess et Helman est une modification du procédé d'extraction de Bloor [3]. 5 cm³ de lait sont versés dans 30 cm³ d'un mélange d'alcool et d'éther (3 + 1). Après un chauffage de 2 minutes, on complète à 100, on filtre et l'on dose le phosphore dans le filtrat.

phatides par litre de lait, avons-nous trouvé seulement 324 milligrammes de phosphatides éthéro-solubles.

Au total, pour effectuer un dosage de phosphore lipoidique correct, la principale précaution à prendre consiste donc à éliminer le phosphore minéral et protidique. Pour ce faire, il suffit de reprendre les extraits par l'éther ou le chloroforme anhydres.

Mais une autre condition doit être également remplie : il faut en effet que l'extraction des phosphatides soit totale.

Disons tout de suite que l'extraction éthérée en l'absence d'alcool ou de chloroforme, ne donne qu'une très faible fraction de phosphatides. Voici le résumé d'un de nos essais :

Un litre de lait est versé dans 9 litres d'une solution d'acide acétique à 2 pour 1.000. On filtre sur toile et l'on précipite dans le filtrat, par ébullition, la lactalbumine et la lactoglobuline. Sur les deux coagulums réunis et desséchés dans le vide sulfurique, on effectue successivement une extraction éthérée, alcoolique, puis chloroformique. Les résultats obtenus figurent au tableau III.

TABLEAU III
EPUISEMENTS SUCCESSIFS DES PROTIDES DU LAIT

	Extrait total (en grammes)	Phosphatides (en milligrammes)	Pourcentage
Extraction éthérée	35,5	27	10,8
Extraction alcoolique	1,431	217	87,1
Extraction chloroformique	0,056	4,8	2,1

L'éther, tout en dissolvant la majeure partie des lipides, n'extrait donc que 10% environ des phosphatides qui sont liés aux protides par des liens relativement fragiles. L'extraction chloroformique, effectuée dans le but de voir s'il restait de la sphingomyéline dans le coagulum, n'a donné que des traces de phosphore lipoidique. Le diaminophosphatide, quoique insoluble dans l'éther et peu soluble dans l'alcool, a dû passer dans ce dernier solvant, comme le prouve du reste le rapport $N/P = 1,29$.

A l'inverse de l'éther, l'acétone, considérée comme un solvant précipitant les phosphatides, en dissout dans le lait 85% (222 milligrammes sur 274), et ceci vraisemblablement par suite de la très grande quantité de graisses neutres. L'alcool ou le chloroforme semblent donc être les solvants de choix pour l'extraction des phosphatides.

En résumé, pour déterminer le phosphore lipoidique dans le lait, toutes les méthodes qui emploient l'alcool ou le chloroforme donnent d'excellents résultats, mais il est nécessaire de dessécher soigneusement les extraits obtenus et de les reprendre par un solvant anhydre (éther ou chloroforme), de manière à éliminer les

impuretés phosphorées. Dans un but pratique, les méthodes d'Adam ou de Rôse-Gottlieb sont susceptibles de donner rapidement des résultats satisfaisants, à condition d'observer les règles exposées plus haut, d'effectuer deux essais parallèles et de prendre la moyenne de leurs résultats.

EXTRACTION ET PURIFICATION DES PHOSPHATIDES DU LAIT DE VACHE

Si la plupart des solvants, à part l'éther et l'acétone, extraient d'une façon complète les phosphatides du lait de vache, les extraits obtenus, par contre, ne sont pas également faciles à purifier. Un extrait alcoolique, par exemple, contenant 32 grammes de beurre et 326 milligrammes de phosphatides, a donné par précipitation à l'acétone 597 milligrammes d'un produit renfermant 142 milligrammes de phosphatides, c'est-à-dire 43% du phosphore lipoïdique total. Par des précipitations ultérieures en présence de chlorure de magnésium, nous avons obtenu, avec des pertes considérables, des mélanges dans lesquels les phosphatides ne représentaient jamais plus de 50%. Cet échec s'explique par le fait que certains glycérides mixtes (myristodipalmitine et myristodistéarine), insolubles dans l'acétone (1), sont entraînés dans les mêmes précipités que les phosphatides.

Il fallait donc trouver un solvant capable de dégraisser le lait sans enlever les phosphatides. Comme nous l'avons montré plus haut, l'éther remplit assez bien cette condition. Par l'extraction alcoolique consécutive, on obtient d'emblée un mélange renfermant au moins 10% de phosphatides, c'est-à-dire 10 fois plus que par une extraction alcoolique sans traitement préalable à l'éther; aussi la purification est-elle relativement plus aisée. En partant, par exemple, d'un extrait alcoolique de 1 gr. 11, on aboutit après deux précipitations acétoniques, à 185 milligrammes d'un produit renfermant 84% de phosphatides. Malheureusement, nous n'avons pas pu purifier davantage ce produit, le procédé de SANO (2) s'étant montré inopérant. Les impuretés ne sont ni de nature minérale, puisque les cendres ne sont guère supérieures à la normale, ni de nature glucidique, puisque le produit est à peine réducteur, ni de nature lipidique, car rien ne se dissout plus dans l'acétone. Il s'agit sans doute d'impuretés azotées, insolubles dans l'eau et solubles dans les mêmes solvants que les phosphatides.

A vrai dire, OSBORNE et WAKEMAN, en opérant sur de très grandes quantités de lait (60-3.000 litres), sont arrivés, les premiers, à préparer un mélange de lécithine et de céphaline à peu près pures :

(1) Ces glycérides mixtes ont été signalés en 1929 par DE COLLO et SCOPINARO [8].

(2) SANO (M.). *Journ. of Biochem.*, 1922, 1, 1.

$N = 1,81\%$, $P = 3,87\%$, $N/P = 1/0,97$; mais le procédé est très loin d'être quantitatif, les pertes dépassant largement 90%.

Au total, pour étudier les variations qualitatives des phosphatides du lait, et notamment celles des acides gras (1) qui en dérivent, la méthode suivante peut donner des indications suffisantes :

Le lait à analyser est versé dans son volume d'acide acétique à 1%. On filtre sur toile et l'on porte le filtrat à l'ébullition pendant 2-3 minutes. Le coagulum des protides réunis est lavé à l'eau légèrement acidulée par de l'acide acétique. On laisse égoutter quelques heures, puis on dessèche le coagulum dans le vide sulfurique pendant 3 jours, en changeant au moins une fois l'acide sulfurique. Le précipité ainsi desséché est épuisé à l'éther dans l'appareil de Kumagawa [12] pendant 4-6 heures. Débarrassé de l'éther dans le vide, le coagulum est alors traité par de l'alcool dans le même appareil pendant 6-8 heures. Pour les deux extractions (alcoolique et éthérée), il est indispensable de vider les cartouches et de triturer au mortier la poudre à épuiser ; sinon, il se forme des voies de solvant et l'épuisement se fait mal. L'extrait alcoolique concentré à pression réduite est repris par du chloroforme ; on filtre à travers un papier très poreux, puisque la solution est en général colloïdale. Après deux précipitations par l'acétone et le chlorure de magnésium, on obtient, avec 50% de pertes, 150 milligrammes environ de phosphatides au litre, renfermant encore à peu près 20% d'impuretés.

Si l'on compare les résultats obtenus par cette méthode à ceux de OSBORNE et WAKEMAN, d'une part, et à ceux de BISCHOFF, d'autre part, on peut, de leur ensemble, tirer un certain nombre de conclusions :

1° Un litre de lait renferme environ 300 milligrammes de phosphatides, à savoir : 50% de lécithines ; 25% de céphalines ; 25% de sphingomyélines.

2° L'indice d'iode des acides gras des monoaminophosphatides varie de 66,7 (moyenne de nos chiffres) à 74,4 (résultat obtenu par OSBORNE et WAKEMAN).

3° Les phosphatides d'un litre de lait se répartissent de la façon suivante :

Pourcentage des phosphatides retenus

Matières grasses extraites à l'éther	15,5
Coagulum de caséine	77
Coagulum de lactalbumine et lactoglobuline	5,5
Précipité obtenu par neutralisation du lactosérum ...	2

Dans le lait, tout comme dans le sang, les phospholipides sont

(1) F. KURTZ, G. JAMIESON et G. HOLM trouvent dans les phosphatides du babeurre les acides myristique, stéarique, oléique et des traces d'autres acides. (*Journ. of Biological Chemistry* 1934, 106, 717.)

associés aux protides. C'est la caséine qui en retient le plus (0,6% de son poids), puis viennent les protides coagulables (0,3% de leurs poids). Comme, d'autre part, le poids de caséine est en moyenne six fois plus élevé que celui des autres protides, il s'ensuit que les trois quarts des phosphatides sont liés à la caséine.

CONCLUSIONS

De l'étude que nous avons faite des phosphatides du lait de vache, se dégagent les conclusions suivantes :

1. Contrairement aux chiffres donnés par la plupart des auteurs, nous avons trouvé une teneur moyenne de 300 milligrammes de phosphatides par litre de lait, et cela en employant les procédés d'extraction les plus variés.

2. La détermination du phosphore lipoïdique peut se faire de différentes manières, à condition d'éliminer soigneusement le phosphore minéral et protidique. Pour des raisons de commodité et de rapidité, nous avons proposé la méthode d'Adam en tant que procédé d'extraction.

3. Pour la purification des phosphatides, nous avons adopté une méthode basée sur la précipitation du lait par l'acide acétique, le dégraissage du coagulum par l'éther et l'extraction des phosphatides par l'alcool. L'extrait alcoolique est ensuite soumis à la précipitation fractionnée par l'acétone et le chlorure de magnésium. De cette façon, on obtient, avec 50% de pertes, 150 milligrammes environ de phosphatides au litre, renfermant encore à peu près 20% d'impuretés.

4. Les phosphatides du lait forment avec les protides des complexes colloïdaux, ou s'unissent à eux par des liens chimiques relativement fragiles, pour donner des combinaisons insolubles dans l'éther, mais dissociées par l'alcool et l'acétone.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ADAM. *Journal de Pharmacie et de Chimie*, 1881, 3, 23-32.
- [2] BISCHOFF (G.). *Ztschr. f. Physiolog. Chemie*, 1928, 173, 227-232.
- [3] BLOOR (W. R.). *Journ. of Biological Chemistry*, 1915, 22, 113.
- [4] BORDAS et RACZKOWSKI. *C. R. Ac. Sciences*, 1902, 134, 1592.
- [5] BRODRICK-PITTARD. *Biochem. Ztschr.*, 1914, 67, 382.
- [6] BUROW (R.). *Ztschr. f. Physiolog. Chemie*, 1900, 30, 495.
- [7] CHAPMAN (O. W.). An. in *Le Lait*, 1931, 11, 411.
- [8] DE COLLO et SCOPINARO. An. in *Le Lait*, 1930, 30, 929.
- [9] GLIKIN (W.). *Biochem. Ztschr.*, 1909, 21, 348.
- [10] HESS et HELMAN. *Journ. of Biological Chemistry*, 1925, 64, 781.
- [11] KIEFERLE et HINDEMITH. An. in *Le Lait*, 1934, 14, 504.
- [12] KUMAGAWA et SUTO. *Biochem. Ztschr.*, 1908, 8, 212.
- [13] MOHR, BROCKMANN et MULLER. An. in *Le Lait*, 1934, 14, 746.
- [14] NERKING et HAENSEL. *Biochem. Ztschr.*, 1908, 13, 348.
- [15] NJEGOVAN (V.). *Biochem. Ztschr.*, 1910, 29, 491; et 1913, 54, 78.

- [16] OSBORNE et WAKEMAN. *Journ. of Biol. Chem.*, 1915, 21, 539 ; et 1916, 28, 1.
- [17] RÖSE-GOTTLIEB. *Le Lait*, 1926, 6, 54.
- [18] SCHLOSSMANN. *Ztschr. f. Physiolog. Chemie*, 1905, 47, 327.
- [19] STOKLASA (J.). *Ztschr. f. Physiolog. Chemie*, 1897, 23, 343.
- [20] TOLMATSCHEFF. *Hoppe-Seyler's med. chem. Unters.*, 1867, 2, 272.
- [21] TRAUTMANN et KIRCHHOF. *Biochem. Ztschr.*, 1932, 247, 275.
- [22] WOODS et KOCH. *Journ. of Biol. Chem.*, 1905-1906, 1, 203.

ÉTUDE MICROBIOLOGIQUE SUR LA FILTRATION DU LAIT

par D^r JAROSLAV MASEK

De l'Institut lactologique de l'Ecole Polytechnique à Prague.

Directeur : Professeur D^r Otakar LAXA (Tchécoslovaquie).

Il existe toute une série de travaux sur l'influence de la filtration sur la teneur en impuretés du lait, mais la composition bactériologique du lait n'a été que très rarement traitée. C'est pour cela que je me suis décidé à étudier, quels changements microbiologiques se produisent pendant la filtration du lait. J'ai recueilli des échantillons de lait aussitôt après la traite et j'ai analysé le lait avant et après filtration. Pour cette étude, je me suis servi chaque fois du lait d'une seule vache. J'ai déterminé le nombre de germes par la méthode des plaques avec gélose au petit-lait. En même temps, j'ai observé le nombre des bactéries de la fermentation lactique pour cette raison : ces germes forment très souvent des chaînettes et il est intéressant de savoir quel rôle jouent ces groupes de bactéries pendant la filtration. Probablement ces plus importants groupes de bactéries sont retenus sur le filtre. J'ai employé le filtre d'ouate « Simplex » qui a été, chaque fois, après le travail, convenablement nettoyé avec une solution sodée chaude, rincé et couvert, pour être préservé contre toute infection. Les essais ont été faits dans la ferme « A » dans l'automne et l'hiver de l'année 1934.

Les résultats sont présentés dans le tableau I. Par centimètre cube de lait non filtré, j'ai trouvé de 835 à 54.650, en moyenne 16.929 germes, tandis que dans le même lait filtré, 1.620 à 32.500, en moyenne 8.751 germes. Ainsi, nous voyons que le nombre des germes diminue par la filtration, mais pas nécessairement ; dans les deux échantillons de lait filtré on a constaté la présence de plus nombreux germes après la filtration qu'avant. Pour avoir une détermination plus précise de ces changements, je calcule le *degré microbiologique de la filtration* : c'est le nombre de germes dans le lait filtré calculé en % par rapport au nombre de germes dans le même lait non filtré ; c'est ce degré qui indique de combien est meilleure ou pire la com-