UNE MÉTHODE RAPIDE DE LA PHOSPHOMONOESTÉRASE POUR LE CONTRÔLE DE LA PASTEURISATION DU LAIT (1)

par HARRY SCHARER

Chemical Laboratory, Department of Health, New York City.

Malgré que les autorités sanitaires ont défini dans leurs ordonnances quelles sont les conditions requises pour la pasteurisation, elles se trouvent fréquemment devant des cas d'infraction à leurs règlements à ce sujet. Il est impossible d'exercer un contrôle satisfaisant, par l'inspection des usines, sur l'élément humain et les nombreux facteurs mécaniques qui peuvent intervenir pour rendre la pasteurisation défectueuse. Entre les visites des inspecteurs des usines, des appareils enregistreurs de la température peuvent se dérégler, ne plus fonctionner, et certains défauts de fonctionnement des appareils ne sont perceptibles que pour les inspecteurs, qui ont une connaissance approfondie des nombreux systèmes de pasteurisation, et des outillages parfois compliqués, qui sont actuellement utilisés ; d'autres irrégularités ne peuvent être décelées uniquement par la vue.

Le Code sanitaire de la ville de New-York exige que dans la pasteurisation lente (holding system), la plus répandue dans ce pays, le lait soit chauffé à une température d'au moins 143° F. (61°7 C.), qu'il soit maintenu à cette température pendant 30 minutes et ensuite rapidement refroidi. Fréquemment, on n'a aucune garantie concernant la température et la durée du chauffage. De la mousse insuffisamment chauffée peut avoir été mélangée à du lait réglementairement pasteurisé [1]. Lorsqu'il n'y a pas eu d'agitation du lait dans le réservoir, au cours du chauffage, il y a toujours des risques qu'il y ait eu une répartition inégale de la température. A ce sujet, nous mentionnons la définition de l'Etat de New-York (Code sanitaire, art. 22) :

« Ni lait, ni crème ne seront désignés, ni par écrit, ni verbalement, comme pasteurisés, si toute particule de ce lait ou de cette crème n'a pas été soumise, sans discontinuation, pendant 30 minutes, à une température de 143° F. (61°7 C.) ou supérieure. »

La définition fédérale insiste également sur « toute particule ».

Les épreuves chimiques proposées jusqu'ici pour déceler la pasteurisation défectueuse ou inefficace du lait peuvent être groupées

(1) *Journal of Dairy Science*, vol. XXI, janvier 1938, p. 21 (Traduction R. N. GÖRANSSON).

de la façon suivante, selon le principe sur lequel elles sont basées.

1. *L'examen microscopique* : L'épreuve cellulaire de Frost [2].
2. *Les propriétés physiques* : L'épreuve de la montée de la crème [3], la turbidité [4], la coagulation [5], la lactalbumine [6], les suspensions [7].
3. *L'activité des enzymes* : La peroxydase [8], la catalase [9], l'aldéhyderéductase [11], l'amylase [8, 12, 13] et la phosphatase [14].

Lors de l'adoption de la pasteurisation à basse température, plusieurs de ces épreuves sont devenues inapplicables ou inefficaces [6, 8, 12, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 23]. Dans presque toutes les méthodes, jusqu'ici connues, paraît intervenir un facteur personnel ou un autre facteur, qui les rend susceptibles de la critique d'inexactitude, lors de leur application par d'autres que ceux qui les ont préconisés. Au début de 1935, l'Auteur de ces lignes élaborait une épreuve modifiée de l'amylase, qui, dans quelques milliers d'applications, permit de déceler du lait cru, indiqua l'addition de lait cru, dans la proportion de 5%, à du lait chauffé, ou une période de chauffage de 15 minutes ou moins, ou une température de chauffage du lait de 140° F. (60° C.) ou inférieure. Les résultats obtenus avec cette méthode modifiée étaient encourageants et indiquèrent qu'une méthode plus sensible était nécessaire.

L'épreuve de la phosphatase récemment préconisée présente une plus grande sensibilité, mais elle exige trop de temps et est trop compliquée pour l'application dans la pratique courante. KAY et GRAHAM déclarèrent que pour les températures de pasteurisation américaines ($142^{\circ} \pm 2^{\circ}5 \text{ F.} = 61^{\circ}1 \pm 1^{\circ}1 \text{ C.}$) une durée d'incubation de 2 heures et demie était suffisante, mais GILCREAS et DAVIS [20] affirmèrent que dans l'épreuve quantitative il fallait 24 heures pour des délimitations nettes. Les données obtenues dans ce laboratoire confirment ces affirmations. En dehors de cela, la préparation du réactif de FOLIN et CIOCALTEU demande des soins minutieux et exige assez de temps ; en plus, il présente un défaut de spécificité : il réagit avec nombre de phénols, dans lesquels il y a substitution du groupe hydroxyle et même avec des composés stanneux et ferreux [24, 25].

Au mois de janvier 1937, furent faites des recherches sur l'action des réactifs précipitant les protéines en conjonction avec d'autres réactifs phénolés et il fut constaté que l'acétate basique de plomb utilisé avec 2,6 de dibromoquinonechloroimide donnait entière satisfaction. La sensibilité de ce réactif vis-à-vis du phénol est telle, qu'il décelle sa présence dans la proportion d'une partie pour vingt millions, et il ne réagit qu'avec des phénols, dans lesquels il n'y a

pas eu substitution du groupe hydroxyle, en donnant lieu à une coloration bleue, sur laquelle on peut se baser pour une estimation quantitative des phénols [26]. Dans ce mémoire, est décrite une technique qui permet l'utilisation de ce réactif, qui ne demande pas beaucoup de temps, est peu onéreuse, n'exige d'autre outillage que celui qu'on peut trouver dans n'importe quel laboratoire officiel ou industriel et dans laquelle le facteur personnel n'a que peu d'importance. Malgré le nombre limité de déterminations (environ 10.000), la concordance des données est telle que la méthode paraît digne d'études ultérieures et détaillées.

Cette méthode est basée sur la destruction par le chauffage de la phosphomonoestérase (1) (constituant, toujours présent dans le lait cru, dont 96 % sont détruits par le chauffage à la température de 143° F. (61°7 C.) pendant 30 minutes [14]), et la faculté de cette enzyme d'hydrolyser le phénylphosphate disodique [27] avec mise en liberté de phénol, qui est estimé colorimétriquement avec le 2,6 dibromoquinonechloroimide. L'épreuve est faite en milieu alcalin à un pH. d'environ 9,6, qui est optimum pour le développement de la coloration. A un pH moins élevé, le développement de la coloration est indûment prolongé, tandis qu'à un pH plus élevé il peut faire défaut [26]. La rapidité du développement de la coloration est en raison directe de la quantité de phénol présente ; un excès de l'imide active également la formation d'indophénol, mais un trop grand excès avec de petites quantités de phénol ajoute du jaune au bleu.

MÉTHODE MODIFIÉE DE LA PHOSPHATASE

Réactifs

2,6 Dibromoquinonechloroimide (désigné ci-dessous par BQC) (Eastman Kodak Chemical, N° 2304).

Dissoudre 0 gr. 04 dans 10 cm³ d'alcool éthylique à 95%. Dans des flacons bien bouchés, cette solution peut être conservée plusieurs jours. Il fut jugé opportun de conserver cette solution dans un flacon compte-goutte d'Owen, en verre d'une couleur verte de 1/4 once (7 gr. 09) (modèle n° 90943). Ce flacon débite un centimètre cube de la solution alcoolique d'imide en 50 gouttes. Deux gouttes ou 1/25 de centimètre cube de la solution contiennent 0 mgr. 16 d'imide. Cette quantité doit être considérée comme un excès adéquat.

(1) FOLLEY et KAY [28, 29,32] classent les phosphatases, désignant comme phosphomonoestérase alcaline la phosphatase du lait, qui est active à un pH alcalin. A ce point de vue, il a paru opportun d'insister sur cette dénomination en vue de différencier les caractéristiques de cette enzyme de celles des autres phosphatases.

Acétate basique de plomb (préparé par la méthode de Horne).

Indications A.C.S. (American Chemical Society).

Faire bouillir 280 grammes d'acétate basique de plomb sec avec 500 cm³ d'eau pendant 5-10 minutes. Refroidir, laisser déposer, filtrer et diluer jusqu'à 500 cm³.

Solution Tampon boratée.

Dissolvez 28 gr. 427 de Na²B⁴O⁷.10H²O (qualité pharmaceutique) dans 900 cm³ d'eau distillée, en agitant vigoureusement pour prévenir la formation de grumeaux. Ajoutez 3 gr. 27 de NaOH sous forme d'une solution concentrée (2 à 5 N.), refroidir et diluer jusqu'à un litre.

Substrat-Tampon.

Il fut constaté que le phénylphosphate disodique fourni par les « British Drug Houses Ltd. » contenait du phénol libre dans des proportions notables (1) ; de ce fait, le sel fut lavé au moyen d'éther éthylique, jusqu'à l'élimination complète du phénol, démontrée par une réaction négative vis-à-vis du phénol. Dans ce but, on additionne 10 cm³ d'eau distillée à 100 cm³ de l'éther de lavage, on évapore l'éther, puis on ajoute 1/2 centimètre cube de la solution tampon boratée, ensuite 4 gouttes de BQC. Le développement d'une coloration bleue indique la présence de phénol.

Le sel lavé est séché dans un dessiccateur, après évaporation de l'éther à l'air libre ; il est conservé en resserre froide.

Dissoudre 1 gr. 09 du sel lavé et séché dans 900 cm³ d'eau distillée, préalablement saturée de CHCl³. Ajouter 50 cm³ de solution tampon boratée, diluer jusqu'à un litre. Ajouter quelques gouttes de CHCl³. Conserver en resserre froide. Le pH de ce substrat-tampon est d'environ 9,6 ; on le contrôle en utilisant la phtaléine de thymol comme indicateur.

Standards des Colorations

Préparer une solution de phénol dans de l'eau distillée standardisée à 0 cm³ l par centimètre cube (30). Diluer le nombre requis de centimètres cubes de la solution jusqu'à 100 cm³, pour obtenir des solutions contenant 1/2, 1, 1 1/2, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 50 et 100 parties de phénol par million. Pour préparer les standards de coloration, prendre 5 cm³ de chacune des solutions, y additionner 1/4 centimètre cube de la solution tampon boratée et deux gouttes de la solution BQC ; puis, bien fermer le tube. La coloration de ces préparations persiste inaltérée pendant plusieurs semaines, si on les conserve

(1) Ce sel libre de phénol peut être fourni par EIMER et AMEND, New-York, ou par R. P. CARGILLE, New-York.

en resserre froide et si, lors d'utilisation, on ne les expose pas à la lumière solaire directe.

Comme unité de bleu, est proposée la coloration produite par 0 mgr. 001 de phénol dans 5 centimètres cubes de solution. Sur cette base, le standard, qui contient 1/2 partie de phénol pour un million, contiendrait 0 mgr. 0025 (2 gamma 5) de phénol par 5 cm³ ou 2 unités 5 ; le standard contenant 1 partie de phénol pour un million contiendrait 0 mgr. 005 (5 gamma) par 5 cm³ ou 5 unités, etc.

Méthode

Chaque jour, les réactifs doivent être contrôlés. Si on obtient une coloration bleue, le substrat-tampon doit être rejeté.

Au moyen d'une pipette (une pipette pour chaque échantillon) on met 1 cm³ de lait dans une éprouvette de verre pyrex. La pipette doit être bouchée au moyen d'ouate pour prévenir l'introduction de salive dans l'échantillon. Ajouter 10 cm³ du substrat-tampon et bien secouer, puis conserver pendant une heure à la température de 37°5 C. Après l'incubation, placer les éprouvettes dans l'eau bouillante pendant 5 minutes, puis refroidir dans de l'eau glacée. Additionner 0 cm³ 1 de la solution d'acétate basique de plomb, secouer et laisser reposer pendant une à deux minutes. Les protéines vont se coaguler et se précipiter. (Il est parfois nécessaire d'ajouter encore 0 cm³ 05 d'acétate de plomb en plus pour obtenir une séparation complète de la protéine.) Filtrer et, à 5 cm³ du filtrat limpide, ajouter d'abord 0 cm³ 25 de la solution tampon boratée, ensuite 2 gouttes ou 0 cm³ 04 de BQC et agiter légèrement.

La coloration bleue de la réaction de l'indophénol se développe en moins de cinq minutes. Après quinze minutes, jugées nécessaires pour le développement complet de la coloration, celle-ci est comparée avec les standards et évaluée en unités de phosphomonoestérase — une unité étant la quantité d'enzyme qui, dans les conditions de l'expérience, produirait la coloration provoquée par 1 gamma de phénol.

Précautions nécessaires lors de l'exécution de l'épreuve au Laboratoire

A. Les échantillons de lait et de crème, surtout ceux qui ont été conservés en resserre froide, doivent être chauffés à la température du local.

B. Si on utilise une étuve plutôt qu'un bain-marie, il est bon de placer les éprouvettes pendant une à deux minutes dans un bain-marie à la température de 40° C. environ, avant de les mettre dans l'étuve.

C. Occasionnellement, après l'addition de l'acétate basique de plomb, le filtrat n'est pas limpide, ou il devient trouble après l'addition de un quart de centimètre cubé de la solution tampon boratée. La centrifugation à une vitesse d'environ 800 tours à la minute clarifiera le sérum. Apparemment, le précipité ne prévient pas la formation d'indophénol.

D. Le papier-filtre Whatman n° 40 fut utilisé au cours des recherches ; mais, pour l'usage quotidien, n'importe quel papier-filtre de bonne qualité convient.

E. Toutes précautions doivent être prises pour éviter l'action de la phosphatase de la salive humaine.

DONNÉES EXPÉRIMENTALES

Effet de la variation de la durée du chauffage et de la température

Des échantillons de lait de mélange de troupeaux furent chauffés au laboratoire à la température de 143° F. (61°7 C.) et maintenus à cette température pendant des périodes variant de 5 à 30 minutes. Ces échantillons furent examinés de même que des échantillons de lait prélevés, dans des conditions, autant que possible, identiques, dans quatre usines de pasteurisation, dans deux desquelles étaient utilisés comme chambreurs des réservoirs clos de petite dimension, tandis que dans les deux autres étaient utilisées des batteries de plusieurs chambreurs automatiques.

Il est possible que les durées de chauffage mentionnées pour les usines ne soient pas absolument exactes. Pour quelques échantillons, la période de maintien à la température de 143° F. (61°7 C.) fut un peu plus longue à cause du temps nécessaire pour remplir le chambreur, avant la période de chambrage. Pour le lait cru de chacune des 34 vaches, la valeur de phosphomonoestérase fut de 500 unités et plus. Dans aucun cas, la coloration fournie par du lait adéquatement pasteurisé (au laboratoire ou à l'usine) n'indiqua plus de 2 unités 5 de phosphomonoestérase. L'expérience a démontré que cette donnée était un peu trop élevée ; uniformément, on constate que l'activité des enzymes est en réalité moins élevée dans les échantillons adéquatement pasteurisés. Il ne peut être question de faculté de distinction entre du lait cru et du lait pasteurisé ; cette épreuve permet de déceler des variations de cinq minutes et plus de la durée du chauffage. La réaction du lait chauffé pendant 25 minutes est différente de celle du lait pasteurisé, celle du lait chauffé pendant 5 minutes est différente de celle du lait cru. Les données du tableau I montrent que la destruction de l'enzyme en question se fait plus efficacement dans un chambreur automatique de précision que dans

TABEAU I
EFFET DE LA DURÉE DU CHAUFFAGE A 143° F. (61·7 C.), EXPRIMÉ EN UNITÉS DE
PHOSPHOMONOEESTÉrase PROPOSÉES

	Chauffage au laboratoire		
	(Chauffage préliminaire 1 minute)		
	Minimum (Unités)	Maximum (Unités)	Moyenne estimée (Unités)
Lait cru	500	> 500	> 500
Chauffage 5 minutes . . .	100	250	100
10 minutes . . .	20	50	35
15 minutes . . .	15	20	17,5
20 minutes . . .	10	10	10
25 minutes . . .	5	5	5
30 minutes . . .	0	< 2,5	< 2,5

	Echantillons d'usines de pasteurisation			
	Usine A (Unités)	Usine B (Unités)	Usine C (Unités)	Usine D (Unités)
Lait cru	> 500	> 500	> 500	> 500
Chauffage 5 minutes	40	50	100	50-100
10 minutes	20	20-25	40	50
20 minutes	10	10	15	25
25 minutes	2,5-5	2,5-5	5-10	5-10
30 minutes	2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5
Lait en bouteilles . . .	2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5

Usine A. — Chauffage préliminaire de 60 secondes environ dans un appareil I-T. Plusieurs chambreurs automatiques de précision.

Usine B. — Chauffage préliminaire de 60 secondes environ dans un appareil I-T. Il fallut six minutes et demie pour le remplissage d'un chambreur. Six chambreurs Cherry Burrell Spray. Il fallut trois minutes pour la vidange d'un chambreur. Réfrigération du lait à 50° F. (10° C.) en 30 secondes.

Usine C. — Chambrage dans petit réservoir clos. Chauffage préliminaire jusqu'à 143° F. (61·7 C.) en 15 minutes. Réfrigération au moyen d'un réfrigérateur découvert.

Usine D. — Chambrage dans petit réservoir clos avec agitateur en mouvement continu. La durée du chauffage préliminaire, dans le réservoir, était de 15 minutes. Réfrigération dans le réservoir en cinq minutes.

un réservoir chambreur d'un type plus ancien et que le chauffage préliminaire de courte durée était plus efficace pour la destruction de l'enzyme que le chauffage préliminaire de plus longue durée.

On ne peut cependant perdre de vue que ces indications ne sont fournies que par un nombre très limité de données.

Des échantillons de lait de mélange d'un troupeau furent chauffés au laboratoire, pendant 30 minutes, à des températures différentes. Les résultats sont résumés dans le tableau II.

TABLEAU II

EFFET DE LA VARIATION DE LA TEMPÉRATURE D'UN CHAUFFAGE D'UNE DURÉE DE TRENTE MINUTES, EXPRIMÉ EN UNITÉS DE PHOSPHOMONOESTÉRASE PROPOSÉES

Température	Valeur moyenne (Unités)
138° F. (58°9 C.)	250-50
140°,5 F. (60°28 C.)	100
142° F. (61°1 C.)	10
143° F. (61°7 C.)	2,5

L'effet de l'addition de lait cru, dans des proportions différentes, à du lait adéquatement pasteurisé est montré dans le tableau III. On voit que l'addition de 0,5 % de lait cru à du lait adéquatement pasteurisé peut être décelée sans difficulté.

Des observations au cours des six derniers mois sur du lait pasteurisé au laboratoire et sur du lait provenant d'usines de pasteurisation, ont démontré que chaque fois que la donnée obtenue au moyen de cette méthode était supérieure à 2 unités 5, le chauffage avait été insuffisant ou la pasteurisation avait été défectueuse et que l'élévation de la valeur obtenue était en proportion directe avec la défectuosité de la pasteurisation. Il n'est cependant pas possible, en se basant sur les données obtenues par cette épreuve, de déterminer, sans enquête ultérieure, si le défaut est dû à la durée du chauffage, ou à une température trop peu élevée, ou à l'addition au lait pasteurisé (à cause d'un défaut de l'appareil) de lait cru ou insuffisamment chauffé, ou à un mélange, au lait, de mousse insuffisamment chauffée, ou à une association de ces facteurs. L'expérience a encore démontré qu'il n'est pas nécessaire de faire chaque observation en double. Si on veut avoir toute garantie de l'absence de phénol ou de produits similaires, qui pourraient donner une réaction avec BQC, on peut substituer une solution aqueuse (ajustée au pH 9,6) au substrat-tampon, en y appliquant la méthode décrite ou la méthode de « campagne » rapide, qui sera décrite plus loin, dans ce mémoire. Il peut être intéressant de signaler que même lorsque des échantillons de lait dit « pasteurisé » du commerce fournirent un index de 500 unités

après incubation avec le substrat, l'épreuve témoin indiqua l'absence de phénol.

Effet des conditions de conservation

On a constaté [14, 20] que lorsque du lait s'est acidifié ou s'est putréfié, on peut obtenir une coloration plus prononcée avec l'épreuve de Kay et Graham, grâce à l'action bactérienne ou à la décomposition des protéines, ce qui peut libérer du phénol ou des produits similaires au phénol. Dans ces conditions, on pourrait considérer du lait pasteurisé efficacement comme un produit mal pasteurisé. Certains de ces produits de la décomposition, tels la tyrosine, le tryptophane, donneront une coloration bleue avec le réactif de FOLIN et CIOCALTEU [25]. Un examen de la formule de structure de ces produits et de produits apparentés démontre qu'il y a déjà eu substitution de place du groupe OH, ou que le composé ne contient pas de groupe OH. Dans ces cas, la théorie indiquerait qu'il ne peut y avoir de réaction avec BQC pour donner lieu à la formation d'indophénol.

Quarante-deux échantillons de lait, provenant de différentes usines (après chauffage à 143° F. (61°7 C.) pendant des périodes différentes) et 22 échantillons traités au laboratoire (durées différentes, températures différentes de chauffage, mélanges de lait pasteurisé et de lait cru), furent conservés à des températures de réfrigération et l'on pratiqua, de temps en temps, sur ces divers échantillons, l'épreuve de la phosphomonoestérase. Les tableaux III, IV, V donnent les résultats obtenus.

TABLEAU III
CONSERVATION DE LAIT PASTEURISÉ ADDITIONNÉ DE LAIT CRU

Pourcentage de lait cru additionné	Unités de phosphomonoestérase		
	1 jour	7 jours	14 jours
0,0	< 2,5	< 2,5	< 2,5
0,2	< 5	< 5	< 5
0,5	5	5	5
1,0	10	≥ 10	< 10
2,0	15-20	≥ 10	≥ 10
5,0	20-50		
10,0	100		

TABLEAU IV
EFFET DE LA CONSERVATION DE LAIT PASTEURISÉ INDUSTRIEL
SUR L'ÉPREUVE

Indications des inspecteurs	Nombre de jours de conservation							Titrage au pH 6,6 avec Na ² CO ³ avant la prise de l'échantillon (50 jours)
	1	6	10	20	27	35	50	
Cru	500	500	500	> 100	15	15	15	500
5 minutes .	100	100	20	10	15	5-10		
10 minutes .	25	20	10	5	10	5 10		
15 minutes .	10	10	5	2,5	5	5-10	2,5	5
20 minutes .	5	> 2,5	> 2,5	< 5	< 5	< 5		
25 minutes .	2,5	2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5		
30 minutes .	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5

TABLEAU V
EFFET DE LA CONSERVATION SUR DES ÉCHANTILLONS CHAUFFÉS A MOINS DE
143° F. (61°7 C.) PENDANT 30 MINUTES, EXPRIMÉ EN UNITÉS PROPOSÉES

Température	Jours de conservation					Titrage avec Na ² CO ³ avant la prise de l'échantillon après 27 jours
	1	3	6	10	27	
138° F. (58°9 C.) .	500	500	100	100	10	50-100
140°5 F. (60°3 C.) .	100	50-100	50	15	5-10	20
142° F. (61°1 C.) .	10	5-10	10	5	2,5	2,5-5
143° F. (61°7 C.) .	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5

Les laits dont la pasteurisation avait été inadéquate fournirent des données confirmant cette particularité, après une longue période de conservation. La baisse apparente des unités de phosphomonoestérase peut avoir été provoquée en même temps par la hausse du degré d'acidité et par le fait que, dans ces conditions, le pH du substrat-tampon ne put être maintenu à l'optimum indiqué. Il y eut encore de la difficulté pour obtenir un échantillon homogène, à cause de l'altération des laits. Quelques-uns des laits furent ajustés à un pH d'environ 6,6, au moyen de Na²CO³ avant la détermination des unités de phosphomonoestérase ; les données, ainsi obtenues, sont très intéressantes.

TABLEAU VI
RÉSULTATS DE L'ACIDIFICATION AU COURS DE LA CONSERVATION, EXPRIMÉS
EN UNITÉS PROPOSÉES

	N° de l'échantillon	Jours de conservation				
		1	7	10	20	50
Lait cru	1	500	500		500	500
	2	500			500	500
	3	500		500		500
	4	500	500	500	100 +	
Chauffage préliminaire	5A	500				500
	6B	500			500	100
	7C	500				500
	8D	500				
10 minutes à 143° F. (61°7 C.)	9A	15	15	15		5
	10A	40	40	40		20
	11A	25	20	10	5	5
	12C	50	50	50		
	13D	20	20	20		10
	14A	20	25	20	15	
	15A	25	25	20		
20 minutes à 143° F. (61° C.)	16B	5				2,5
	17B	10	10	< 10		< 5
	18B	5	5	2,5	2,5	
	19C	25	20			2,5
	20D	10	10	5		
	21A	10	10	10	5	2,5
	22A	10	10	10	5	

A : Chauffage préliminaire au laboratoire, 1 minute.

B : Chauffage préliminaire industriel, 1 minute et 1/2.

C : Chauffage préliminaire industriel, 15 minutes.

D : Chauffage préliminaire industriel, 15 minutes avec agitation dans le réservoir.

Application de l'épreuve aux produits lactés

L'épreuve fut appliquée à des échantillons de crème crue et de crème pasteurisée, provenant d'usines fournissant toutes garanties ; il ne fallut aucune modification de technique. Pour les crèmes crues, la valeur fut de 500 unités et plus ; pour les crèmes pasteurisées, elle fut de 2,5 unités (dans deux cas, elle fut de 5 unités).

Il ne fallut aucune modification de la technique pour le lait au

chocolat. Des recherches, encore en cours, indiquent que l'épreuve pourra être appliquée au beurre et à d'autres produits lactés, avec de légères modifications de la méthode, mais à cause du nombre très limité d'observations, les données obtenues ne sont pas encore publiées.

Pasteurisation de courte durée et à température élevée

Des échantillons de lait pasteurisé dans un appareil de pasteurisation à température élevée, type York, fournirent la même réaction à l'épreuve que le lait ayant subi la pasteurisation ordinaire. Cet appareil était censé chauffer le lait à 160° F. (71°1 C.) pendant 15 secondes. La durée réelle du chauffage, déterminée en faisant passer de l'eau dans l'appareil, était de 17 à 18 secondes.

Application de l'épreuve proposée, à du lait et de la crème pasteurisée du commerce

Il n'est pas possible de publier des tableaux des données obtenues avec les nombreux échantillons examinés, mais le tableau VII montre quelques données représentatives concernant du lait et de la crème pasteurisés du commerce. Parmi les échantillons exami-

TABLEAU VII

QUELQUES RÉSULTATS OBTENUS AVEC DES ÉCHANTILLONS DE LAIT ET DE CRÈME DU COMMERCE, DÉSIGNÉS COMME PASTEURISÉS

Nature des échantillons	Unités proposées	Observations
Crème quelconque	100	Pasteurisation inadéquate.
Lait officiel	20	Pompes mal réglées, mélange lait chauffé et cru, durée du chauffage trop brève.
Crème officielle . .	500	Les registres de l'usine indiquèrent la pasteurisation de quantités supérieures de 20 % au débit possible des appareils.
Lait officiel	15	Durée de chambrage de 20 minutes.
Lait officiel	15	Thermomètre inexact de 2° F.
Crème officielle . .	10	Crème standardisée après la pasteurisation au
Crème officielle . .	25	moyen de lait cru ou imparfaitement pasteurisé.
Lait officiel	7,5	Mousse en quantité dans le chambreur.
Crème officielle . .	7,5	Arrêt des agitateurs au cours de la pasteurisation.
Lait quelconque .	15	Température inférieure à 142° F. (61°1 C.)

nés se trouvent des échantillons quelconques, prélevés dans le commerce, et des échantillons officiels, prélevés à l'usine. Les teneurs

en matière grasse et en constituants solides des échantillons quelconques furent prélevés d'abord, ensuite leur fut appliquée l'épreuve de la phosphomonoestérase. Lorsque le résultat obtenu permettait de supposer une pasteurisation inadéquate, un échantillon officiel était prélevé, le jour même, à l'usine et, à cet échantillon, l'épreuve de la phosphomonoestérase était seule appliquée. Fréquemment, dans ces cas, des inspecteurs, munis de l'outillage de « campagne » rapide, visiterent l'usine, le soir même, au cours de la pasteurisation, et contrôlèrent les travaux. Par ce système, des défauts de technique et des défauts d'appareils furent découverts et signalés au personnel de l'usine.

On a affirmé que le refroidissement lent du lait pasteurisé par le maintien pendant 20 à 40 minutes à une température déterminée avait comme résultat la réactivation partielle de la phosphomonoestérase et que, lors de réfrigération rapide, la destruction de la phosphatase était plus complète [33]. Jusqu'ici l'Auteur n'a pas eu confirmation de cette affirmation, au cours de ses expériences, et la question ne constitue pas un problème puisque la pasteurisation adéquate exige une réfrigération rapide du lait.

FOLLEY et KAY ont démontré [31] que la teneur en phosphomonoestérase du lait de vache varie au cours de la lactation, qu'elle est à son maximum 180 jours après la parturition. La teneur en enzymes du lait peut varier d'après la vache, mais ce fait a peu d'importance pour le lait de commerce, qui est généralement du lait de mélange ou du lait d'un troupeau. Ces auteurs ont encore démontré [29] que la teneur en enzymes du lait cru présente un rapport avec ses solides autres que la matière grasse.

Actuellement, des études sont en cours, en vue de rechercher si une incubation plus prolongée n'augmenterait pas la sensibilité de l'épreuve ou accentuerait sa valeur comme moyen de diagnostic. Cependant, en présence du fait que la rapidité de l'hydrolyse diminue avec la prolongation de la durée de la réaction et que l'activité d'une solution de phosphatase n'est pas proportionnelle à sa concentration, une durée d'incubation brève, dans laquelle l'activité enzymatique est plus proche de la vélocité initiale réelle de l'hydrolyse, paraît mieux convenir. Des recherches sont faites concernant l'effet catalytique des ions de magnésium [32] sur la sensibilité.

Epreuve rapide de campagne

A cause de sa simplicité, la méthode, qui vient d'être décrite comme méthode de laboratoire, peut être adaptée de façon à pouvoir être utilisée comme méthode de campagne ; cette adaptation est facilitée par le fait que la présence de la matière grasse et des protéines du lait ne cache pas la coloration bleue de la réaction

de l'indophénol. Pour cette méthode de campagne simplifiée, on trouve le matériel dans une trousse (1) de dimensions réduites (fournie par R. P. CARGILLE).

A 5 cm³ de substrat-tampon on ajoute 0 cm³ 5 de l'échantillon de lait ou de crème. On ferme au moyen d'un bouchon, et on agite vigoureusement. Pour l'incubation, on place l'éprouvette dans une poche ou on la plonge pendant 5 à 10 minutes dans un bain-marie à 100° F. (37°8 C.), puis on ajoute 6 gouttes de BQC, on remet le bouchon et on agite. On observe la couleur après 5 minutes. L'apparition d'une coloration bleue, quelle que soit son intensité, indique une pasteurisation défectueuse.

On peut trouver dans le commerce des comprimés pouvant servir à la préparation des deux solutions nécessaires.

Application de l'épreuve de campagne

TABLEAU VIII

Echantillon	Intensité de la coloration bleue
Lait cru	++++
Lait à chauffage préliminaire de 120°F. (48°9 C.)	++++
Lait à chauffage préliminaire de 143° F. (61°7 C.)	+++
Lait chauffé pendant 10 minutes à 143° F. (61°7 C.)	++
Lait chauffé pendant 15 minutes à 143° F. (61°7 C.)	+
Lait chauffé pendant 20 minutes à 143° F. (61°7 C.)	±
Lait chauffé pendant 30 minutes à 143° F. (61°7 C.)	—
5 % de lait cru + du lait pasteurisé	++
2 % de lait cru + du lait pasteurisé	+
1 % de lait cru + du lait pasteurisé	±
Crème crue	+++++
Crème pasteurisée	— *

La coloration bleue de l'indophénol se développe après moins de 5 minutes et devient progressivement plus intense. La crème adéquatement pasteurisée donne une coloration variant du gris au blanc, le lait adéquatement pasteurisé une coloration variant du gris au brun. Il a été démontré que chaque fois que l'épreuve de laboratoire indique 10 unités ou plus, l'épreuve de campagne donne une coloration bleue. Dans certains cas, l'épreuve de campagne donna une réaction positive avec de la crème, lorsque l'épreuve de laboratoire n'indiqua que 7 unités 5 de couleur. L'épreuve de campagne a même décelé le mélange de mousse insuffisamment chauffée

(1) Cette trousse contient, outre le réactif, des éprouvettes à fond plat jaugées à 5 cm³ et 5 cm³ 5.

au produit pasteurisé. Lorsque les données fournies par l'épreuve de campagne sont douteuses, l'épreuve de laboratoire doit être appliquée.

Le cas suivant démontre l'utilité des deux épreuves. Il fut constaté que de la crème de l'usine X, lors de l'application de l'épreuve de laboratoire, donnait un nombre élevé d'unités. Cette usine ne faisait que la mise en bouteilles de crème « pasteurisée » en vrac, reçue d'environ 20 usines rurales. Des inspecteurs découvrirent la cause en utilisant l'épreuve de campagne. Un lot de crème fournit une réaction très prononcée de la phosphomonoestérase, ce qui amena l'examen et la saisie d'un lot de crème très important. L'épreuve de laboratoire démontra que cette grande quantité de crème ne présentait pas une réaction uniforme ; elle put être répartie en trois catégories selon la réaction : 500 unités, 100 unités, 20 unités. Un inspecteur de la Division de contrôle des Laiteries rurales (Country Milk Division), lors de la visite de l'usine, constata des irrégularités du contrôle de la température dans un chambreur (le tracé des températures indiquait 143° F. (61·07 C.), mais le thermomètre avait glissé et sa cuvette reposait sur le fond du réservoir, fait qui avait passé inaperçu, et la température réelle n'était que de 139° F. (59·09 C.). Cette circonstance, avec, en plus, un défaut d'agitation au cours du chambrage, et la constatation, faite ultérieurement, que cette crème « pasteurisée » était encore standardisée, s'il était nécessaire, au moyen de lait, qui, également, avait été l'objet d'une pasteurisation défectueuse, constituait probablement la cause des variations du nombre d'unités de phosphomonoestérase constaté. Ces irrégularités furent supprimées, et, depuis lors, cette crème fournit régulièrement un indice de moins de 2 unités 5.

Corrélation entre les teneurs bactériennes et les unités de phosphomonoestérase

L'activité de la phosphomonoestérase de plusieurs milliers d'échantillons de lait et de crème pasteurisés du commerce, dont la teneur bactérienne avait été contrôlée, fut déterminée.

Comme il est évident que d'autres facteurs, qu'une pasteurisation adéquate, peuvent avoir de l'influence sur la teneur bactérienne, ces données ne sont pas publiées. De nombreux échantillons à teneur bactérienne élevée présentèrent un indice de phosphomonoestérase de 2 unités 5. Cette teneur bactérienne élevée peut être due à une teneur bactérienne élevée initiale du lait cru, à des bactéries thermorésistantes, à l'âge du lait, à une infection ultérieure à la pasteurisation. On ne peut cependant perdre de vue qu'un lait, à teneur bactérienne peu élevée, n'est pas toujours un lait sans danger.

L'indice de phosphomonoestérase d'un échantillon de lait ne

fournit pas d'indication sur une contamination du produit ultérieure à la pasteurisation.

Discussion de la valeur pratique de l'épreuve

Au cours du premier mois d'application de cette épreuve, au cours duquel furent considérés anormaux (c'est-à-dire à réaction positive) seulement les laits et les crèmes dont l'indice de phosphomonoestérase était supérieur à 5 unités et fut appliquée l'épreuve de campagne simplifiée dans les usines et les laiteries suspectes ; 23 livres 977 (10.874 kg. 53) de lait et de crème furent qualifiées inadéquatement pasteurisées et exclues du marché de la ville de New-York.

Le travail fait jusqu'ici démontre que la pasteurisation défectueuse est involontaire ou préméditée.

La pasteurisation involontaire peut être due à :

- a) Un outillage mauvais ou inadéquat.
- b) La négligence dans l'utilisation d'un outillage adéquat.
- c) Un défaut de contrôle du fonctionnement des appareils.
- d) Un défaut de contrôle de l'exactitude des thermomètres de l'usine, par comparaison avec un thermomètre du Bureau des Standards.
- e) Un défaut d'élimination d'une formation excessive de mousse.
- f) Une fluctuation de la température à cause du défaut de contrôle automatique.

La pasteurisation défectueuse préméditée peut être due à :

- a) Une baisse de la température à 140° F. (60° C.) ou moins, provoquée intentionnellement en vue d'obtenir une couche de crème apparemment plus épaisse.
- b) L'arrêt des agitateurs dans le même but.
- c) Une réduction de la période de chambrage, dans le but de maintenir le débit régulier de l'usine, lors d'une mise hors de service temporaire d'une partie de l'outillage.
- d) Le relâchement du contrôle des opérations au cours de la pasteurisation du dernier lot de lait de la journée de travail.
- e) La suppression intentionnelle de la période de chambrage.
- f) L'addition de lait cru à du lait pasteurisé dans le but d'obtenir le volume de lait désiré, ou la standardisation de crème au moyen de lait cru.
- g) Le défaut d'inhibition de la formation de mousse.

Résumé

Après une revue de la littérature, une méthode rapide de contrôle de la pasteurisation de lait, de crème et d'autres produits de laiterie

est décrite. L'hydrolyse enzymatique d'un substrat est déterminée, quantitativement, par l'addition de 2,6 dibromoquinonechloroimide, donnant lieu à des colorations bleues d'indophénol d'intensité variable, lorsque la pasteurisation est défectueuse. L'épreuve est exécutée en moins d'une heure et demie et indique des défauts peu évidents de la technique de la pasteurisation, tels que :

1. Une température inférieure de 1° F. (0°55 C.) à celle de 143° F. (61°7 C.) exigée par le Code sanitaire de la ville de New-York.

2. Un chauffage de 25 minutes au lieu de la période de 30 minutes à 143° F. (61°7 C.) qui est exigée.

3. L'addition de 0,5% de lait cru à de la crème ou du lait adéquatement pasteurisés.

La méthode n'exige pas d'appareils spéciaux ; elle est peu onéreuse et peut être appliquée à l'usine en vue du contrôle de l'efficacité de la pasteurisation. Une méthode d'expression des résultats en unités de phosphomonoestérase proposées est préconisée.

Une épreuve de campagne simple, dont l'application exige environ dix minutes, qui peut être utilisée par des inspecteurs et présente une valeur réelle comme moyen de diagnostic est décrite.

Remerciements

L'Auteur remercie, pour leur collaboration, Harry W. RAYBIN, le chimiste en fonction Reginald MILLER et d'autres membres du personnel du Laboratoire Chimique, les Chefs et Inspecteurs de la Division de Laiterie du Bureau des Aliments et Médicaments du Service d'Hygiène de la ville de New-York, le chimiste Morris PALEY du personnel de la Bibliothèque WPA.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Associates of LORE A. ROGERS. *Fundamentals of Dairy Science*, édition 1928, p. 364.
- [2] W. D. FROST et G. D. MOORE. The cellular test for pasteurized milk under practical conditions. *Journal Dairy Science*, **2**, 1919, 189.
- [3] S. ORLA-JENSEN. Proben zur Feststellung des Erhitzungsgrade der Milch. *Z. Untersuch. Lebensm.*, **63**, 1932, 300.
- [4] M. F. BENGEL. Nachweis der Dauerpasteurisierung. *Z. Untersuch. Lebensm.*, **66**, 1933, 129.
- [5] D. LANDANY. A chemical method for identification of pasteurized, boiled and sterilized milk. *Bull. Soc. Chim. Yougoslav.*, **2**, 1931, 57.
- [6] G. ZACH. Über die Methoden zum Nachweis des Erhitzungsgrade von Milch. *Mitt. Lebensmitteluntersuch. u. Hygiene*, **25**, 1934, 87.
- [7] F. G. KOHN et E. KLEMM. Sur le diagnostic du lait pasteurisé à basse température par l'anneau de Schern-Gorli. *Le Lait*, **12**, 1932, 19.

- [8] S. ROTHENFUSSER. Über den Nachweis der Dauerpasteurisierung. *Z. Untersuch. Lebensm.*, **60**, 1930, 94.
- [9] P. G. HEINEMANN. *Milk*. W. B. Saunders Co., p. 237.
- [10] E. VAN KOSTLER. *Swiss Provisions book*, 3^e édition, p. 14.
- [11] F. SCHARDINGER. Unterscheidung gekochter und ungekochter Milch mittels Methylenblau. *Z. Nahr. Genussm.*, **5**, 1902, 1113.
- [12] B. S. GOULD. The detection of inefficient pasteurized milk based on a modification of the new Rothenfusser test. *Journal Dairy Science*, **15**, 1932, 230.
- [13] H. W. LEAHY. A practical test of pasteurization. *23rd Annual Report International Association of Dairy and Milk Inspectors*, 1934.
- [14] H. D. KAY et W. R. (Jr) GRAHAM. The phosphatase test for pasteurized milk. *Journal Dairy Res.*, **6**, 1935, 191.
- [15] M. F. BENGEL et E. BOHM. Nachweis der Pasteurisierung von Milch. *Z. Untersuch. Lebensm.*, **67**, 1934, 395. — Ist die Amylase Probe zum alleinigen Nachweis genügender Dauererhitzung geeignet. *Ibid*, **69**, 1935, 146.
- [16] P. WEINSTEIN. Nachweis des Erhitzungsgrade der Milch. *Ibid*, **56**, 1928, 457. — Nachweis in der Milch. *Ibid*, **68**, 1934, 73.
- [17] C. LIND. Les enzymes du lait et leur utilisation pour apprécier le chauffage du lait. *Le Lait*, **7**, 1927, 935.
- [18] K. EBLE et H. PFEIFFER. Zur Erkennung Dauererhitzter Milch. *Z. Untersuch. Lebensm.*, **60**, 1930, 311.
- [19] A. SCHLÖEMER. Die amylose de Kuhmilch als α -amylase. *Ibid*, **71**, 1936, 311.
- [20] F. W. GILCREAS et W. S. DAVIS. An investigation of the amylase and phosphatase tests as an indication of pasteurization. *Annual Proceedings of the International Association of Milk Sanitarians*, 1936, p. 15.
- [21] Methods for detection of pasteurized milk. *U. S. Department of Agriculture, Bureau of Chem.*, bull. n° 162, 1913.
- [22] G. A. RICHARDSON et C. L. HARKINSON. Amylase in Cow Milk. *Journal Dairy Science*, **19**, 1936, 761.
- [23] G. G. FREEMAN et R. H. HOPKINS. Mechanism of the degradation of starch by amylases. *Bioch. Journ.*, **30**, 1936, 442.
- [24] E. B. ANDERSON, Z. HERSCHDORFER et F. K. NEAVE. The Enzymes of Milk. *Analyst.*, **62**, 1937, 86.
- [25] O. FOLIN et V. CIOCALTEU. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *Journal Biol. Chem.*, **73**, 1927, 627.
- [26] H. D. GIBBS. Phenol tests. III. The indophenol test. *Journal Biol. Chem.*, **72**, 1927, 649.
- [27] E. J. KING et A. R. ARMSTRONG. A convenient method for determining serum and bile phosphatase activity. *Canadian Med. Assoc. Journ.*, **31**, 1934, 376.
- [28] S. J. FOLLEY et H. D. KAY. The alkaline phosphomonoestérase of the mammary gland. *Biochem. Journ.*, **29**, 1935, 1837.
- [29] S. J. FOLLEY et H. D. KAY. Enzymes of the mammary gland. *Journal Dairy Res.*, vol. VIII, 1937, 111 (*Biennial Review of the progress of Dairy Science*).

- [30] U. S. Pharmacopoeia, 11^e édition, p. 285.
 [31] J. S. FOLLEY et H. D. KAY. Variation in the phosphomonoesterase content of milk of the cow in relation to the progress of lactation. *Enzymologia*, **1**, 1936, 48.
 [32] S. J. FOLLEY et H. D. KAY. The phosphatases. *Ergebnisse fur Enzym-forsch.*, **5**, 1936, 159.
 [33] S. HERSCHDORFER. Inactivation of phosphate. *Enzymologia*, **1**, 1936, 96.

BIBLIOGRAPHIE ANALYTIQUE

1^o JOURNAUX, REVUES, SOCIÉTÉS SAVANTES ÉCONOMIE LAITIÈRE

KAY (H. D.). — **Augmentation de la production du lait.** *The Scottish Journal of Agriculture*, vol. XX, n^o 1, janvier 1937.

K. examine le problème de l'augmentation de la production du lait en Grande-Bretagne. La consommation journalière de lait par tête d'habitant y a été, en 1934, de 0 l. 227 ; en 1935-1936 de 0 l. 250, alors qu'aux Etats-Unis, elle varie actuellement entre 0 l. 238 (Saint-Louis) et 0 l. 443 (Boston). Cette consommation s'élève toutefois en Grande-Bretagne, dans les milieux aisés, à 0 l. 454. Les autorités en matière d'alimentation estiment qu'elle devrait être de 0 l. 568 et plus, ce qui correspond à une augmentation d'environ 100% pour la consommation journalière par tête si on prend le chiffre le plus bas, ou de 150% si on prend le chiffre fixé par les autorités en matière d'alimentation pour la consommation optimum. Pour produire 0 l. 568 (1 pinte) de lait par jour, il faudrait, ou que le rendement annuel moyen par vache passe de 2.044 litres à 4.497 litres, ou que le nombre des vaches laitières soit doublé, ou que les deux moyens soient combinés. Etant donnée la superficie relativement faible de la Grande-Bretagne, il est évident qu'une plus grande efficacité serait nécessaire dans toutes les branches de l'industrie laitière.

K. étudie ensuite les différents points du problème : qualité du lait ; rendement par vache ; augmentation du nombre de vaches laitières ; adaptation des fermes laitières ; augmentation des engrais ; augmentation de la superficie réservée à la laiterie et augmentation de la dimension de l'unité laitière individuelle. Il estime qu'une augmentation de la production d'environ 30% en lait liquide pourrait être facilement obtenue ; mais que les 70 autres pour cent ne seraient que très difficilement obtenus et très lentement.

Le problème de la production ne serait, du reste pas en pratique, le plus difficile à résoudre ; celui de l'éducation du public serait beaucoup plus ardu. Vous pouvez fournir du lait au consommateur, mais vous ne pouvez pas l'obliger à le boire contre sa volonté en raison d'une opinion préconçue.

C. WOLF.

La laiterie finlandaise. *Svenska Mejeritidningen*. 30^e année, n^o 4, 22 janvier 1938, p. 38-39.

La laiterie finlandaise s'est beaucoup développée depuis 1919, époque