LE LAIT

REVUE GÉNÉRALE DES QUESTIONS LAITIÈRES

SOMMAIRE

Mémoires originaux :

- M. G. GUITTONNEAU et M^{lle}
M. BÉJAMBES. — Chromo-
résistance et enrobage phos-
phocalcique des microbes
chauffés dans le lait 225
- J. M. ROSELL. — Le lait dans
quelques-unes de ses formes
d'utilisation (*fin*) 234
- N. KJÆRGAARD-JENSEN. —
Laiterie expérimentale du
Gouvernement Hillerød
(Danemark), 16^e Rapport
(à suivre) 253

Revue :

- REVUE : J. M. ROSELL. —
Les fromages à la crème . 271

Bibliographie analytique :

- 1^o Les livres 277
- 2^o Journaux, Revues, Sociétés
savantes 282

Bulletin bibliographique :

- 1^o Journaux, Revues, Sociétés
savantes 298

XI^e Congrès international de laiterie (Berlin, 21-28 août 1937) :

- M. SCHWARZ. — Amélioration
de la qualité du lait et des
produits laitiers. Méthodes
modernes de recherches . 302

Documents et informations :

- Les belles installations en lai-
terie : XI. S. REPETTO :
L'établissement central pour
la pasteurisation du lait de
la ville de Gênes (Italie) 313
- P. COUPRIE. — La mesure pra-
tique du pH dans les indus-
tries laitières. — Nouveau
potentiomètre et électrodes 325
- Le XII^e Congrès international
de laiterie (Vienne 1940) 328
- Congrès national 1939 de l'in-
dustrie laitière. 335
- Premier Congrès de la Fécon-
dation artificielle, Pavie,
10 12 avril 1939 335
- Exposition du Progrès social
(Lille-Roubaix, mai-octo-
bre 1939) 336

MÉMOIRES ORIGINAUX (1)

CHROMORÉSISTANCE ET ENROBAGE PHOSPHOCALCIQUE DES MICROBES CHAUFFÉS DANS LE LAIT (2)

par

M. G. GUITTONNEAU
Professeur à l'Institut Agronomique,
Directeur du Laboratoire National
des Industries Laitières et de
Fermentations.

M^{lle} M. BÉJAMBES
Chef de Travaux
au Laboratoire National
des Industries Laitières et de
Fermentations.

INTRODUCTION

Dans un travail antérieur, l'un de nous, en collaboration avec
M^{lle} J. BRIGANDO [1], a défini une résistance de certains micro-

(1) Reproduction interdite sans indication de source.

(2) Travail publié dans les « Annales de Technologie » du Ministère de l'Agriculture (1^{er} fascicule).

organismes aux colorants usuels, acquise par un chauffage énergétique dans le lait cru.

Nous retiendrons de ce travail les faits suivants : chauffés dans du lait écrémé cru, pendant une heure à 100° ou 20 minutes à 120°, un certain nombre de microorganismes ne se colorent plus par les techniques habituelles et se détachent en blanc sur le fond teinté des tableaux microscopiques (phénomène de l'image blanche).

Cette chromorésistance apparaît également quand on effectue les chauffages d'épreuve dans une pseudo-solution à pH 6,7 du complexe caséinate de calcium + phosphate de calcium. Elle cesse au contraire de se manifester lorsque le chauffage a lieu dans du lait écrémé ayant subi au préalable un chauffage énergétique ou quand la coloration est précédée d'un traitement à l'acide acétique dilué.

De ces données expérimentales, il était naturel de déduire que la chromorésistance est en relation avec une altération thermique des complexes phosphocasinatiques du lait cru. Mais l'ensemble des faits énoncés ne nous permettait pas de choisir parmi les hypothèses qui se présentaient à l'esprit relativement à la nature et au mécanisme du phénomène étudié.

Pour rechercher de nouvelles précisions nous avons jugé nécessaire de limiter le cadre de nos études au cas d'une seule espèce microbienne, *Streptococcus thermophilus* ORLA-JENSEN [5], et d'une seule technique de coloration, l'action du bleu de méthylène en solution aqueuse saturée. Mais, en retour, nous nous sommes attachés à améliorer les méthodes de recherche de manière à préciser le plus possible le sens de nos observations. Les résultats de nos travaux ont déjà fait l'objet d'une note à l'Académie des Sciences [3].

Dans le présent mémoire, nous nous proposons d'exposer avec plus de détails :

- a) Les améliorations que nous avons apportées à la technique expérimentale.
- b) Les résultats que ces améliorations nous ont permis d'obtenir.

MISE AU POINT D'UNE NOUVELLE TECHNIQUE DE RECHERCHE

Les améliorations que nous avons apportées à la technique antérieurement décrite ont trait :

- A. Aux préparations microscopiques.
- B. A la séparation des corps microbiens.

A. Préparations microscopiques

Rappelons que dans les premiers essais les examens microscopiques étaient effectués sur des suspensions microbiennes dans du lait, soit avant, soit après les chauffages d'épreuve. Avant le chauffage, les examens portaient donc sur des frottis de micro-organismes en suspension dans du lait écrémé cru et le fond de la préparation était constitué par l'extrait sec de ce lait cru. C'est au contraire sur un extrait sec de lait déjà altéré par le chauffage que se détachaient les microbes présentant le phénomène de l'image blanche. Le fond des préparations n'était pas identique dans les deux cas et on pouvait se demander si cette non identité n'intervenait pas elle-même directement dans la différenciation qui s'établissait entre les aspects des tableaux microscopiques observés.

Pour éliminer cette objection, nous avons modifié comme il suit notre technique d'examen : après chauffage, les microbes sont séparés par centrifugation puis remis en suspension dans du lait écrémé cru avec lequel on prépare les frottis. L'examen microscopique montre que ce mode opératoire ne modifie en rien la formation des images blanches. Or, dans les deux cas, le fond des préparations reste rigoureusement semblable à lui-même (extrait sec du lait écrémé cru) et la différence observée dans la teinte des images ne peut être expliquée que par une modification propre de la cellule microbienne, apparue au cours du chauffage.

Ce nouveau mode de préparation, tel qu'il vient d'être défini, a été appliqué à tous les examens microscopiques dont il sera question par la suite.

B. Séparation des corps microbiens

Le *Sc. thermophilus* est entretenu, à 45°, par repiquages quotidiens sur lait écrémé stérilisé. Quelques heures après le repiquage, l'acidité produite est suffisante pour faire cailler le lait et les micro-organismes sont enrobés dans un coagulum lactique. C'est sur ce coagulum simplement débarrassé de son acidité par lavages, qu'ont porté les premiers essais. Il nous est apparu que cette technique était insuffisante et que nous aurions accompli un grand progrès si nous parvenions à expérimenter sur des microbes absolument débarrassés de tout débris caséinatique provenant du coagulum formé dans la culture, donc sans protection vis-à-vis des traitements que nous leur ferions subir. De plus, il nous serait alors possible de faire varier à notre guise le nombre des microorganismes mis en œuvre.

La solubilisation de la caséine par les bicarbonates alcalins devait nous permettre de franchir une nouvelle étape dans les

améliorations que nous avons envisagées. L'expérience suivante ne laisse aucun doute à cet égard :

Expérience préliminaire n° 1. Une culture sur lait écrémé de *Sc. thermophilus* est centrifugée et, sur le culot, nous opérons deux prises d'essai : l'une est lavée à l'eau jusqu'à complète élimination de l'acide lactique, l'autre est malaxée avec une solution de bicarbonate de soude à saturation. Par centrifugation, puis deux ou trois lavages suivis de centrifugations, on sépare les microorganismes du caillé qui les englobait. Les deux prises d'essai sont mises en suspension dans du lait cru et chauffées dans les mêmes conditions. La chromorésistance des microorganismes se manifeste dans les deux cas, peut-être même plus nettement après le traitement au bicarbonate.

Cette expérience, répétée bien souvent et toujours avec le même succès, a servi de base à la mise au point d'une méthode de séparation des corps microbiens que nous avons définitivement adoptée.

Technique adoptée pour la séparation des corps microbiens. — Le *Sc. thermophilus* est ensemencé dans des flacons contenant 100 cm³ de lait écrémé stérilisé. Après 15 à 16 heures de séjour à l'étuve à 45°, le caillé est brisé, puis réparti entre deux godets. 15 minutes de centrifugation à 6.000 tours-minute suffisent à séparer le lactosérum des culots qui englobent la majorité des microorganismes. Chacun de ces culots est trituré au mortier avec 25 cm³ de CO³NaH à saturation. On centrifuge, effectue deux ou trois lavages à l'eau distillée suivis de centrifugations. Les microbes sont ensuite mis en suspension dans du lait cru bactériologiquement propre, à raison de 100 millions de germes par centimètre cube au maximum et chauffés une heure à 100° ou 20 minutes à 120°. (Les photogrammes I et II ont été obtenus en partant de streptocoques séparés suivant cette technique.)

Des essais ultérieurs nous ont démontré que l'on peut remplacer la solution de bicarbonate par une solution de carbonate neutre de sodium à 8% ou de soude à 4% ou d'ammoniaque à 4%. La technique est exactement la même, les résultats tout à fait comparables et on élimine ainsi non seulement la caséine, mais aussi les caséinates.

RÉSULTATS OBTENUS PAR LA MISE EN ŒUVRE DE LA TECHNIQUE NOUVELLE

Ainsi que nous l'avons déjà signalé, l'état chromorésistant des microorganismes se manifeste lorsque le chauffage d'épreuve a lieu dans une pseudo-solution à pH 6,7 du complexe caséinate de

Fig. I

Streptococcus thermophilus en suspension dans le lait écrémé
avant chauffage

Fig. II

après chauffage
(grossissement : 2.400 environ)

Ca + phosphate de Ca. Il est donc logique d'admettre que la modification envisagée peut résulter d'un dépôt de nature phosphatique, caséinatique ou phosphocaséinatique.

Le fait même qu'il s'agit d'une chromorésistance cadre mal avec les deux dernières hypothèses, puisque la caséine et les complexes caséinatiques du lait fixent fortement le bleu de méthylène.

L'étude des traitements en milieu alcalin devait nous permettre de trancher définitivement cette question.

A. Sur les traitements alcalins des microbes chromorésistants

Des streptocoques rendus chromorésistants par chauffage dans le lait puis séparés par centrifugation sont traités par une solution alcaline de nature à dissoudre les caséinates et les complexes caséinatiques : solution décimolaire de soude ou d'ammoniaque. Après lavage à l'eau distillée, on constate qu'ils n'ont rien perdu de leur chromorésistance.

La chromorésistance est donc indépendante de tout enveloppement caséinatique ou phosphocaséinatique.

B. Sur les traitements acides des microbes chromorésistants

Nous avons antérieurement rappelé que si la coloration des microbes chauffés dans le lait était précédée d'un traitement des

préparations à l'acide acétique dilué, les corps microbiens retenant le colorant. Il en est de même si les streptocoques chromorésistants sont mis en suspension dans l'eau distillée et soumis pendant une demi-heure à un barbotage de gaz carbonique à raison d'une bulle à la seconde environ.

Un traitement acide, même ménagé, suffit donc à faire cesser l'état chromorésistant.

Particulièrement instructive, l'étude des solutions où avait eu lieu le barbotage de CO_2 devait nous apporter les plus intéressantes précisions sur la cause recherchée de la chromorésistance.

Détermination qualitative des éléments dissous par traitement au gaz carbonique. — En traitant ces liquides après centrifugation et filtration par l'oxalate d'ammonium en milieu acétique, on obtient un précipité d'oxalate de calcium. En les traitant par le nitromolybdate d'ammonium en milieu nitrique, on provoque la formation d'un précipité jaune de phosphomolybdate d'ammonium.

L'action de CO_2 a donc déterminé la solubilisation de P et de Ca. Pour trancher la question de savoir si ces éléments se trouvaient dans le liquide soit partiellement, soit totalement sous forme minérale, des essais quantitatifs s'imposaient.

Détermination quantitative du phosphore et du calcium dissous par le gaz carbonique. — Nous rapportons ci-après le détail d'une de ces déterminations :

Expérience n° 2. Les streptocoques mis en œuvre proviennent de 500 cm³ d'une culture sur lait écrémé. Ils sont préparés par la technique habituelle, chauffés dans le lait écrémé cru une heure à 100°, séparés du lait par centrifugation, lavés à la soude décinormale, puis à l'eau. On vérifie qu'ils sont bien chromorésistants. Ils sont ensuite mis en suspension dans 100 cm³ d'eau distillée, agités soigneusement, et répartis en deux prises de 50 cm³ chacune. Dans l'une, A, on fait barboter un courant de CO_2 à raison d'une bulle à la seconde ; dans l'autre, B, on fait passer, à la même vitesse, un courant d'air débarrassé de CO_2 .

Après une heure, on arrête les barbotages et on vérifie par un examen microscopique que : en A, les streptocoques ne sont plus chromorésistants ; en B, l'agitation provoquée par le passage de l'air n'a, au contraire, modifié en rien leur chromorésistance.

Dans chaque essai, on sépare très soigneusement les microbes par centrifugation à 6.000 tours-minute, on filtre et on amène les liquides en expérience à un volume connu.

Le liquide provenant du barbotage carbonique est divisé en

deux fractions de 25 cm³ : A¹ et A², celui où a barboté l'air en deux fractions de 25 cm³ : B¹ et B².

Dans A¹ et B¹, on dose le calcium par précipitation à l'état d'oxalate en milieu acétique et le phosphore est précipité sous forme de phosphomolybdate de baryum en milieu sulfurique suivant la technique indiquée par POSTERNAK [6].

Dans A² et B², les mêmes précipitations sont effectuées mais après minéralisation des éléments en solution par le mélange sulfonitrique.

Le tableau suivant, dans lequel P et Ca sont exprimés en milligrammes et rapportés à la totalité des prises d'essai A et B, donne les résultats de ces dosages.

Traitements de la suspension microbienne		Eléments dosés		Ca
		Ca	P	P
Barbotage de CO ²	sans minéralisation	5,7	3	1,9
	après minéralisation	5,4	2,7	2
Barbotage d'air	sans minéralisation	traces	traces	
	après minéralisation	traces	traces	

De ces chiffres, on peut conclure :

1^o Que c'est l'action acidifiante de CO² qui a solubilisé le Ca et le P puisque le barbotage d'air n'a entraîné aucune solubilisation de ces éléments.

2^o Que cette solubilisation de Ca et de P s'est faite sous la forme minérale puisque les dosages effectués avant et après minéralisation donnent des résultats dont les différences sont de l'ordre de grandeur des erreurs d'expérience.

3^o Que le calcium et le phosphore solubilisés dans le liquide sous la forme minérale s'y trouvent en proportions telles que le rapport $\frac{\text{Ca}}{\text{P}}$ est très voisin de celui qui correspond à un phosphate tricalcique

de formule (PO⁴)²Ca³ (Pour (PO⁴)²Ca³, $\frac{\text{Ca}}{\text{P}} = 1,935$).

Tout se passe donc comme si la chromorésistance était due à un enrobage phosphocalcique des corps microbiens.

C. Confirmation indirecte du rôle des phosphates calciques du lait dans le phénomène étudié

Nous avons rappelé précédemment qu'un lait préalablement soumis à un chauffage énergique est incapable de provoquer la chromorésistance des ferments lactiques. Il est logique de penser que ce fait est en rapport avec une première modification survenue dans l'état des phosphates calciques du lait à la faveur des premiers traitements thermiques. On peut dès lors se demander si un lait chauffé puis rechargé en phosphate calcique colloïdal ne redeviendrait pas de nouveau propre à rendre par chauffage les streptocoques chromorésistants. Dans l'affirmative, on aurait apporté une présomption nouvelle en faveur de l'idée d'un enrobage phosphocalcique. L'expérience suivante montre que cette idée doit être retenue :

Expérience n° 3. Un échantillon de lait écrémé est chauffé une heure à 100°. On s'assure qu'il est incapable de rendre les streptocoques chromorésistants. Sous agitation mécanique, on le traite par un lait de chaux en quantité telle que le calcium ajouté à 100 cm³ de lait représente 50 milligrammes (dose moyenne de calcium uni au phosphore dans 100 cm³ de lait). Sans interrompre l'agitation, on ajoute très lentement une solution d'acide phosphorique à 1/5^e jusqu'à obtention d'un pH égal à 6,7.

Soumis aux chauffages d'épreuve habituels dans le lait ainsi rechargé en phosphate calcique, les streptocoques deviennent chromorésistants, exactement comme s'ils avaient été chauffés dans du lait frais.

D. Caractérisation directe d'un phosphate calcique à la surface des corps microbiens chromorésistants

Nous avons cherché à confirmer encore les résultats précédents en caractérisant directement les phosphates calciques à la surface des corps microbiens par des méthodes microchimiques. Nous avons appliqué à notre cas particulier les techniques habituellement utilisées dans les coupes. Parmi différentes méthodes essayées, celle de Kossa [4] nous a donné d'excellents résultats. Nous l'avons appliquée à des frottis de streptocoques rendus chromorésistants par chauffage dans le lait. Ceux-ci sont lavés d'abord à l'ammoniaque, puis à l'eau; ils sont fixés à l'alcool et finalement soumis pendant une demi-heure à l'action d'une solution de nitrate d'argent à 5% à la lumière du jour.

Après lavage à l'eau, on examine le frottis au microscope. Les streptocoques sont colorés en brun. Traités dans les mêmes conditions, mais non chauffés dans le lait et non chromorésistants, les streptocoques ne présentent aucune coloration.

E. Sur les rapports de l'enrobage avec la membrane microbienne

L'enrobage adhère fortement à la surface des cellules microbiennes. Nous avons vu qu'un barbotage d'air, même prolongé, ne peut l'en détacher. Nous avons en outre contrôlé qu'il en est de même d'une agitation d'un quart d'heure avec des billes de verre. Il ne saurait donc être question d'un simple dépôt de phosphate sur la cellule microbienne.

L'expérience n° 4 montre d'autre part qu'il ne s'agit pas davantage d'une combinaison de phosphate calcique avec la membrane de la cellule microbienne.

Expérience n° 4. Des microorganismes enrobés par chauffage dans le lait sont mis en suspension dans l'eau distillée et traités par un courant de CO². Leur revêtement est dissous et ils cessent d'être chromorésistants. Séparés, lavés, puis chauffés à nouveau dans du lait écrémé frais, ils redeviennent chromorésistants du fait d'un deuxième enrobage qui peut à son tour être dissous et remplacé, dans les mêmes conditions que précédemment, par un troisième et ainsi de suite. L'enrobage phosphocalcique n'altère donc pas la membrane microbienne.

Ces faits sont incompatibles avec l'hypothèse d'une combinaison chimique entre le phosphate calcique et la couche externe de la membrane microbienne. Ils cadrent, au contraire, parfaitement avec l'idée que la couche externe de cette membrane retient les phosphates par adsorption. D'après l'aspect des tableaux microscopiques fidèlement reproduits dans le photogramme I, il apparaît d'ailleurs que cette couche externe, dont la nature est vraisemblablement hémicellulosique, prend, dans les conditions de nos essais, un développement tel qu'elle évoque l'idée d'une amorce de capsule, idée déjà suggérée dans une étude antérieure [2].

Conclusion

Les nouvelles études rapportées dans ce mémoire établissent en fin de compte que la chromorésistance des cellules de *Sc. thermophilus* acquise par chauffage dans le lait frais est due à l'adsorption par la membrane de la cellule microbienne des phosphates calciques du lait qui tendent à se libérer du milieu colloïdal à la faveur des traitements thermiques.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] G. GUITTONNEAU et M^{lle} J. BRIGANDO (1936). Sur une résistance aux colorations de certains corps microbiens acquise par chauffage dans le lait. *Comptes rendus Acad. Sc.*, 202, pages 1622 à 1624.
- [2] G. GUITTONNEAU et M^{lle} J. BRIGANDO (1936). Observations relatives à

- la coloration des microbes préalablement chauffés dans le lait. *Le Lait*, t. XVI, p. 577 à 587.
- [3] G. GUITTONNEAU et M^{lle} M. BÉJAMBES (1937). Chromorésistance et enrobage phosphocalcique des microbes chauffés dans le lait. *Comptes rendus Acad. Sc.*, 205, pp. 1013 à 1015.
- [4] KOSSA Nachweis von Kalk. Ziegler's Beitr. XXXIX, d'après LANGE-RON. *Précis microscopie*, 1921, p. 795.
- [5] S. ORLA-JENSEN (1919). The lactic acid Bacteria, p. 136.
- [6] S. POSTERNAK (1920). Sur le dosage de petites quantités d'acide phosphorique à l'état de phosphomolybdate de baryum en présence et en l'absence du phosphore en combinaison organique. *Bull. Soc. Chim.*, XXVII, pages 507 à 518 et 564 à 568.

LE LAIT DANS QUELQUES-UNES DE SES FORMES D'UTILISATION

par le Dr JOSÉ MARIA ROSELL

Bactériologiste du Ministère de l'Agriculture de Québec.
Ancien professeur de Pathologie digestive et de la Nutrition,
à Barcelone (Espagne).

(Fin.)

DEUXIÈME PARTIE

LE LAIT « MÉDICAMENT »

Le lait en nature et certains de ses dérivés et produits comme éléments de traitement des maladies

Dès les plus anciennes époques de la médecine, on a eu recours aux cures de lait (cures de lait naturel, ou mieux, cures de laits modifiés ou transformés), pour le traitement d'un bon nombre de maladies. C'est surtout dans les maladies provenant directement et indirectement des altérations ou anomalies de la nutrition ou métabolisme et dans les affections digestives, que sont utilisées les cures de lait ou de ses dérivés : petit-lait ou sérum, lait écrémé ou lait riche en crème, laits lactiques, laits champagnisés, etc. On a écrit : « *qu'il n'y a aucun médicament qui peut guérir autant de maladies que le lait, ni presque aucune maladie qui ne puisse bénéficier de l'emploi du lait par l'une ou l'autre de ses formes d'utilisation médicale.* »

On ne doit pas considérer les cures de lait comme cures spécifiques. L'action thérapeutique de la lacto-thérapie consiste en beaucoup de cas, essentiellement dans la modification des facteurs humoraux, bio-chimiques ou bio-physiques qui prédisposent à la maladie ou la produisent. La lactothérapie est parfois utilisée comme cure de réduction ou d'élimination ou de désintoxication ou d'absti-