LE LAIT

REVUE GÉNÉRALE DES QUESTIONS LAITIÈRES

SOMMAIRE

Mémoires originaux :

- G. BARTHÉLEMI. — La précipitation spécifique des lactoprotéines comme moyen de contrôle du chauffage du lait. 225
- R. VLADESCO. — Le dosage des chlorures par microsedimentation. Application au lait 233
- M^{lle} A. VINET et M. P. MEUNIER. — Le dosage électrophotométrique des vitamines B₁ et B₂ du lait sans adsorption préalable 236
- M^{lle} A. VINET et M. P. MEUNIER. — Dosage électrophotométrique des vitamines A et C dans le lait. Influence de la stabilisation et de la conservation 239
- G. GUITTONNEAU et SUZANNE HAAS. — Sur un sporotrichum, agent de la maturation normale de certains fromages 243

- G. GÉNIN. — Un procédé américain pour la fabrication de la laine de caséine 250

Bibliographie analytique :

- Journaux, Revues, Sociétés savantes 256

Bulletin bibliographique :

- Journaux, Revues, Sociétés savantes 313

Documents et informations :

- 35^e Congrès annuel de l'« American Dairy Science Association », Université de Purdue, 24-28 juin 1940 :
(A suivre)
- 1^o Crème glacée 324
- 2^o Lait de consommation 329
- Nécrologie : H. Stassano 335

MÉMOIRES ORIGINAUX (1)

LA PRÉCIPITATION SPÉCIFIQUE DES LACTOPROTÉINES COMME MOYEN DE CONTRÔLE DU CHAUFFAGE DU LAIT

par

* le Docteur G. BARTHÉLEMI

Médecin hygiéniste. M. R. San. I. Assistant à l'Université libre de Bruxelles.
Laboratoire d'Hygiène.

Le développement qu'a pris la pasteurisation et les perfectionnements apportés aux appareils de chauffage du lait ont suscité de nombreuses recherches dont l'objet est de trouver un procédé pratique capable d'en contrôler l'efficacité.

L'emploi de thermomètres enregistreurs, montés sur les pasteu-

(1) Reproduction interdite sans indication de source.

risateurs, garantit dans la plus large mesure les conditions de durée et de degré de chauffage, mais il n'en reste pas moins nécessaire de soumettre le lait pasteurisé à des contrôles réguliers afin de déceler rapidement les défaillances éventuelles dans le bon fonctionnement des appareils et de vérifier les allégations parfois inexactes des producteurs.

On sait que l'absence, dans le lait pasteurisé, de germes pathogènes pour l'être humain indique que la pasteurisation a atteint son but.

Si le contrôle bactériologique autorise des conclusions formelles quant à la salubrité et à l'innocuité du lait pasteurisé, le temps qu'exige l'exécution des techniques mises en œuvre dépasse les possibilités d'un service de contrôle tel qu'il doit fonctionner en pratique. Il faut à ce dernier un procédé à la fois rapide et sûr, utilisable pendant l'opération même de la pasteurisation, et qui permette d'arrêter encore à temps la distribution d'un lait qui n'offrirait pas toutes les garanties requises.

L'étude des ferments du lait a permis de trouver une solution qui satisfait à ces conditions.

Ces ferments sont thermolabiles et l'on a observé que certains d'entre eux perdent leur activité enzymatique lorsque le chauffage atteint exactement une durée et un degré de température bien définis, qui sont précisément réalisés dans la pasteurisation. La disparition du ferment correspond donc, dans ces conditions, à la destruction des agents pathogènes du lait.

C'est sur ce principe qu'est basée la méthode de contrôle enzymatique de la pasteurisation basse, méthode mise au point par KAY et GRAHAM.

La phosphatase qu'ils ont décrite et dont ils ont étudié le comportement se trouve annihilée lorsque le lait a été chauffé à 62°5 — 63° pendant 30 minutes, comme l'exige la pasteurisation basse. La réaction est à ce point sensible qu'un écart de deux degrés au plus ou de quelques minutes est aisément décelé par la persistance de l'activité enzymatique. L'addition accidentelle ou non de 2% au plus de lait cru se dépiste tout aussi aisément.

D'autres auteurs ont étudié le comportement des protéines solubles du lait aux diverses températures.

RUPP [6], notamment, trouve les pourcentages de coagulation suivants, après avoir chauffé le lait à diverses températures pendant 30 minutes :

0	à 62°8
5,71 %	à 65°6
12,76 %	à 68°3
30,87 %	à 71°1

ROGERS [7] et DAVIES [8] indiquent que la lactoglobuline est complètement coagulée à 72°.

BABCOCK [9] n'observe aucune modification des protéines du lait après un chauffage à 65° pendant 20 minutes.

FREUDENRICH [10] trouve que 15 à 20% des albumines sont coagulées par le chauffage à 68 — 69°5 pendant 30 minutes.

ROWLAND [11] a étudié la dénaturation par la chaleur des protéines solubles pour différentes durées de chauffage, à diverses températures. Il trouve en moyenne :

10,4%	à 63°	pendant 30 minutes
28,0%	à 70°	pendant 30 minutes
52,4	à 67,5%	à 75° pendant 30 minutes
83,4%	à 80°	pendant 30 minutes

Il ressort de ces observations que les protéines solubles du lait sont dénaturées ou précipitées par le chauffage, mais que le degré de précipitation est loin d'être constant aux diverses températures.

Par ailleurs, le dosage des protéines ne peut donner que des résultats sujets à caution par suite des grandes variations de leur teneur dans le lait.

Les valeurs suivantes indiquent nettement que la quantité d'albumines solubles du lait varie dans d'assez grandes proportions :

Lactalbumine. — DAVIES [12] : 0,4% en moyenne; autres auteurs : 0,56% en moyenne.

Lactoglobulines. — DAVIES [12] : 0,18%; BELL [7] : 0,05%.

Dans ces conditions, un dosage des protéines restant en solution ne peut avoir qu'une valeur insuffisante pour l'appréciation ou du degré, ou de la durée du chauffage.

Il apparaît, par conséquent, qu'on ne peut demander à une technique basée sur la précipitation des protéines que ce que peut donner une simple réaction qualitative, comme par exemple celle des ferments.

Ces restrictions étant admises, nous estimons que les indications fournies par la précipitation spécifique des protéines du lait revêtent un intérêt suffisant pour pouvoir éventuellement être considérées comme une contribution aux méthodes déjà nombreuses appliquées au contrôle du chauffage du lait.

I. Préparation du sérum précipitant.

Reprenant les expériences déjà anciennes de BORDET [1], à qui nous devons la découverte de la précipitation spécifique du lait de vache, et celles décrites par différents auteurs — GENGOU [2, 3], BORDET [4] — nous avons, en nous inspirant des techniques

qu'ils ont mises au point, préparé des lapins suivant les méthodes suivantes :

Lapins I et II : 7 injections sous-cutanées, à huit jours d'intervalle, de lactosérum (1) de vache à doses progressives de 0,75 à 5 cm³ (au total 16,25 cm³).

Lapins III et IV : 7 injections sous-cutanées, à huit jours d'intervalle, de lait de vache débarrassé de la matière grasse, à doses progressives de 0,5 à 4 cm³ (au total 12,25 cm³).

Les animaux de chacun de ces groupes sont saignés le huitième jour après la dernière injection. Le sérum obtenu est porté à 56°C. pendant 30 minutes.

II. Activité de l'antisérum.

Préparés dans le but d'étudier la précipitation spécifique du lait de vache entier ou simplement dégraissé, les antisérums ainsi obtenus se sont montrés inactifs en présence de tels antigènes.

En mélangeant, en diverses proportions, l'antisérum avec du lait entier, aucun précipité macroscopiquement visible n'a été décelé. Centrifugés, ces mélanges n'ont montré ni à l'œil nu, ni au microscope, de sédiment plus abondant que le lait pur ou additionné de sérum de lapin neuf.

Les antisérums que nous avons ainsi préparés se sont donc montrés sans action sur la caséine du lait. Cet échec nous paraît dû à l'injection de doses trop faibles d'antigène (2).

Mais, si ces antisérums I, II, III, IV sont inactifs vis-à-vis du lait entier, ils font toutefois apparaître un précipité spécifique dans le lactosérum de vache. C'est cette propriété que nous utiliserons dans les expériences relatées ci-après.

* * *

Comme dans toute précipitation spécifique, il est nécessaire d'observer une certaine relation dans le mélange anticorps-antigène. Ce rapport est variable, dans une certaine mesure, suivant l'antisérum employé et peut servir à déterminer son activité.

En voici quelques exemples, dans lesquels des doses croissantes de 1 à 10 gouttes d'antisérum sont ajoutées à une dose constante de 1 goutte de lactosérum de vache, en présence d'eau physiologique :

(1) Le lactosérum, ou sérum de lait de vache cru, est préparé de la manière suivante : écrémage du lait par centrifugation, coagulation de la caséine par addition de 2% d'une solution d'acide acétique à 20%, élimination de la caséine coagulée par filtration sur papier ou par centrifugation, éclaircissement final du lactosérum sur filtre Seitz. Le lactosérum parfaitement limpide ainsi obtenu est neutralisé au tournesol, à l'aide de NaOH N/10, avant d'être injecté aux animaux.

(2) L'utilisation ultérieure de quantités plus grandes de lait nous a procuré des antisérums précipitant nettement le lait entier.

L.S.V. (1)	1	1	1	1	1	1
Eau physiologique	10	9	8	7	6	5
Antisérum II	1	2	3	4	5	6
	0	0	+	+	+	+
L.S.V.	1	1	1	1	1	1
Eau physiologique	10	9	8	7	6	5
Antisérum III	1	2	3	4	5	6
	0	0	+	+	+	+
L.S.V.	1	1	1	1	1	1
Eau physiologique	10	9	8	7	6	5
Antisérum IV	1	2	3	4	5	6
	0	0	0	+	+	+
L.S.V.	1	1	1	1	1	1
Eau physiologique	10	9	8	7	6	5
Antisérum 2 (2)	1	2	3	4	5	6
	0	0	+	+	+	+

Dans chaque cas, le précipité se forme rapidement (5 minutes au plus). La dose moyenne de 3 gouttes d'antisérum pour 1 d'antigène indique que l'antisérum est suffisamment actif.

Nous exprimons l'activité des divers antisérums de la manière suivante :

Antisérums II, III et 2 : 3/1

Antisérum IV : 4/1

III. Nature de la précipitation dans le lactosérum.

Le lait de vache utilisé dans nos expériences est du lait cru aseptique titrant, au moment de son emploi, en moyenne 2,1 degrés Dornic (soit 2 gr. 1 d'acide lactique par litre).

Le lactosérum qu'on en obtient, préparé suivant la technique décrite précédemment, est franchement acide au tournesol ($pH = 4,8$).

Désirant nous rapprocher de conditions sérologiques plus normales, ce lactosérum est ramené, par addition de NaOH N/1, à un $pH = 7,4$.

A mesure que la valeur du pH s'élève, le lactosérum se trouble progressivement jusqu'à former un flocculat assez dense pour précipiter spontanément après une heure environ.

Le liquide clair surnageant, ou obtenu par centrifugation du flocculat, ne précipite plus, par l'antisérum, de la même manière que le lactosérum non neutralisé.

(1) Les lettres L. S. V. désignent le lactosérum de vache. Les chiffres indiquent le nombre de gouttes.

(2) Antisérum 2 : obtenu par injections de lactosérum neutralisé comme dans le cas des lapins I et II.

L.S.V. $pH = 4,8$	1	1	1	1	1	1
Eau physiologique	10	9	8	7	6	5
Antisérum II	1	2	3	4	5	6
	0	0	+	+	+	+
L.S.V. $pH = 7,4$	1	1	1	1	1	1
Eau physiologique	10	9	8	7	6	5
Antisérum II	1	2	3	4	5	6
	0	0	0	0	+	+

La zone de précipitation est déplacée : pour obtenir un précipité spécifique, il faut ajouter plus d'antisérum au lactosérum neutralisé à $pH = 7,4$ qu'au lactosérum à $pH = 4,8$; de plus, le précipité apparaît plus lentement.

L'activité de l'antisérum II passe donc de 3/1 à 5/1.

Tout se passe comme si l'addition de NaOH au lactosérum lui avait fait perdre une partie de son aptitude à précipiter par l'antisérum.

Cependant, le floculat produit à l'occasion de la neutralisation ne paraît pas avoir entraîné, lors de son élimination, certains produits précipitables en présence d'antisérum.

En effet, ce floculat ne donne pas la réaction du biuret et ne renferme donc pas de matières protéiques.

D'autre part, repris dans de l'eau physiologique et mis en présence d'antisérum, il ne forme pas de précipité.

Enfin, le lactosérum à $pH = 7,4$ reconstitué par remise en solution du floculat à $pH = 4,8$, de manière à reconstituer le lactosérum primitif à $pH = 4,8$, ne précipite plus avec l'antisérum.

Les substances constitutives du floculat, principalement des phosphates, ne paraissent jouer aucun rôle dans la précipitation. Il semble logique d'admettre que les modifications apportées au lactosérum lors de la neutralisation font perdre partiellement aux antigènes qu'il renferme leur aptitude réactionnelle avec le sérum précipitant.

Dans ses recherches sur la précipitation spécifique des albuminoïdes d'origine animale, et plus spécialement sur les constituants du lait, GENGOU [2] n'a pas obtenu de précipité spécifique par action sur la lactalbumine de l'antisérum correspondant.

Comme le lactosérum, préparé ainsi que nous l'avons indiqué, est complètement privé de caséine (1), il ne renferme plus d'autre substance protéique susceptible de donner un précipité spécifique que la lactoglobuline.

Sans avoir pu pousser nos investigations plus loin dans ce do-

(1) L'addition d'un excès d'acide acétique ou de SO^4H^2 N/10 ne provoque aucune précipitation dans le lactosérum.

maine, nous admettrons donc que notre antisérum est précipitant vis-à-vis de la lactoglobuline (1) du lactosérum de vache et que cette lactoglobuline subit, quand on ramène le pH du milieu de 4,8 à 7,4, des transformations qui la rendent moins sensible à l'action du sérum précipitant.

Dans ces conditions, nous pouvons présumer que les autres causes de dénaturation de la lactoglobuline introduiront des modifications dans l'allure de la précipitation spécifique. Telle est l'influence du chauffage du lait.

IV. Influence du chauffage du lait.

Nous avons étudié les aspects de la précipitation spécifique dans le lactosérum de laits de vache traités différemment par la chaleur, notamment :

1. Le lait cru aseptique qui nous sert de base de comparaison.
2. Le lait bouilli à 100° pendant dix minutes (ébullition domestique).
3. Le lait pasteurisé à haute température à 80° pendant deux minutes.
4. Le lait chauffé en couche mince de 1 mm. d'épaisseur, à 75° pendant 16 secondes (procédé Stassano).

Après addition d'antisérum, les résultats sont les suivants :

L.S.V. cru	1	1	1	1	1	1
Eau physiologique	10	9	8	7	6	5
Antisérum II	1	2	3	4	5	6
	0	0	+	+	+	+
L.S.V. bouilli	0	0	0	0	0	0
L.S.V. pasteurisé à 80° C. .	0	0	0	0	0	0
L.S.V. stassanisé	0	0	±	±	+	+

Les lactosérums de lait bouilli et de lait pasteurisé à 80° pendant deux minutes ne montrent jamais de précipité quelle que soit la dose d'antisérum employée.

Le lactosérum de lait stassanisé donne un précipité, mais ce dernier apparaît plus lentement et exige, pour se former avec la même intensité que dans le lactosérum cru, l'addition de doses plus élevées d'antisérum.

En observant la formation du précipité en fonction du temps et de son intensité, nous pouvons établir le graphique ci-après :

(1) Celle-ci est d'ailleurs considérée par LANE-CLAYTON [5], comme étant, parmi les protéines du lait, l'antigène le meilleur et le plus apte à fournir des antisérums particulièrement actifs.

* * *

Le lait ayant subi la pasteurisation basse, c'est-à-dire maintenu à 62°5 pendant trente minutes (procédé qui n'est pas utilisé en Belgique, mais très répandu en Angleterre et aux Etats-Unis), se comporte comme le lait cru à l'égard de la précipitation spécifique.

Les expériences suivantes, faites avec du lactosérum préparé au moyen de laits chauffés respectivement à 62°5, 65°, 70° et 75° pendant trente minutes, montrent qu'à mesure que la température de chauffage s'élève, l'intensité de la précipitation tend à diminuer :

L.S.V. cru	1	1	1	1	1
Eau physiologique	10	9	8	7	6
Antisérum 2	1	2	3	4	5
	0	0	+	+	+
L.S.V. 62°5	0	0	+	+	+
L.S.V. 65°	0	0	+	+	+
L.S.V. 70°	0	0	0	±	±
L.S.V. 75°	0	0	0	0	0

On observe que la précipitation disparaît entre 70 et 75°, ce qui cadre avec les indications données par ROGERS [7] et DAVIES [8] et d'après lesquels la lactoglobuline est complètement coagulée à 72°.

V. Conclusions.

1. Le lactosérum de lait de vache précipite avec l'antisérum correspondant. Cette précipitation est spécifique et paraît attribuable à la lactoglobuline.

2. Le chauffage du lait, en dénaturant les lactoprotéines, modifie l'allure de la précipitation spécifique.

3. Parmi les différentes méthodes de chauffage du lait, la pasteurisation basse n'apporte aucune modification dans la réaction; la stassanisation en diminue la sensibilité; les autres procédés de chauffage l'annihilent complètement.

4. La disparition de la précipitation spécifique s'effectue entre 70 et 75°, limites entre lesquelles la lactoglobuline est complètement coagulée.

L'allure de la précipitation spécifique dans le lactosérum permet donc de déceler si cette température critique a été atteinte à l'occasion de la pasteurisation du lait.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. BORDET. *Annal. Inst. Pasteur*, mars 1899.
- [2] O. GENGOU. *Trav. Inst. Pasteur*, 1901-1909.
- [3] O. GENGOU. Agglutination et précipitation spécifiques. Le traité du sang, t. II, p. 344.
- [4] J. BORDET. Traité de l'immunité dans les maladies infectieuses, Masson, Paris, 1920.
- [5] J. E. LANE-CLAYTON. Milk and its hygienic relations, Longmans et Green, London, 1916.
- [6] RUPP. *U. S. Dep. of Agric.*, bull. 166, 1913.
- [7] ROGERS. *Fundamentals of Dairy Science*, Reinhold, New-York, 1935.
- [8] W. L. DAVIES. *Chemistry of Milk*, Chapman et Hall, London, 1936.
- [9] BABCOCK. 12th Ann. Rep. Wisc. Agric. Exp. Sta., 1895, p. 93.
- [10] FREUDENRICH. *Revue gén. du Lait*, 1905, 4, 433.
- [11] ROWLAND. *Journal Dairy Research*, 1933, 5, 46.
- [12] W. L. DAVIES. *Journal Dairy Research*, 1932, 4, 144.

LE DOSAGE DES CHLORURES PAR MICROSÉDIMENTATION. APPLICATION AU LAIT.

par

RADU VLADESCO

Professeur de Chimie biologique. Faculté de Médecine Vétérinaire de Bucarest.

Le dosage des chlorures devient un problème délicat lorsqu'il s'agit de quantités très réduites de ces corps. En effet, en utilisant l'azotate d'argent, réactif habituel des chlorures, on arrive, avec 1 milligramme de chlorure, par la voie gravimétrique, à peser 4 milligrammes de chlorure d'argent et, par la voie volumétrique, à mesurer un volume de 1,4 cm³ de solution au cinquantième normale d'azotate d'argent. Les solutions plus étendues d'azotate d'argent ne sont pas à conseiller, parce que l'appréciation de la fin de la réaction est très difficile. A ce point de vue, il n'y a pas de différence