LE LAIT

REVUE GÉNÉRALE DES QUESTIONS LAITIÈRES

SOMMAIRE

Mémoires originaux :

- M. POLONOVSKI, L. BAUDU
et E. NEUZIL. — Etat phy-
sico-chimique de la xanthi-
ne-déhydrase dans le lait
de vache (*A suivre*) 1
- B. VIGOUREUX. — Méthode
de détermination rapide à
l'usine des extraits secs des
concentrés 20
- J. KIGER. — Notes complé-
mentaires relatives à l'em-
ploi du lactosérum concen-
tré dans la fabrication des
pâtes alimentaires 28

Revue :

- G. GÉNIN. — Compte rendu
du Congrès d'automne 1947
de l'American Chemical
Society 32

Bibliographie analytique :

- 1^o Les livres 41

- 2^o Journaux, Revues, Socié-
tés Savantes 48
- 3^o Brevets 87

Supplément technique :

- G. GÉNIN. — Emploi de l'a-
cide lactique dans la fabri-
cation des vernis et rési-
nes synthétiques. 91

BIBLIOGRAPHIE ANALYTIQUE :

- 1^o Revues 100

Documents et informations :

- La poudre de lait et les pro-
blèmes connexes 109
- La distribution du lait en An-
gleterre 111
- Exposition nationale de fro-
mages italiens 112
- Congrès international de l'é-
levage ovin des pays du
bassin méditerranéen . . . 112

MÉMOIRES ORIGINAUX (1)

ÉTAT PHYSICO-CHIMIQUE DE LA XANTHINE-DÉHYDRASE DANS LE LAIT DE VACHE

par

M. POLONOVSKI, L. BAUDU, E. NEUZIL

En parcourant l'historique de la xanthine-déhydrase : travaux de SPITZER (1899) et de SCHARDINGER (1902), de JONES, STEWART, HOPKINS, MORGAN qui l'ont découvert dans le lait de vache en 1922, on est frappé de la divergence des résultats obtenus par les chercheurs. Contradictoires sont leurs conclusions sur la nature de l'enzyme, sur le mécanisme de la réaction, sur son activité, voire sur sa signification pathologique.

Devant un tel chaos on ne pourrait qu'évoquer la parole de DUCLAUX : « Il n'y a pas un lait, mais des laits », si cette incohérence,

(1) Reproduction interdite sans indication de source.

pas toujours imputable à la faiblesse de l'expérimentation, ne reconnaissait en fait l'instabilité du lait.

Dans l'étude du ferment de SCHARDINGER, les conditions de prélèvement, d'asepsie, de température, de conservation du lait et bien d'autres facteurs qui nous échappent, sont à l'origine de cette diversité d'opinions.

Rappelons que cet enzyme est dénommé encore, improprement, xanthine oxydase (BURIAN). Nous savons aujourd'hui, après les travaux de WARBURG et CHRISTIAN, de CORRAN, DEWAN, GORDON, GREEN, que cette diastase appartient au groupe des ferments jaunes, son coenzyme étant une isoalloxazine adénine dinucléotide et qu'il oxyde certaines bases puriques en acide urique et les aldéhydes en acides. Aussi préférons-nous la dénommer xanthine-déhydrase.

Mais nos connaissances sont légères quant à l'état physico-chimique de l'enzyme et à son rôle dans le lait. Nos acquisitions furent très lentes en ce domaine puisque ce n'est que quarante ans après la communication de SCHARDINGER que WIELAND faisant l'étude critique des expériences de BOOTH montra le premier le rôle du froid sur l'activité déhydrasique du lait. Nous-mêmes en 1947, poursuivant des recherches analogues, avons découvert l'existence d'un point critique de température où la xanthine déhydrase se manifeste brusquement avec une activité considérable.

Ce phénomène qui peut d'ailleurs se produire également par action de composés chimiques est suffisamment important pour que nous lui ayons appliqué un terme propre : celui de « révélation ».

La nature et les conditions de cette révélation constituent l'objet de ce travail.

Nous ne recherchons pas au cours des expériences qui vont suivre les activités enzymatiques absolues, c'est-à-dire un nombre d'unités diastasiques. Nous comparons seulement les activités relatives de différents matériels. Celles-ci seront mesurées par le temps de décoloration en secondes d'une solution M/80 de bleu de méthylène, le substrat étant une solution M/20 d'hypoxanthine dans de la soude au même titre.

Le protocole est le suivant :

	cm ³
Lait ou émulsion de crème	2
Bleu de méthylène M/80	0,1
Eau lactosée à 40 ‰	0,8
Hypoxanthine M/20	0,1
<hr/>	
Volume total	3

Les expériences sont faites en tubes de THUNBERG ou de KEILIN

ou en tubes à hémolyse sous une couche d'un centimètre d'huile de paraffine. Vu la brièveté des observations, la perméabilité de la couche isolante à l'oxygène ne saurait être une source d'erreur dans les mesures.

L'enzyme de la crème

Il est certain que la xanthine déshydrase du lait est liée à la crème. Le lait, fraîchement traité, ne renferme pas d'enzyme libre dans son lactosérum. L'opinion soutenue par certains auteurs que de la crème lavée serait inactive (TWIGG) est infirmée par l'expérience. Nous savons d'ailleurs que le lait de début de traite, pauvre en matières grasses, a une activité enzymatique très faible. Celui de la fin de traite, au contraire, a une activité plus grande, correspondant à un taux élevé de graisse.

Les expériences suivantes illustrent bien ce fait :

Expérience I. — Du lait fraîchement traité est laissé au repos dans une haute éprouvette. Trois siphons sont fixés à la paroi par des pinces et plongent à différentes hauteurs. Toutes les heures, on prélève, avec douceur, pour éviter les remous, du lait de chaque siphon en éliminant à chaque fois les premiers centimètres cubes tirés qui représentent la capacité de chaque appareil. Puis on mesure l'activité du liquide recueilli. Du fait du écrémage, le taux de graisses à chaque niveau de l'éprouvette est constamment variable. Le tableau ci-après résume les observations concernant un lait d'activité 23 minutes (Lait K) :

Temps	Fond minutes	Milieu minutes	Surface minutes
1 ^{re} heure	25	23	22
2 ^e heure	30	23,30	21
3 ^e heure	36	33	18,50
4 ^e heure	40	23,30	16
5 ^e heure	43	25	14
6 ^e heure	47,50	26	10

Sur ce tableau, on peut suivre la montée de l'enzyme accompagnant la crème.

L'activité sensiblement constante du liquide prélevé dans la région médiane de l'éprouvette s'explique par des faibles variations de la teneur en crème à ce niveau : le liquide s'appauvrissant en matières grasses par le haut, mais s'enrichissant au détriment des couches inférieures.

L'expérience suivante démontre qu'il n'existe absolument pas d'enzyme libre dans le lactosérum.

Expérience II. (Lait K). — Lorsqu'après centrifugation un lactosérum est encore actif, c'est que la vitesse ou la durée de centrifugation ont été insuffisantes pour

Fig. 1

Activité du lacto-sérum en fonction de la vitesse de centrifugation.

de méthylène, tandis que la fine pellicule blanche surnageante après la centrifugation conserve une activité appréciable.

Les dosages de beurre que nous avons effectués sur de nombreux échantillons de lait ne nous ont pas permis d'établir une relation mathématique entre l'activité et le taux de matières grasses.

Nous avons constaté néanmoins, contrairement à l'opinion de MISCHLIN, que l'activité d'un lait variait dans le même sens que sa richesse en graisses.

La révélation de l'enzyme

Ainsi l'enzyme est fixé énergiquement à la crème. Il est maintenant nécessaire d'insister sur ce point particulier, à savoir que l'enzyme même fixé aux graisses du lait, possède toutes ses propriétés diastasiques. Quel que soit le mode de liaison; les surfaces actives de l'enzyme sont libres.

En effet, centrifugeons du lait brut, c'est-à-dire fraîchement trait et maintenu à la température de l'animal (lait F, d'activité 17 minutes). Rejettons le lactosérum et prélevons un quart de centimètre cube environ de crème que l'on émulsionne dans un tampon phosphate disodique 0,2 M ($pH = 7,2$). La mesure de l'activité se

chasser du liquide tous les globules gras de diamètre voisin de 2μ qui restent en suspension sans être déplacés par la force centrifuge. Ces éléments gras portent évidemment une certaine quantité d'enzyme. On obtient un liquide absolument inactif par centrifugation d'un lactosérum à 12.000 tours pendant 30 minutes. Après cette opération, l'examen ultra-microscopique de la phase liquide ne montre plus d'éléments gras organisés. Un tel lactosérum abandonné pendant 15 heures en tubes de KEILIN, en présence d'hypoxanthine est incapable de réduire des traces de bleu

fait, comme d'habitude, suivant le protocole exposé plus haut. On obtient la décoloration du bleu en 3 minutes 45 secondes.

Emulsionnons la même crème maintenue à 38° dans un volume d'eau lactosée à 40 ‰ égal à celui du lactosérum rejeté : le bleu est réduit en 18 minutes 10 secondes. Ce chiffre est sensiblement le même que celui du lait total. Le lactosérum n'intervient donc que comme facteur de dilution.

Cette expérience infirme les conclusions de certains auteurs selon lesquelles l'enzyme pourrait être libéré d'un précurseur inactif. A l'état naturel, l'enzyme est actif mais inapte à se décoller de la crème et à passer en solution. Or, sous l'influence du froid, ou d'autres facteurs, les uns physiques : chaleur, agitation ; d'autres chimiques : corps tensio-actifs, solvants des graisses, alcalis ; les derniers enfin, mixtes : vieillissement, l'enzyme est révélé.

La faible activité primitive du lait total devient brusquement énorme et se rapproche de celle de la crème pure. Aussi peut-on expliquer la révélation par le décollement de l'enzyme dont une fraction quitte la crème et se solubilise dans le lactosérum.

Le globule de graisse. Hypothèses sur les liaisons Crème-Enzyme

Lorsque l'on essaie de débarrasser la crème de toutes les substances du lactosérum qui la souillent, on s'aperçoit que, malgré de multiples lavages, on ne peut obtenir des lipides purs.

Cette proposition est presque évidente aujourd'hui puisque nous savons que dans le lait (TAYEAU) comme dans le sérum sanguin (MACHEBŒUF, SANDOR) il existe des cénapses lipidoprotidiques.

Pas davantage d'ailleurs, en effectuant l'opération inverse, (extraction des graisses par l'éther), n'obtenons-nous un résidu protidique simple : une fraction des graisses reste liée aux protides et échappe à l'action du solvant.

Pour effectuer une scission pratiquement complète, il faut comme dans la méthode d'Adam, faire agir longtemps sur les graisses cénapsées, de l'alcool ammoniacal qui rompt les cénapses et qui permet d'extraire par l'alcool et l'éther (KUMAGAWA-SUTO-LEMELAND) la totalité des matières grasses libérées du coagulum.

Par ces méthodes, une émulsion aqueuse de 10 g. de crème, bien lavée à 38° avec de l'eau lactosée, de l'eau physiologique et enfin deux fois à l'eau distillée, abandonne un résidu protéique non négligeable.

Suivant les échantillons, il peut varier de 0,12 g. à 0,25 g. Ce résidu blanc fournit les réactions des protéines. Il est partiellement soluble dans l'eau distillée. L'addition d'un peu d'acide sulfurique N/10 le solubilise, mais détermine un léger précipité blanc

que nous attribuons à la présence de sels de calcium (existant peut-être sous forme de savons calciques).

Malheureusement, nous sommes encore au stade des hypothèses sur la nature de ces liaisons lipides-protides.

Il est fort probable qu'ici, comme dans le sérum sanguin, il en existe différents modes « allant de la simple adsorption jusqu'à la combinaison chimique mais sans exclure des phénomènes de solvation entre des restes protidiques et lipidiques semblables, ni des liaisons intermoléculaires non électroniques : force de VAN DER WAALS » (MACHEBEUF).

Cependant la comparaison ne semble pas absolue entre les cénapses sériques et celles existant dans le lait. Il apparaît que ces dernières sont beaucoup plus labiles. Si TAYEAU, prolongeant pendant 48 heures le contact lait-éther, n'a pu extraire que les 3/10 des lipides phosphorés et les 6/10 du cholestérol, il a bien solubilisé la majeure partie des lipides totaux.

Nous-mêmes, modifiant cette expérience par l'action successive de l'eau saturée de chloroforme agissant 36 heures à 38°, puis de la ligroïne (mêmes durée et température de contact) avons obtenu un résidu ne donnant plus les réactions du cholestérol.

Le comportement particulier des graisses du lait et certaines observations avaient conduit nombre d'auteurs à considérer les globules gras sous l'angle histologique d'une particule organisée. Déjà STORCH, en 1897, examinant du beurre à l'ultra-microscope, s'étonnait d'y trouver des globules gras ayant conservé leurs caractères de globules du lait malgré les multiples traumatismes de l'écémage et de la butyration. Et la résistance présentée par les globules à l'action de l'air liquide sur de la crème, suivie de pulvérisation au mortier de la masse pétrifiée est un autre sujet d'étonnement.

Le globule posséderait une enveloppe protéique appelée « Haptein » par HATTORI et « Milk fat globule membrane » par les Anglo-Saxons.

L'examen microscopique montre en effet autour des globules un liséré foncé parfois biréfringent se présentant comme une coque sphérique.

Cette membrane possède une certaine élasticité. Nous avons remarqué cette propriété en étudiant les modifications des globules gras sous l'action des solvants des graisses. L'addition de chloroforme ou d'acétone détermine un gonflement du globule. Son hypertrophie atteint jusqu'à trois fois son diamètre primitif sans modification morphologique quelconque de l'enveloppe. Enfin le mode holocrine (1) de la sécrétion mammaire apporterait un nouvel argument en faveur de cette thèse.

(1) En réalité le mode de sécrétion est mixte : holo mérocrine.

Pourtant cette manière de voir ne s'accorde pas avec les observations suivantes :

1. L'extraction relativement aisée des graisses par les solvants organiques s'accorde assez mal avec l'existence d'une enveloppe protectrice.

2. Lorsqu'une pression croissante s'exerce sur des globules de lait placés entre deux lames, on assiste à une déformation progressive des éléments qui prennent une forme « en fromage de gruyère » de plus en plus étendue et d'un seul coup se rompent. Ils donnent immédiatement naissance à trois ou quatre petits globules présentant tous les caractères du précédent. Jamais nous n'avons trouvé de résidu de membrane ou de cicatrice baveuse comme il s'en produit après l'éclatement d'une cellule végétale par exemple.

En opérant sur un globule de 40μ environ de diamètre, on peut répéter plus de quatre fois cette fragmentation sans obtenir jamais d'éléments de morphologie anormale, bien que la surface de l'enveloppe des nouveaux éléments se soit accrue énormément.

Soit, par exemple, un globule de 40μ de diamètre, sa surface est de $5.024\mu^2$. Une première fragmentation donne naissance à trois globules égaux de diamètre 24μ ayant chacun une surface de $1.809\mu^2$ (surface totale $1.809 \times 3 = 5.427\mu^2$). Deux de ces globules se sont encore divisés en deux sous-globules de diamètre 22μ et de surface $1.521\mu^2$ (surface des quatre nouveaux éléments $1.521 \times 4 = 6.084\mu^2$). Le troisième a présenté une triple fragmentation en trois petits globules de diamètre 19μ et de surface $1.159\mu^2$ (soit $3.477\mu^2$).

Nous sommes donc partis d'une surface de $5.024\mu^2$ qui, après la première fragmentation, est devenue $5.427\mu^2$. A la seconde opération, nous avons une surface totale de $6.084 + 3.477 = 9.561\mu^2$ c'est-à-dire près du double de la surface primitive et nous pouvons encore poursuivre l'opération. Sur cette fragmentation, repose d'ailleurs l'homogénéisation des laits.

3. Un autre argument contre l'existence d'une membrane globulaire est la facilité avec laquelle certains corps tensio-actifs comme les sels biliaires, après très légère agitation, augmentent la finesse de l'émulsion lactée.

Insistons encore sur ce point : dans le lait, le terme de cénapse doit être pris dans son sens le plus large du moins en ce qui concerne la majorité des liaisons graisses-protides. Nous avons vu qu'il existe des degrés très divers dans la lipophanérèse. Si elle est très prononcée pour les graisses phosphorées, elle l'est moins pour le cholestérol et très peu marquée pour le gros bloc des graisses neutres.

N'oublions pas non plus que nous avons ici une image renversée des cénapses sériques. Il ne s'agit plus de molécules lipidiques

intriquées dans les replis de la grosse molécule protidique. Nous sommes en face d'un petit nombre d'éléments protéiques de taille réduite comparativement à celle des gouttes de graisse auxquelles elles sont liées.

1. — RÉVÉLATION PAR LE FROID

A. Les faits

Portons un lait brut (lait M) d'activité 19 minutes à la glacière pendant une heure. Au sortir de la glacière, abandonnons 10 minutes à la température ambiante et mesurons son activité : on note 2 minutes 55 secondes.

Cette révélation d'un enzyme du lait par le froid n'est pas le propre du seul ferment de SCHARDINGER. TARASSUK et RICHARDSON avaient signalé le même phénomène à propos des lipases du lait.

Dévant cette coïncidence, il était séduisant de penser à une révélation de la xanthine-déshydrase par hydrolyse des graisses globulaires. Nous avons vite abandonné cette hypothèse non valable dans le cas particulier de la révélation par le froid. (Nous verrons qu'elle peut intervenir dans la révélation par vieillissement.)

Observons les courbes de révélation des lipases et de la xanthine-déshydrase en fonction de la température : elles ne sont pas identiques. La révélation des lipases s'effectue entre 15 et 20°, alors que celle de la xanthine-déshydrase, nous l'avons montré, se produit entre 9 et 15°.

Examinons maintenant la courbe exprimant le degré de révé-

Fig. II

Révélation en fonction du temps d'exposition au froid.

lation en fonction du temps d'exposition au froid, nous voyons qu'elle atteint un maximum après trois minutes pour une mince épaisseur de lait. Il est bien évident qu'à cette température (-3°) et qu'en un temps si bref, la lipase n'a guère d'action (figure II).

Nous avons encore expérimenté différents inhibiteurs des lipases : ésérine, acides gras non saturés à longue chaîne, quinine, etc., qui ne diminuent pas l'action du froid pas plus qu'une préparation de lipase du ricin ne l'augmente.

Ecartant l'hypothèse du froid, agent d'un processus chimique

pur, étudions les modifications physico-chimiques apportées à un lait par le refroidissement. Nous appliquerons nos conclusions au mécanisme de la révélation de la xanthine-déhydrase par le froid.

B. Conséquences physico-chimiques

Les modifications apportées par le froid portent :

Sur le crémage, la densité, la tension superficielle et la viscosité.

Sur l'état physique des matières grasses du lait.

Crémage

Pour les mesures de vitesse d'ascension de la crème, nous avons utilisé des tubes de WESTERGREEN (200 mm. $\times$ 2 mm. 5) soigneusement dégraissés. Nous avons poursuivi les lectures pendant 20 heures. Nos diverses expériences ont eu pour matériel des laits de même activité (14 minutes), ayant la même teneur en graisse (32 g.), provenant de la même vache, dans les mêmes conditions d'alimentation, de traite, de température ambiante. Ces laits ont été conservés en Dewar durant le laps de temps séparant la traite de nos expériences (environ une heure).

Nous avons comparé le crémage d'échantillon de laits bruts et de laits refroidis pendant une heure à -3° (activité après refroidissement 2 minutes 50 secondes) (figure III).

Fig. III

Crémage

Bien qu'on puisse invoquer certaines modifications apportées par l'apparition de réductase vers la quinzième heure, les premières portions de nos courbes sont suffisamment significatives.

Le froid accélère le crémage et le rend plus parfait. Cette accélération est irréversible. Le lait refroidi, puis réchauffé à 38° pendant une ou plusieurs heures, donne une courbe rigoureusement identique.

Appliquons à cette montée de la crème la formule de STOKES, la force f qui détermine l'ascension des globules est :

$$f = k \frac{4}{3} \pi r^3 (dl - db)g$$

où k représente une constante dépendant des unités adoptées, r le rayon du globule, dl et db les densités du lactosérum et de la matière grasse, g la constante de gravitation, soit 980 dynes.

Pour réduire le nombre des variables et partant démêler le rôle exact rempli par la crème dans ce phénomène, nous avons remplacé le lactosérum, milieu complexe qui se modifie aussi sous l'action du froid, par de l'eau distillée. Il nous reste alors les deux variables r et db .

L'allure des courbes fournies par ces émulsions de crème est analogue aux précédentes mais le crémage est beaucoup plus rapide. Avec une émulsion de crème refroidie, le maximum est parfois atteint en moins de quatre heures au lieu de quinze à dix-huit heures.

Etude de r . — Nous avons effectué des numérations globulaires, calculé le diamètre moyen des globules contenus dans un millimètre cube de lait dilué dans de l'eau lactosée isotonique, à l'aide de la cellule de THOMA retournée (afin de rendre visibles simultanément globules et quadrillage).

Les chiffres extrêmes pour différents laits sont 3.050.000 et 6.255.000 par millimètre cube alors que le pourcentage selon la taille reste sensiblement constant (voir tableau ci-dessous). L'examen de l'émulsion de crème laissée à la température de laboratoire donne les mêmes chiffres qu'un lait brut. Par contre, après refroidissement de l'émulsion de crème, outre une diminution du nombre globulaire qui peut atteindre 15 % du chiffre initial, apparaît une répartition différente des globules considérés dans leur taille (même constatation dans le lait refroidi).

	Emulsion Crème brute	Emulsion Crème refroidie
Nombre de globules par mm ³	4.950.000	4.322.000
<i>Taille</i>		
50 μ	0	23 %
40 à 45 μ	5	19 %
25 à 35 μ	55	42 %
10 à 20 μ	30	13 %
5 à 10 μ	7	3 %
2 à 3 μ	3	0 %
Diamètre globulaire moyen	23,65	34,24 μ

On note encore pour les échantillons refroidis (lait ou émulsion) une disposition particulière : l'existence d'amas globulaires constitués par les éléments de tailles différentes.

Etude de db. — Il est très difficile de prendre avec exactitude la densité de la crème qui est toujours plus ou moins souillée d'eau ou de lactosérum. Nos mesures ont donné des chiffres compris entre 0,90 et 0,94. C'est pourquoi, tournant la difficulté, nous avons cherché s'il n'existait pas de modifications des graisses ayant une répercussion sur l'eau des émulsions. Nous les avons étudiées dans ce but, aux points de vue de la tension superficielle et de la densité, et des acidités vraies et potentielles.

	Eau d'émulsion non refroidie	Eau d'émulsion refroidie pendant 1 h.
Tension superficielle (en gouttes par 5 cm ³)	107	115 — 117
Densité à 20°	1	1,01
pH	7	6,7 — 6,8
NaOH N/100 pour neutraliser 10 cm ³ (en présence de phtaléine)	0	0,8

Nous n'avons pu, faute de matériel, mesurer la viscosité du liquide.

Il ressort de tout ceci qu'un premier groupe de facteurs d'accélération du crémage est apporté par le froid.

1. Augmentation de r , diminution du nombre de globules.
2. Formation de conglomerats (chaque conglomerat doit être considéré comme un globule géant).
3. Diminution de la tension superficielle par libération d'acides gras (avec peut-être des esters inférieurs solubles).
4. Augmentation de la densité.

Modifications macroscopiques apportées par le froid

Nous avons recherché les raisons de ces modifications des eaux d'émulsion après refroidissement. Des expériences nous ont montré que les graisses du lait se divisaient en quatre portions inégales sous l'action du froid.

1. Une partie perd sa structure globulaire et se sépare.

2. Une partie conserve l'aspect morphologique et les caractères organoleptiques de la crème fraîche.

3. Une faible portion (esters ou acides gras inférieurs libres) se solubilise.

4. Une petite portion est entraînée avec certaines protéines primitivement accolées aux globules disparus.

On met en évidence ce quadruple phénomène par la simple centrifugation de lait ou d'émulsion préalablement refroidie.

Soit une émulsion de crème bien lavée à 38°, avec douceur, afin d'éviter certaines modifications qui seront étudiées à propos de la révélation par agitation. Pour comparer les résultats de ces expériences avec celles qui portent sur des laits totaux, la quantité d'eau d'émulsion est toujours égale au volume du lactoplasma décanté en préparant la crème. Par lactoplasma, nous désignons le lait « dégraissé », le lactosérum étant un lait à la fois dégraissé et décaséiné (petit-lait).

Cette émulsion est partagée en deux portions aliquotes dont l'une séjourne à la température du laboratoire et l'autre à la glacière pendant une heure.

Les deux portions sont centrifugées en même temps et dans les mêmes conditions (6.000 tours pendant 10 minutes).

Alors que la première (brute) montre seulement une rupture de l'émulsion en ses deux phases : crème et liquide, (ce dernier d'activité enzymatique nulle), la seconde se présente d'une manière totalement différente :

a) Au fond du tube, un tout petit culot blanc insoluble dans l'eau, actif au point de vue enzymatique : par exemple, si l'on met de nouveau en émulsion le culot provenant de la crème de 100 cm³ d'un lait d'activité brute 18 minutes (après refroidissement 2 minutes 5 secondes), il présente une activité de 9 minutes ;

b) Au-dessus du précipité précédent, l'eau d'émulsion un peu louche d'activité enzymatique 3 minutes 50 secondes, surmontée ;

c) De la couche de crème qui a diminué de volume par rapport à celle de l'échantillon non refroidi et toujours active ;

d) Enfin, surmontant cette crème, une couche huileuse jaune d'or liquide à la température ambiante.

Cette expérience est résumée dans le tableau suivant (page 13).

Les Anglo-Saxons qui ont décrit cette couche huileuse « oiling off » ne paraissent pas avoir saisi le rôle ou même vu l'intervention du froid dans ce phénomène. Il est certain que cette couche huileuse provient des globules ayant perdu leur caractère organisé et précisément de ces globules dont nous avons constaté la modification lors de nos numérations du paragraphe précédent.

	Temps de décoloration en minutes des	
	Echantillons bruts	Echantillons refroidis
Lait total	18	3 $\frac{3}{4}$
Crème pure	3 $\frac{1}{2}$	3 $\frac{1}{4}$
Phase liquide de l'émulsion de crème .	45	3 $\frac{3}{4}$
Culot α	$\times$	9
Couche huileuse	$\times$	
Crème résiduelle C	$\times$	3

En effet, vue au microscope, cette couche est optiquement vide et est immédiatement colorable par le soudan III.

Mais que sont devenues les protéines cénapsées à ces globules disparus ? La partie la plus importante s'est solubilisée dans l'eau d'émulsion où, dans certaines conditions de temps de contact et de température, nous l'avons précipitée par le sulfate d'ammonium à demi saturation. Une autre partie, probablement celle énergiquement cénapsée aux graisses, a précipité avec ces dernières, constituant le culot que nous avons trouvé.

Au cours de cette expérience, nous avons constaté une modification des caractères organoleptiques de la couche crémeuse proprement dite. Alors que la crème fraîche non refroidie possède une saveur un peu salée, la crème ayant perdu son « oiling off » est d'une fraîcheur parfaite et légèrement aromatique. Sa consistance est plus friable, mais sa couleur n'a pas varié. D'autre part, un échantillon de cette crème a séjourné plusieurs semaines à la température du laboratoire (25°) sans rancir. Nous avons expliqué ce fait par la disparition de la lipase et aussi par le départ par déshuilage de la majorité des acides non saturés. Il est intéressant de signaler que l'oiling off est beaucoup moins important si l'on émulsionne la crème avant refroidissement dans de l'eau lactosée à 40 ‰ et non plus dans de l'eau distillée. Nous avons déjà signalé que l'eau lactosée ralentissait la vitesse de crémage.

Ces deux phénomènes sont en fonction de la concentration d'ailleurs connexes puisque c'est en lactose.

Fig. IV

Déshuilage et son activité en fonction de la concentration en lactose.

au cours et par l'intermédiaire du déshuilage que la tension superficielle du liquide diminue et son acidité apparaissent, provoquées par le passage en solution d'acides gras et, nous venons de le voir, de protéines.

La courbe suivante montre que le déshuilage peut être presque supprimé et la révélation par le froid très diminuée si l'on emploie de fortes concentrations en lactose (figure IV, tableau I).

TABLEAU I
DÉSHUILAGE ET SON ACTIVITÉ
EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN LACTOSE

Taux de lactose ‰	Pourcentage de déshuilage	Temps de décolora- tion en minutes	Activité = 10.000
			t. de décolor. en sec.
10.....	28	30	5,55
30.....	17	43 $\frac{3}{4}$	3,80
50.....	10,5	51 $\frac{3}{4}$	3,22
60.....	8,5	54 $\frac{1}{2}$	3,05
70.....	5	58 $\frac{3}{4}$	2,83
80.....	4	60	2,77
90.....	3	61 $\frac{1}{4}$	2,72

Modifications microscopiques apportées par le froid

Ces recherches ont été difficiles et incomplètes, notre matériel ne nous permettant pas de longues observations à basse température.

L'image microscopique d'un lait brut est bien connue. Les globules gras sont nettement visibles et ne deviennent colorables par les colorants des graisses qu'après dessiccation ou fixation.

Très différente est, pour l'observateur attentif, la physionomie d'un lait à 0°, non seulement par la diminution du nombre et les variations de pourcentage des globules, que nous connaissons déjà, mais par l'aspect du globule isolé.

Tous ne sont pas modifiés, mais beaucoup présentent des caractères suffisants pour affirmer le refroidissement d'un lait à 0°. On note des globules à contours très marqués, à paroi souvent plissée ou polyédrique et au sein desquels on remarque des formations granuleuses tantôt sombres et tantôt brillantes, d'indice de réfraction très différent du reste de la graisse globulaire. Ceci est très net à l'ultramicroscope. Ces déformations ne disparaissent pas lorsque la préparation se réchauffe. Vers 20°, elles sont moins nettes, mais encore bien visibles. Au cours du réchauffement, on assiste souvent

à une coalescence de ces formations granuleuses (dont certaines atteignent 1 à 2μ) ; réunies, elles sortent du globule sous forme de petite hernie hémisphérique. Ces masses exsudées deviennent facilement colorables par le soudan III.

Nous n'avons pu faire d'observations sur le comportement du globule au cours du refroidissement progressif.

Ainsi nos expériences gravitent autour d'un fait capital : la scission des graisses du lait à basse température.

Considérations d'ordre physique sur le refroidissement des graisses du lait

Chimiquement ces graisses comprennent des acides saturés : acide butyrique et tous ses homologues supérieurs jusqu'à l'acide stéarique ; et des acides non saturés : oléique, accompagné de petites quantités d'acides linoléique, linolénique, gadoléique, etc.

Si l'on tient compte des points de fusion de ces acides et de leurs esters, on peut les répartir en deux autres groupes :

Ceux qui existent à l'état liquide de -10 à $+10^\circ$, principalement :

Acide butyrique	F	-5°
Acide caproïque	F	$+8^\circ$
Acide oléique (31,9 %)	F	-5°

soit les 4/10 des graisses totales.

Ceux dont le point de fusion est supérieur à $+15^\circ$, principalement :

Acide caprylique	F	$+16^\circ$
Acide caprique	F	$+30^\circ$
Acide laurique	F	$+43^\circ$
Acide myristique	F	$+53^\circ$
Acide palmitique	F	$+62^\circ$
Acide stéarique	F	$+69^\circ$

soit les 6/10 de l'ensemble des matières grasses de la crème.

Supposons un instant que la composition de tous les globules de graisse soit identique, c'est-à-dire que chacun contienne un mélange de 40 % d'esters du type oléine et 60 % d'esters du type stéarine.

Chaque globule peut être considéré comme un système binaire. C'est sous cet angle que l'équilibre des graisses a été étudié par de nombreux auteurs et surtout par KOESTLER (figure V).

Leurs diagrammes d'équilibre oléine-stéarine en fonction de la température répondent aux cas d'isomorphisme total et seraient

entièrement exacts si une simple modification de température faisant varier le système dans un sens ou dans un autre permettait le retour à un état antérieur. Mais leurs expériences n'ont pas tenu compte de deux faits :

Fig. V

a) Une partie des graisses est saturée, l'autre non. Nous savons qu'à basse température, de tels mélanges n'ont qu'un isomorphisme atténué (ou sont même parfois isodimorphes). Le refroidissement détermine la formation de deux types de cristaux incompatibles. Au cours du réchauffement, ces cristaux riches en oléine s'éliminent du système par déshuilage.

b) Si l'on avait affaire à un système strictement physique, étudié *in vitro*, de graisses pures, il est bien évident qu'il y aurait réversibilité possible de tous les états d'équilibre.

Le caractère biologique du matériel complique considérablement le phénomène. Rappelons que nous étudions un globule pris isolément qui s'est appauvri après oiling off de toute la fraction oléique exsudée de telle sorte que sa concentration en composés du groupe stéarine s'est accrue. La remixtion après réchauffement n'a plus été possible, car les protéines cénapsées à la surface des graisses restées solides ont constitué un obstacle au mélange des deux fractions grasses.

Le graphique de KOESTLER ne peut ainsi représenter avec exactitude que les petites variations d'équilibre n'aboutissant pas à une destruction du globule : entre 15 et 40° environ, les concentrations de graisses en présence restent constantes (puisque'il ne se produit pas de déshuilage).

Une autre complication à l'expression graphique est encore apportée par le nombre et la diversité des esters composant ces graisses.

Vus dans leur ensemble et non plus considérés dans le globule isolé, mais dans la totalité de la crème, ces équilibres sont encore plus complexes. Deux cas sont à distinguer :

1. Cas du refroidissement d'une émulsion de crème

La phase aqueuse joue un triple rôle :

a) Solubilisation des acides ou esters inférieurs (nous avons vu que l'eau d'émulsion devenait acide après action du froid et que sa tension superficielle diminuait).

b) Solubilisation des protéines constituant la pseudo « enveloppe globulaire » des globules détruits et de celles qui ont été luxées de leurs cénapses au cours du processus de déshuilage.

c) Remontée de l'oiling off sous l'effet des différences de densité.

2. Cas du refroidissement d'une crème pure

Si la démixtion par déshuilage et la destruction de certains globules se produisent bien dans ces conditions, c'est au sein d'une masse quasi-solide ou trop pâteuse pour respecter la mobilité des globules de graisse qui restent accolés énergiquement les uns aux autres.

Les gouttelettes d'huile ne peuvent se rassembler et les protéines libérées ne sont pas mises en solution. Elles conservent la situation qu'elles occupaient au moment où le phénomène s'est produit. Lors du réchauffement qui diminue la coalescence des globules et leur donne une certaine liberté, elles sont immédiatement adsorbées à la surface des gouttelettes d'huile libérées qu'elles organisent en nouveaux globules en formant autour d'elles un film protecteur.

Cette hypothèse se vérifie par l'observation et l'expérience suivante :

A. Lorsque l'on refroidit une crème brute et qu'ensuite seulement on l'émulsionne dans de l'eau, on ne constate pas une révélation aussi importante que pour les échantillons émulsionnés avant action du froid : il faut, pour que ce dernier agisse comme révélateur, que l'enzyme puisse immédiatement passer en solution. (Ceci expliquerait la baisse de révélation en présence d'eau lactosée dont le pouvoir solubilisant est moindre vis-à-vis des protéines.)

Le tableau suivant indique les activités enzymatiques comparées d'émulsions de crèmes brutes (I), de crèmes refroidies avant émulsion dans de l'eau distillée (II), de crèmes refroidies à l'état d'émulsion aqueuse (III) et lactosée à 40 ‰ (IV). L'étude de l'activité a été faite sur des émulsions à 10 % en poids.

Crème	I	II	III	IV
	minutes	minutes	minutes	minutes
C	15	12	1,55	5,20
G	17,20	10,10	2,42	4,10
P	15	9	2,45	4
Q	12,40	7	1,50	3,50
S	14	9,50	2,10	4,30

L'abondance du déshuilage suit ici aussi une marche parallèle à l'intensité de la révélation.

Fig. VI

Activité en fonction de la quantité d'eau distillée pour 100 gr. de crème (ajoutée avant refroidissement).

B. Pour confirmer cette hypothèse de l'eau, intermédiaire indispensable à la révélation, nous avons desséché une crème brute pendant 24 heures dans le vide sulfurique. Puis nous l'avons émulsionnée dans des quantités croissantes d'eau. Dans ces conditions, la révélation est directement fonction de la quantité d'eau présente. La courbe passe par un maximum représentant la saturation en diastase pour la quantité de substrat utilisée pour nos mesures d'activité (0,1 d'hypoxanthine M/20) puis diminue ensuite du fait de la dilution (figure VI, tableau II).

TABLEAU II

ACTIVITÉ EN FONCTION DE LA QUANTITÉ D'EAU DISTILLÉE POUR 100 GR. DE CRÈME (AJOUTÉE AVANT REFOUILLISSEMENT)

Eau (en poids) pour 100 gr. de crème	Activité = $\frac{10.000}{\text{temps de décol. en sec.}}$
40	4,16
160	13,88
320	25,66
400	31,25
480	33,33
560	33
640	28,57
800	19,60
880	14,70
960	8,77
1.040	4,27

En résumé, le froid libère l'enzyme :

- Par destruction d'un certain nombre de globules ;
- Par rupture des cénapses au cours de la scission à basse température des deux blocs d'acides gras ou d'esters.

L'eau ou l'existence d'une phase aqueuse est l'intermédiaire nécessaire à la production du phénomène.

II. Révélation par la chaleur

Le chauffage a une action moins marquée que le froid sur la révélation de l'enzyme. Pour entrer dans la zone de modification globulaire, il faut atteindre des températures voisines de celles où commence la dénaturation du ferment de SCHARDINGER.

L'observation des caractères microscopiques ou physico-chimiques du lait après maintien à différentes températures montre un processus identique à celui déterminé par le refroidissement. Une fois la démixtion effectuée sous l'influence du réchauffement, la fraction exsudée ne se remélange pas au reste des graisses pour les mêmes raisons que celles invoquées à propos du refroidissement.

Cette action de la chaleur est, dans un lait total, la résultante d'un triple mécanisme :

1. Révélateur par augmentation des forces répulsives qui, diminuant la coalescence, augmentent l'espace libre entre les globules et facilitent le contact diastase-substrat.

2. Révélateur comme le froid, mais à un degré moindre, par solubilisation de l'enzyme libre dans la phase liquide.

3. Inhibiteur par action dénaturante de la chaleur sur l'enzyme à une température voisine de 60°.

La courbe suivante exprime l'activité en fonction des températures. (Le lait a séjourné 15 minutes à chaque température. L'activité a été mesurée après un nouveau séjour de 10 minutes au bain-marie à 38°.) (Figure VII).

Fig. VII

Révélation par réchauffement

(A suivre.)