MÉMOIRES ORIGINAUX (1)

L'INDICE PEROXYDASIQUE DU LAIT ET SA DÉTERMINATION

par

LASCAR M. BURUIANA

La peroxydase est un ferment de la classe des redoxases. Comme presque toutes les enzymes elle est formée d'un coferment, groupement prosthétique, et d'un apoferment, substance protéique.

C'est KUHN (1931) qui a identifié le groupement prosthétique à l'hématine. KEILIN (1933) a pu démontrer qu'il s'agit d'un dérivé de l'hématine avec du fer trivalent dont les solutions faiblement acides sont caractérisées par quatre bandes d'absorption : $\lambda_1 = 645$, $\lambda_2 = 583$, $\lambda_3 = 548$ et $\lambda_4 = 498 \mu\text{m}$. Les solutions alcalines à $pH = 10$ présentent seulement deux bandes d'absorption : $\lambda_2 = 583$ et $\lambda_3 = 548 \mu\text{m}$. Par réduction à l'hydrosulfite de sodium, on obtient le spectre caractéristique de l'hémochromogène. L'enzyme serait donc une chromoprotéine (protéine-protohématine) ayant le même groupement ferri-porphyrinique, comme la méthémoglobine ou les cytochromes. C'est ce qu'on appelle une enzyme hémique. Elle se combine à l'eau oxygénée, formant deux combinaisons moléculaires : une en proportion 1/1 caractérisée par deux bandes d'absorption $\lambda_1 = 561$ et $\lambda_2 = 530,5 \mu\text{m}$ et une autre, en proportion 1/n ($n > 1$) caractérisée par les bandes $\lambda_1 = 583$ et $\lambda_2 = 545,5$. La manière d'agir de cette enzyme peut être représentée par les réactions suivantes :

Au lieu de l'eau oxygénée, on peut employer d'autres peroxydes : le peroxyde d'éthyle, les persulfates, l'acide péracétique, etc. Les donateurs d'hydrogène sont le plus souvent les polyphénols, les diamines aromatiques, les acides aromatiques, les flavones, les leuco-dérivés des matières colorantes et même l'acide ascorbique.

(1) Reproduction interdite sans indication de source,

Le rôle principal de la peroxydase est d'activer l'hydrogène des milieux avec grand rH (fortement lié) en neutralisant l'eau oxygénée apparue dans les tissus lors des activités des deshydrases oxybiotiques. La décomposition de l'eau oxygénée peut aussi être faite par une autre enzyme, la catalase, autre enzyme hémique. La catalase et la peroxydase ont le même groupement prosthétique. Elles diffèrent par l'apoenzyme, étant en quelque sorte antagonistes. Où il y a besoin d'un système oxydant plus énergétique, la catalase est remplacée par la peroxydase. Dans les liquides de sécrétion, elles peuvent coexister.

Dans le lait existe plus de peroxydase que de catalase. Dans la salive existe plus de catalase que de peroxydase. Dans les humeurs circulantes comme par exemple le sang il existe de la catalase et pas de peroxydase.

La peroxydase du lait et ses propriétés. La peroxydase du lait est différente des peroxydases végétales.

SARTHO (1909) a fait l'hypothèse que le lait contient plusieurs peroxydases. Il s'est basé sur la constatation que le sérum sulfo-ammonique (après précipitation avec du sulfate d'ammonium solide) ne bleuit plus la teinture de gaïac mais oxyde la paraphénylènediamine, le paraamidophénol, etc. Il y existe donc plusieurs catégories de peroxydases différenciées d'après leur pouvoir activateur envers l'hydrogène du donateur.

On admet aujourd'hui que le lait contient au moins deux peroxydases : une adsorbé par la lactalbumine et une libre (probablement d'origine leucocytaire, de polynucléaires). L'existence de plusieurs peroxydases peut être mise en évidence par fractionnement à l'aide des réactifs précipitants, en particulier, par le sulfate d'ammonium.

Origine de la peroxydase. En ce qui concerne l'origine, les opinions sont partagées.

BARTHEL (1899) observant que le sédiment de centrifugation du lait donne une réaction peroxydasique plus intense que le lait entier, fait l'hypothèse que la peroxydase du lait provient des polynucléaires et en général des éléments figurés existant dans le lait. Comme argument principal, il rapporte la constatation que le colostrum est plus riche en peroxydase et que même les laits exempts de peroxydase comme celui de jument ou d'autres espèces, contiennent toujours de la peroxydase dans le colostrum.

W. GRIMMER (1909) en déduit que la peroxydase est une endoenzyme cellulaire du fait qu'on n'extrait de la peroxydase de la glande mammaire que par destruction mécanique de la membrane cellulaire ou par autolyse enzymatique ou bactérienne.

JENSEN (1907) fait la constatation intéressante que les bactéries

normales du lait ne secrètent pas de peroxydase contrairement à ce qui se passe avec l'autre enzyme, la réductase. Toutefois, par broyage, ces bactéries donnent la réaction peroxydasique, donc la peroxydase est un ferment intracellulaire normal.

SPOLVERINI (1904) par contre, soutient que la peroxydase, pour la plus grande partie, est d'origine alimentaire, donc est un produit d'excrétion. Il apporte comme argument en faveur de sa théorie le fait qu'une chèvre alimentée exclusivement avec des aliments d'origine animale voit disparaître la peroxydase de son lait et la constatation que le lait de femme ne contient pas de peroxydase. Ce dernier argument n'est pas valable parce que l'on connaît des laits d'animaux exclusivement herbivores comme l'ânesse et la jument qui ne contiennent pas de peroxydase ou en contiennent en plus petite quantité que le lait de femme.

J'ai constaté toutefois que le contenu des fourrages en peroxydase influence en quelque mesure le contenu du lait en cette diastase.

Nous signalons aussi l'opinion de BORDAS et TOUPLAIN (1909) que la réaction de la peroxydase est donnée par la caséine du lait, de SPITZER qui l'attribue aux nucléoprotéines et particulièrement au fer qu'ils contiennent (?) et de ALSBERG (1908) qui a constaté le premier que les chlorures (non les sulfates ni les nitrates) des métaux lourds peuvent bleuir la teinture de gaïac c'est-à-dire peuvent activer l'oxygène qui accepte l'hydrogène des composés phénoliques.

Cette constatation a été confirmée par les recherches plus récentes sur la réaction pseudo-peroxydasique des laits contenant des traces de cuivre, fer, etc.

L'existence d'une enzyme spécifique, la peroxydase, dans le lait est un fait pleinement confirmé ; ses réactions étant fondamentalement différentes comme mécanisme et intensité de réactions semblables données par des traces de métaux lourds.

Optimum de température et température d'inactivation. C'est RULLMANN (1901) qui a établi le premier à 25° C., l'optimum de la réaction peroxydasique, GILLET (1902) constata que la réaction est plus rapide entre 40°-50° C. Nous avons constaté aussi que, en s'élevant au-dessus de 25° C., la vitesse de la réaction s'accélère jusqu'à devenir instantanée, mais qu'une température plus grande que 60° C. détruit partiellement la peroxydase.

La température d'inactivation de la peroxydase est aussi une question très controversée. Le fait présente de l'importance parce que la réaction peroxydasique d'un lait est un test très apprécié pour le contrôle du traitement thermique subi par le lait (pasteurisation haute). RULLMANN indique comme température d'inactiva-

tion 76° C. et GILLET observe qu'un chauffage de douze heures à 70° C. ne réduit pas du tout l'activité de la peroxydase.

H. KREKER [1], indique comme température d'inactivation un chauffage de 80 secondes à 80° C. Comme très justement l'a remarqué J. PIEN [2] n'est pas indifférente la durée employée à l'élévation de la température au niveau à expérimenter, l'idéal serait qu'on porte le lait instantanément à la température voulue. A cause de l'inertie thermique la chose n'est pas possible. En travaillant avec une technique spéciale J. PIEN a pu réduire le temps de chauffage de 20° C. à la température à étudier (72-83° C.) à environ 20 secondes. En comparant les résultats de PIEN avec ceux d'autres auteurs, on peut résumer comme suit :

TABLEAU I
TEMPÉRATURES D'INACTIVATION DE LA PEROXYDASE

Températures (degrés C.)	Temps d'inactivation		
	<i>J. Pien</i>	<i>Van Bouma et Dam [3]</i>	<i>Thieulin et Vuil- laume [4]</i>
70	—	150 minutes	—
71	—	66 »	—
72	—	30 »	30 minutes
73	Plus de 30 min.	13 1/2 »	16 »
74	26 minutes	6 »	9 »
75	19 »	2 1/2 »	5 »
76	16 »	30 secondes	3 »
77	11 »	14 »	1 3/4 »
78	9 »	6 »	1 »
79	5 1/2 »	2 1/2 »	Quelques secondes
80	3 1/2 »	—	»
81	1 »	—	»
82	20 secondes	—	»
83	10 »	—	Instantané

Pendant nos recherches nous avons constaté que cette température d'inactivation est variable d'un lait à un autre. Nous avons rencontré des cas dans lesquels la peroxydase était détruite par un chauffage de 3-4 minutes à 77° C., le lait présentant encore intensivement la réaction de SCHARDINGER! Il faut donc être très prudent en regardant les données de la littérature scientifique concernant cette question.

D'ailleurs PIEN remarque que ses données ont été établies avec des laits de mélange et sont donc des moyennes.

Influence du pH. L'optimum du pH de la peroxydase du lait est de 7,6 en opposition avec les peroxydases végétales dont le pH optimum est plus petit ($\text{pH} = 6$). Les acides concentrés détruisent complètement la peroxydase. L'acidification naturelle diminue l'intensité de la réaction peroxydasique. Après neutralisation, l'intensité augmente de nouveau.

Si l'acidité dépasse 65° D. et se prolonge plus de 76 heures, l'intensité de la réaction est très faible et n'augmente plus après neutralisation. Cela prouve que l'édifice enzymatique a été détruit.

Influence des divers réactifs sur la peroxydase. La peroxydase du lait est très sensible à l'action de l'eau oxygénée, du chlorure mercurique, du chloroforme et des narcotiques en général, du fluorure de sodium, des cyanures, de l'hydrogène sulfuré et du formol. Il est intéressant ici de citer les constatations de SELIGMANN et SIEGFELD qui affirment que la formaldéhyde exalte l'action de la peroxydase en la rendant même insensible à l'action de la chaleur. Une étude très attentive de cette affirmation nous a convaincu que la formaldéhyde inhibe l'action de la peroxydase et ne peut rétablir l'action peroxydasique détruite par la chaleur.

La fréquence de la peroxydase dans le lait des différentes espèces.

On constate que la peroxydase manque dans le lait de quelques espèces animales. On la trouve régulièrement dans le lait de bufflesse, vache, brebis et chèvre. Dans le lait de femme, chienne, jument, ânesse et lapine elle existe irrégulièrement. Nous verrons plus loin sa quantité et sa fréquence dans le lait de quelques espèces animales.

Importance de la peroxydase. L'importance capitale de la peroxydase consiste dans le contrôle de la pasteurisation haute. Jusqu'à ce que les méthodes modernes de pasteurisation à l'aide des radiations (radiations électriques ou lumineuses) passent dans la pratique, on va recourir toujours à la méthode de pasteurisation haute qui est efficace, simple et bon marché. Par la technique indiquée par G. THIEULIN et R. VUILLAUME toute ambiguïté quant à l'existence de traces de métaux lourds provenant des appareils de pasteurisation est exclue.

Dans les derniers temps la réaction de la peroxydase a reçu de nouvelles utilisations. C'est ainsi que les recherches de I. K. DEMETER et R. STEUDE [5] ont montré que la destruction du colibacille pendant la pasteurisation est en fonction du contenu en peroxydase du lait.

D'autant le lait est plus riche en peroxydase, d'autant le colibacille est plus rapidement détruit par la pasteurisation. Si le con-

tenu en colibacilles est grand et le contenu en peroxydase petit la pasteurisation ne réussit pas à les détruire. Cette constatation ouvre des nouvelles perspectives pour l'efficacité de la pasteurisation.

G. FAILLA [6] a établi que la conservation de la vitamine C dans le lait est influencée par la teneur en peroxydase. Pour que la vitamine C se conserve plus longtemps dans le lait il faut que le lait ne contienne pas de peroxydase, probablement parce qu'elle est oxydée en servant comme donateur d'hydrogène. Nous signalons la curieuse réaction d'ARAKAWA [7] qui est une réaction des peroxydases et qui donne à ce qu'il paraît des renseignements sur le contenu en vitamine B₁ du lait de femme et sur l'avitaminose thyminique. Dans certaines maladies : syphilis, tuberculose (MARFAN), états fébriles, maladies de nutrition (VÉRONÈSE) la peroxydase du lait croît.

La réaction de Dupouy. Depuis que PLANCHE (1820) a observé que la teinture de gaïac bleuit par les suc végétaux en présence d'eau oxygénée, une foule de réactifs ont été proposés dans ce but. Pour le lait, en particulier, les réactions les plus employées sont les réactions de : Storch (à la paraphénylène diamine), de Rothenfusser (à la paraphénylènediamine et gaïacol) et de Dupouy au gaïcol. D'autres substances ont été proposées dans ce but et on connaît aujourd'hui seulement pour le lait plus de cinquante variantes. Pour accroître la sensibilité ou la spécificité de ces réactions on a souvent associé plusieurs de ces réactifs comme par exemple pour le réactif d'Arakawa qui contient : résine de gaïac, benzidine, gaïacol.

Parmi toutes ces réactions et réactifs nous avons retenu la réaction de Dupouy.

BOURQUELOT (1896) a observé le premier que le suc des champignons colore en rouge brique une solution de gaïacol. DUPOUY (1897) a été le premier à utiliser cette réaction pour reconnaître la présence de la peroxydase dans le lait. A. MONVOISIN attire l'attention sur elle, accentuant qu'elle est plus sensible que l'acide vanadique pour la reconnaissance de l'eau oxygénée ajoutée au lait. Nous avons constaté que cette réaction présente de multiples avantages sur tous les réactifs proposés. Le réactif est stable, il est de préparation facile et très sensible si la réaction est exécutée dans les conditions que nous préciserons plus loin. En ce qui concerne la sensibilité, seulement le réactif d'Arakawa (1) le dépasse.

(1) Le réactif d'Arakawa se compose des réactifs suivants :

Le réactif A.

Résine de gaïac	0 gr. 3
Acide arsenieux	0 gr. 02
Acétate de soude + 3 H ₂ O	0 gr. 6
Alcool à 99°	q. s. à 100 cm ³

L'affirmation de M. POLONOWSKI et M. F. JAYLE [8], qu'il est soixante-huit fois plus sensible que le réactif au gaïacol est exagérée. La réaction s'exécute selon le mode suivant d'après notre technique : on mélange une quantité de lait (1-10 cm³) avec un volume égal de solution aqueuse de gaïacol à 2%. On ajoute 1-2 gouttes d'eau oxygénée à 0,5% sans mélanger. On voit apparaître immédiatement, ou après 1-2 minutes, à la partie supérieure de l'éprouvette une coloration rose saumon qui s'intensifie en devenant rouge brique. Par contraste avec le reste du liquide on perçoit très bien la coloration qui se communique à la masse entière par agitation. La concentration de l'eau oxygénée a un rôle capital dans la sensibilité de la réaction. Plus la quantité de peroxydase est réduite, plus cette influence est nette.

Si la quantité de peroxydase est petite et la concentration de l'eau oxygénée plus grande que 1%, la réaction peut être négative. La concentration de l'eau oxygénée utilisée d'habitude dans la réaction de Dupouy est de 3%, concentration trop grande surtout quand il s'agit de déceler des traces de peroxydase dans le lait pasteurisé. En plus, j'ai remarqué que la réaction pseudo-peroxydasique est au contraire plus intense avec les concentrations croissantes d'eau oxygénée.

Avec la concentration de 0,5% H₂O₂ la pseudo-réaction avec les traces des métaux lourds est très tardive, très faible ou peut même manquer.

La coloration rouge brique apparue disparaît assez rapidement, surtout si on mélange le contenu de l'éprouvette. Si on ajoute maintenant une autre goutte d'eau oxygénée 0,5% elle réapparaît de nouveau.

Réactif B.

Benzidine	1 gr.
Acétate de soude + 3 H ₂ O	1 gr. 36
Alcool à 99°	q. s. à 100 cm ³

Réactif C I (sans eau oxygénée).

Gayacol	1 gr.
Teinture vieille de valériane, digitale ou cantharide	1 cm ³
Acétone	q. s. à 100 cm ³

Réactif C II (avec eau oxygénée).

Comme C I, plus 0 cm³ 1 de perhydrol.

Pour préparer le réactif complexe d'Arakawa, on mélange parties égales de réactif A et B et sur une partie aliquote on ajoute un volume égal du réactif C I (réactif d'Arakawa I) ou C II (réactif II).

Pour effectuer la réaction de la peroxydase avec ces réactifs, on ajoute au-dessus de 1 cm³ de lait entier ou dilué 0 cm³ 25 du réactif. La présence de la peroxydase est révélée par une coloration bleue immédiate ou tardive.

Cette disparition et réapparition de la couleur se poursuit jusqu'à ce que la peroxydase soit inactivée par l'eau oxygénée.

La température à laquelle on effectue la réaction est celle du laboratoire (20°-25° C.). Entre 40° et 50° C. la réaction est instantanée.

L'acidification naturelle du lait diminue l'intensité de la réaction. Si le lait n'est pas trop vieux la neutralisation par la soude rétablit l'intensité de la réaction.

On remarque dans la réaction de Dupouy la disparition progressive plus ou moins rapide de la couleur rouge brique. Cette décoloration n'a pas reçu d'explication satisfaisante. A. MONVOISIN [9] l'attribue à la réductase. D'après les recherches de G. BERTRAND [10] la coloration rouge brique est due à la formation d'une quinone, la tétragaïaquinone, qui résulte de la deshydrogénation de quatre molécules de gaïacol. BERTRAND a constaté que ce produit de condensation insoluble dans l'eau, peu soluble dans l'alcool, soluble dans le chloroforme et l'acide acétique peut être réduit facilement avec la poudre de zinc en milieu acétique en tétrahydrogaïaquinone.

Nous avons pensé que cette réduction serait aussi possible par voie enzymatique au moyen de l'hydrogène activé par l'enzyme déshydrogénante de Schardinger. Dans ce but nous avons ajouté à 10 cm³ de lait avant d'effectuer la réaction de la peroxydase 0 cm³ 2 de solution de formol, 2% ou 0 cm³ 1 sol. 1/10^e aldéhyde benzoïque. Opérant à 50° C. pour accélérer l'action de l'enzyme de Schardinger, nous avons constaté, en contraste avec le lait sans aldéhyde, la disparition rapide de la coloration rouge brique de la tétragaïaquinone. L'explication qui s'impose est que la tétragaïaquinone est réduite par voie enzymatique en tétrahydrogaïaquinone suivant la réaction :

Dans le lait sans aldéhyde, la disparition de la couleur de la tétragaïaquinone doit être attribuée à un phénomène identique

provoqué par la réductase bactérienne (ou peut être par une réductase originaire du lait ?). La tétragaïaquinone serait donc un indicateur d'oxydo-réduction indiqué pour apprécier l'infection bactérienne du lait. Son potentiel normal d'oxydo-réduction plus grand que celui du bleu de méthylène permettrait l'appréciation du contenu bactérien du lait dans un délai plus court. D'après quelques observations préliminaires, un lait qui décolore le bleu de méthylène en 3 heures à 37° C. décolore la tétragaïaquinone en 10 minutes à la température ordinaire. Un lait très propre qui décolore le bleu de méthylène en plus de 7 heures à 37° C. décolore la tétragaïaquinone en 45 minutes à la température ordinaire.

Détermination du contenu en peroxydase du lait.

Indice peroxydasique

On peut démontrer aisément l'influence de l'eau oxygénée sur la peroxydase du lait.

Si dans la réaction de Dupouy on ajoute premièrement l'eau oxygénée, surtout si elle est plus concentrée que 1 %, et puis la solution de gaïacol, on constate que l'intensité de la couleur produite est plus faible.

Si dans la réaction de Dupouy, l'eau oxygénée est ajoutée par gouttes espacées, on constate que la couleur s'intensifie ou si elle est en voie de disparition elle réapparaît jusqu'à un moment donné. A ce moment l'adjonction d'eau oxygénée ou gaïacol en solution ne détermine plus aucune apparition de la couleur, donc la formation de la tétragaïaquinone est entravée. La seule explication est que le composé

devient stable, donc inactif, et la réaction peroxydasique est arrêtée.

Dans toutes les méthodes proposées jusqu'aujourd'hui pour le dosage de la peroxydase du lait, on met une quantité de sérum de lait en contact avec un excès d'eau oxygénée et le produit aminique ou phénolique donateur d'hydrogène. Comme l'eau oxygénée est une substance inhibitrice de la peroxydase on voit que les résultats obtenus ne peuvent être qu'approximatifs et variables selon le degré d'inactivation de la peroxydase.

De plus, pendant l'élimination des substances protéiques à l'aide des réactifs comme le sulfate d'ammonium, l'acétate de plomb, l'acide acétique, etc., on altère la structure intime de la peroxydase et une partie est adsorbée par les volumineux précipités formés (L. M. BURUIANA et V. CRISTESCU [11]).

Tenant compte de ces faits, j'ai établi une méthode assez simple pour le dosage de l'activité peroxydasique du lait.

Principe de la méthode. Le contenu en peroxydase d'un lait serait d'autant plus grand qu'il faudrait une dilution plus forte pour arrêter l'oxydation d'une solution de gaïacol. On appelle indice peroxydasique I_p l'expression :

$$I_p = \log \frac{1}{D} \cdot 100$$

dans laquelle, D = dilution limite pour laquelle la réaction peroxydasique est nulle. Un lait serait d'autant plus riche en peroxydase qu'il aurait un indice peroxydasique plus élevé.

Technique de dosage. Dans 10-20 éprouvettes de petites dimensions (10 mm. $\times$ 100 mm.) d'après l'intensité de la réaction qualitative, on met dans chacune 1 cm³ de solution tampon de phosphates de $pH = 7,6$ (sol. tampon-phosphate $pH-7,6$ obtenue en mélangeant 91 cm³ 5 sol. $PO_4 Na_2H$ m/15 et 8 cm³ sol. $PO_4 KH_2$ m/15). On ajoute dans la première éprouvette, 1 cm³ du lait à analyser et, après homogénéisation, on prend un centimètre cube et on le porte dans la deuxième éprouvette et ainsi de suite. Le dernier centimètre cube est rejeté. Nous avons une gamme de dilutions décroissantes comme il est indiqué plus bas. Dans chaque éprouvette on ajoute 1 cm³ sol. gaïacol 2% et 1-2 gouttes d'eau oxygénée 0,5% sans agiter. On attend 5 minutes et on observe la dernière éprouvette dans laquelle on perçoit nettement un anneau rouge. Le temps de formation de l'anneau rouge est presque le même dans toutes les éprouvettes à réaction positive, ce qui prouve encore une fois que par la méthode des dilutions la peroxydase ne subit aucune altération comme dans le cas des autres méthodes proposées.

On note la dilution pour laquelle la réaction est nettement positive et à l'aide du tableau II on lit directement l'indice I_p .

Exemple. Soit l'éprouvette n° 11 dans laquelle on perçoit encore l'anneau rouge brique, la dilution maximum pour une réaction positive serait donc : $D = 1/2048$.

$$\log \frac{1}{D} = \log 1 - \log D = 3,31133.$$

$$I_p = 3,31133 \times 100 = 331.$$

Les avantages de cette méthode sont multiples en comparaison avec les autres proposées jusqu'à présent :

1. Elle conserve l'intégrité du ferment.

TABLEAU II
DÉTERMINATION DE L'INDICE PEROXYDASIQUE

Eprouvette N°	Dilution D	$\log \frac{1}{D}$	Indice peroxyda. Ip
1	1/2	0,30103	30
2	1/4	0,60206	60
3	1/8	0,90309	90
4	1/6	1,20412	120
5	1/32	1,50515	150
6	1/64	1,80618	180
8	1/128	2,1072	210
9	1/512	2,40824	240
10	1/1024	3,01030	270
11	1/2048	3,31133	331
12	1/4096	3,61236	361
13	1/8192	3,91339	391
14	1/16384	4,21431	421
15	1/32768	4,51534	451
16	1/65536	4,81644	481
17	1/131072	5,11760	511
18	1/262144	5,41847	541
19	1 524288	5,71950	571
20	1/1048516	6,02036	602

2. Elle nécessite une très petite quantité de lait, 1 cm³ tout au plus.

3. Appareils et réactifs très simples et facilement accessibles.

4. Exécution rapide permettant le dosage en série même à l'étable.

5. Résultats facilement exprimables et faisant très bien image croissant avec la quantité de peroxydase du lait.

Dans le tableau III je donne quelques résultats obtenus à l'aide de cette méthode avec des laits de différentes espèces animales.

TABLEAU III
INDICE PEROXYDASIQUE DU LAIT DE QUELQUES ESPÈCES ANIMALES

Numéros	Femme	Bufflesse	Vache	Brebis	Jument
1	0	451	301	180	120
2	361	451	301	270	0
3	240	391	301	180	0
4	0	451	301	301	180

Tableau III (suite)

Numéros	Femme	Bufflesse	Vache	Brebis	Jument
5	0	451	331	180	0
6	0	391	301	180	0
7	30	481	331	90	0
8	361	391	270	270	0
9	60	421	301	240	0
10	0	602	331	180	0
11	150	451	331	120	90
12	120	391	301	210	0
13	120	391	240	270	0
14	180	451	240	150	0
15	120	451	240	270	0
16	180	421	270	210	0
17	180	421	240	210	0
18	0	391	270	240	0
19	30	421	301	210	0
20	150	391	270	210	0
21	0	421	270	240	0
22	0	391	240	331	0
23	0	301	270	270	0
24	0	331	210	301	60
25	0	270	180	331	0
26	0	270	150	361	0
27	0	270	210	331	0
28	0	240	301	270	0
29	60	301	270	240	0
30	0	270	270	240	60
31	120	270	270	210	0
32	0	240	331	270	0

On remarque d'après ce tableau que le lait de bufflesse est le plus riche en peroxydase et le lait de jument le plus pauvre.

Dans une autre série de dosages, nous avons employé le réactif d'Arakawa, au lieu du réactif de Dupouy pour le dosage par la méthode des dilutions de l'indice peroxydasique. La technique de dilution est la même, mais au lieu de la solution de gaïacol et d'eau oxygénée on ajoute 0 cm³ 25 du réactif d'Arakawa II. Les résultats obtenus pour le lait de vache en comparaison avec le réactif de Dupouy sont indiqués dans le tableau IV.

On voit d'après ce tableau que le réactif d'Arakawa est plus sensible que le réactif au gaïacol seul, mais il est plus sujet que celui-ci

TABEAU IV
INDICE PEROXYDASIQUE DE LAIT DE VACHE DÉTERMINÉ AVEC
LE RÉACTIF D'ARAKAWA II ET AVEC LE RÉACTIF DE DUPOUY

Numéros	Indice peroxydasique	
	Réactif de Dupouy	Réactif d'Arakawa II
1	301	541
2	210	421
3	240	391
4	240	391
5	210	391
6	240	240
7	270	391
8	210	391
9	210	361
10	240	361
11	240	451
12	270	361
13	270	331
14	270	361
15	301	451
16	240	331
17	301	301
18	301	361
19	301	391
20	210	270

à être influencé par d'autres facteurs que la peroxydase, de sorte que les résultats ne sont pas toujours comparables.

La méthode par dilution est la méthode de choix pour le dosage de la peroxydase dans les laits pauvres en cette enzyme. En utilisant la méthode proposée par I. ANTONOFF [12] pour le lait de vache (1), j'ai constaté que le sérum de lait de femme et de jument sont complètement aperydasiques quoique le lait non déféqué donne intensément la réaction de Dupouy. La peroxydase était précipitée avec les protéines lors de la défécation sulfo-ammonique comme nous l'avons déjà soupçonné.

Conclusions

Dans le présent travail, on étudie les facteurs qui influencent la réaction de Dupouy pour l'identification de la peroxydase du lait.

(1) A 10 cm³ de lait on ajoute 2 gr. de sulfate d'ammonium solide. On agite jusqu'à dissolution du sulfate et on filtre. On dilue le sérum quatre fois avec de l'eau et on lit au photo-colorimètre la couleur obtenue avec le réactif d'Ilzhöfer [13], à l'orthotoluidine.

La concentration de l'eau oxygénée en particulier joue un rôle capital.

La disparition de la couleur rouge brique qui prend naissance dans cette réaction est due à la transformation du tétragaïaquinone formé en tétrahydrogaïaquinone incolore par réduction enzymatique comme nous avons pu le démontrer. Le système redox : « tétragaïaquinone-tétrahydrogaïaquinone » peut se prêter très bien à l'appréciation du pouvoir réducteur d'un lait.

Le potentiel de réduction étant plus positif que celui du bleu de méthylène on peut préciser le degré d'infection bactérienne d'un lait d'avance et plus rapidement.

On peut doser la quantité de peroxydase d'un lait à l'aide de la réaction de Dupouy selon une méthode très simple, par dilutions progressives.

Je propose la notion d'indice de peroxydase I_p qui est le produit du logarithme de l'inverse de la dilution maximum qui donne encore la réaction de Dupouy, multiplié par 100, c'est-à-dire :

$$I_p = \log \frac{1}{D} \times 100$$

Les avantages de cette méthode sont nombreux en comparaison avec les méthodes proposées jusqu'à présent.

A l'aide de cette méthode, j'ai déterminé l'indice peroxydasique du lait de quelques espèces animales. Le lait de bufflesse a l'indice le plus grand et le lait de jument le plus petit des laits étudiés.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] H. KREKER. *Beitrage zum Nachweis der Milcherhitzung*. L. Parey, 1939.
- [2] J. PIEN. *Le Lait*, t. XXV, 249-250, 311, 1945.
- [3] VAN BOUMA et DAM. *Biochem. Z.*, 12, 385, 1918.
- [4] G. THIEULIN et R. VUILLAUME. *Eléments pratiques d'analyse et d'inspection du lait*. 2^e édition. Paris, 1948.
- [5] K. I. DEMETER et R. STEUDE. *Milchwirth. Forsch.*, 19, 122, 1937.
- [6] G. FAILLA. *Le Lait*, t. CLXXXV, 455, 1939.
- [7] T. ARAKAWA. *Journal of Ex. Med.*, 16, 83, 90, 107, 1930.
- [8] M. POLONOWSKI et M. F. JAYLE. *Bull. Soc. Chimie Biol.*, 21, 68, 1939.
- [9] A. MONVOISIN. *Rec. Med. Vet.*, 812, 385, 1905.
- [10] G. BÉRTRAND. *Bull. Sc. Pharmacol.*, 19, 15, 1904.
- [11] L. BURUTANA et V. CRISTESCU. *Cercetări exp. asupra peroxidasei din laptele câtorva specii de animale*, 1941.
- [12] I. ANTONOFF. *Zeitsch. Fleisch. u. Milchhygiene.*, 10, 184, 1939.
- [13] ILZHÖFER. *Arch. f. Hygiene*, 105, 319, 1939.