- [5] PIEN. Production biologique des substances concourant à la formation de l'arôme du beurre. *Le Lait*, juillet-août 1948.
- [6] LEMOIGNE, SANCHEZ et MILLET. Recherche sur l'arôme des beurres. *Comptes rendus de l'Académie d'Agriculture de France*, 15 mars 1950.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA LIPASE DU LAIT

par

M. LONCIN et D. JACQMAIN

Chaire de Laiterie, Matières grasses et Conserves à l'Institut National des Industries de Fermentation

Il est remarquable de constater que n'importe quelle cellule vivante possède toujours en elle tous les éléments nécessaires à sa disparition. Ces éléments portent le nom de diastases lytiques et accomplissent normalement le travail de catabolisme de la cellule.

Pour que la vie soit possible, il faut un équilibre constant entre le catabolisme (ensemble des phénomènes de destruction) et l'anabolisme (ensemble des phénomènes de synthèse). Cet équilibre est appelé métabolisme.

Une rupture de cet équilibre se manifeste par la prédominance de l'activité des diastases lytiques et se termine par la mort de la cellule.

Cette rupture d'équilibre peut avoir deux origines différentes : l'une, naturelle, survient sans raison exactement connue, c'est la mort naturelle ; l'autre est artificielle et de source déterminée, par exemple en blessant la cellule et en mettant de ce fait les enzymes lytiques en présence de leurs substrats. On sait d'ailleurs que lorsqu'on blesse une matière vivante (un fruit par exemple), son coefficient respiratoire augmente et qu'il en est de même lors de la mort naturelle.

La diastase lytique qui nous intéresse dans ce travail est la lipase.

On la classe dans les hydrolases parmi celles qui sont appelées estérases. Elle effectue l'hydrolyse des lipides en acides gras libres et en glycérol. On constate par exemple, que les fruits de palme qui sont blessés donnent une huile dont le pourcentage en acides gras libres est beaucoup plus élevé que celle fournie par les fruits intacts ; c'est la lipase du fruit de palme qui en est responsable.

Dans la plupart des cas, pour étudier la lipase d'un organisme quelconque, il est nécessaire de toucher à l'intégrité de la cellule ce qui déclenche immédiatement la lipolyse.

Il y a cependant des substances de structure non cellulaire,

mais dans lesquelles on trouve tout comme dans les cellules, d'une part les globules gras et d'autre part, l'enzyme lipolytique. Dans le lait par exemple, au repos et à l'état frais, la lipase et son substrat subsistent côte à côte à l'extérieur de la cellule sans qu'il y ait lipolyse. Cette lipolyse peut toutefois se déclancher et ce mécanisme présente dans certains cas, une grande importance pour la laiterie ou pour le traitement du lait de femme. Nos essais ont porté en grande partie sur le lait de femme, produit pour lequel l'action lyasique est très nette.

C'est ainsi que ENGEL [1] et ENFINGER [2] ont remarqué que lorsque du lait de femme était agité, il y avait une forte augmentation de l'acidité titrable, tandis que dans du lait de vache, elle ne varie pratiquement pas.

DAVIDSSOHN [3] a montré que par formation d'acides gras libres et par conséquent de leurs savons, se produit dans le lait de femme un fort abaissement de tension superficielle.

BEHRENDT [4] a réexaminé le problème. Il fait remarquer que seul le lait de femme contenant de la matière grasse s'acidifie. Et se basant sur le fait que DAVIDSSOHN [3] avait montré que le lait de femme est riche en lipase, il estime qu'il se produit par agitation, une activation de la lipase et une augmentation de la vitesse d'hydrolyse de la matière grasse, produisant une augmentation de l'acidité titrable, par formation d'acides gras libres.

Il montre que si le lait a été chauffé pendant deux heures avant agitation à 50-51° C., l'acidification est fortement diminuée, à partir de 53° C., elle devient nulle. Dans cette étude nous avons essayé de mettre en lumière, le mode d'action de la lipase, et dans ce but nos expériences ont porté en grande partie sur le lait de femme, substrat qui s'est révélé idéal.

Techniques utilisées

Nous avons toujours eu recours au même processus de travail, c'est-à-dire, placer le lait dans certaines conditions expérimentales, déterminer l'acidité originelle totale, ou soluble dans des solvants organiques, soumettre le lait à l'agitation et, après avoir laissé la lipase agir, déterminer la ou les acidités finales, que l'on comparait à un témoin.

La différence acidités finales-acidités initiales, est dans certaines conditions la conséquence du travail lyasique.

L'acidité initiale a différentes origines. A l'état frais, le lait consomme toujours, avant d'arriver au virage de la phénolphthaleïne, une certaine quantité de soude correspondant à son tamponnement. Pour le lait de femme, cette consommation s'élève en moyenne à 3° Dornic, c'est-à-dire à 0 cm³ 3 de NaOH N/9 pour 10 cm³ de lait,

et pour le lait de vache à 16° Dornic, soit 1 cm³ 6 de NaOH N/9 pour 10 cm³ de lait.

Si l'acidité initiale dépasse cette valeur, cela peut être dû, soit à de l'acide lactique formé par des microorganismes infectant le lait, soit à des acides gras libres, formés par hydrolyse. Après agitation et si l'on accorde à la lipase un temps suffisant pour lui permettre d'agir, l'augmentation de l'acidité peut être due, soit à la lipolyse, soit à l'action des microorganismes, soit à ces deux causes réunies.

L'agitation

Suivant les conditions expérimentales, nous avons choisi entre deux procédés d'agitation :

- 1° A l'aide du Microïde flask Shaker ;
- 2° A l'aide du Turmix, Mixblender, Waringblender ou tout autre appareil de ce genre.

Le Microïde flask Shaker est un appareil à secouer. Quatre pinces à ballons sont fixées sur un arbre relié à un moteur à l'aide d'un excentrique. Les pinces-à-ballons sont animées d'un mouvement alternatif, que l'on peut accélérer ou ralentir au moyen d'un rhéostat. Aux pinces-à-ballons, on fixe des tubes de centrifugeuse convenablement bouchés et contenant une quantité déterminée de lait. L'agitation est maintenue à un rythme rapide pendant un temps standard de quelques heures. Puis on procède immédiatement à la détermination de l'acidité.

Le Turmix est un appareil composé essentiellement d'un récipient en verre au fond duquel une petite hélice tourne à très grande vitesse. La quantité minimum nécessaire pour avoir une agitation convenable est de 100 cm³ environ. On agite pendant un temps standard, généralement de trois minutes, de façon à ne pas avoir un échauffement exagéré. La température passe de 0 à 25° C. environ, en 3 minutes. Après agitation, on laisse agir l'enzyme pendant un temps déterminé, puis on recherche l'acidité sur une prise.

Détermination de l'acidité

Il y a plusieurs moyens de déterminer les variations d'acidité d'un lait.

Dans le but que nous poursuivons, chacun d'eux présente des avantages et des inconvénients.

1° pH. Le tamponnement du lait a une grande importance et si l'on compare le pH à l'acidité titrable, on constate que pour un pH final relativement voisin, le lait de vache consomme environ quatre fois plus de soude caustique que le lait de femme.

La mesure du pH ne nous donne donc pas une idée exacte de

l'acidification qui se produit dans le lait et c'est pourquoi, bien que cette méthode soit facile et rapide, nous ne l'avons presque jamais utilisée.

2° La titration directe du lait entier : c'est la méthode industrielle de détermination de l'acidité d'un lait. Elle s'exprime souvent en degré Dornic, nombre de dixième de centimètre cube de soude caustique N/9 nécessaire pour neutraliser 10 cm³ de lait en présence de phénolphthaléine.

Un degré Dornic correspond à 10 milligrammes d'acide lactique. Ce procédé est rapide mais dose l'acidité totale du lait aussi bien dans le lait écrémé que dans la crème.

3° Titration directe du lait écrémé et de la crème après centrifugation.

Permet de déterminer l'acidité totale du lait écrémé et celle de la crème. 10 cm³ de lait sont centrifugés et l'on pipette 5 cm³ de lait écrémé de la couche inférieure qu'on titre par la soude caustique, en présence de phénolphthaléine. On titre ensuite de la même manière, les 5 cm³ restants qui contiennent du lait écrémé et la crème.

La quantité de soude consommée par le lait écrémé est donnée par la formule suivante :

$$A + \frac{A(50D-G)}{50D}$$

La quantité de soude consommée par la crème est donnée par :

$$B - \frac{A(50D-G)}{50D}$$

dans lesquelles :

A = la quantité de soude caustique consommée par les 5 cm³ de lait écrémé de la couche inférieure.

B = la quantité de soude caustique consommée par les 5 cm³ restants qui contiennent du lait écrémé et la crème.

G = le pourcentage de matière grasse du lait (déterminé par la méthode Gerber).

D = la densité moyenne de la matière grasse (0,94).

La somme des deux acidités, celle de la crème et celle du lait écrémé, doit être égale à celle du lait entier.

Cette méthode permet de distinguer dans quelles proportions la crème ou le lait écrémé varie d'acidité l'un par rapport à l'autre. Cependant c'est toujours l'acidité totale que l'on titre. On ne fait pas de distinction entre l'acidité apparente due au tamponnement, l'acide lactique et les acides gras libres. De plus une certaine proportion d'acides gras libres, surtout ceux à courtes chaînes, sont

solubles dans l'eau et passent donc dans le lait écrémé où ils sont titrés comme acide lactique.

C'est pourquoi nous avons commencé à mettre au point une méthode d'extraction des acides gras libres qui donnait de bons résultats.

Lorsque parut la méthode d'extraction préconisée par B. G. JOHNSON et I. A. GOULD [5], nous avons appliqué cette méthode dans son principe et elle nous a donné entièrement satisfaction.

4^o Extraction des acides gras libres et titration de l'extrait : nous opérons sur le lait entier lui-même ou sur la crème séparée par centrifugation. Dans ce dernier cas, il faut évidemment admettre que les acides gras libres solubles dans l'eau seront perdus par élimination du lait écrémé.

L'extraction se fait avec un solvant dont la composition a été déterminée par GOULD et JOHNSON. Ils ont estimé que l'extraction était la meilleure, lorsqu'on utilisait un mélange de 60 % d'éther de pétrole (30-60°) et de 40 % d'éther éthylique.

Il est cependant indispensable d'avoir une concentration en éthanol, voisine de 50 % dans le lait ou la crème, avant d'extraire par le solvant sous peine de ne pouvoir résoudre l'émulsion par centrifugation. Dans le cas où malgré cette concentration en alcool, on n'aurait pas une séparation des deux phases lors de la centrifugation, il suffirait d'acidifier par H^2SO^4 et de centrifuger pour casser l'émulsion.

Mode opératoire : 10 cm³ de lait (ou la crème provenant de 10 cm³ de lait) sont additionnés d'un même volume d'alcool à 94° G. L.

On agite pendant 2 minutes. Puis on ajoute 5 cm³ de solvant (60 % d'éther de pétrole ou d'hexane et 40 % d'éther éthylique). On agite pendant 5 minutes. L'émulsion est alors brisée par centrifugation. On pipette une partie aliquote des 5 cm³ de la couche surnageante de solvant et on y additionne 10 cm³ d'éthanol. On chauffe doucement ce mélange au bain-marie jusqu'à ne plus avoir qu'une seule phase. On titre à la soude caustique en présence de phénolphaléine. Le virage est extrêmement net.

Cette méthode permet de titrer séparément les acides gras libres, l'acide lactique et l'acidité due au tamponnement n'étant pas extraite par le solvant.

En appliquant ce procédé et la titration directe de l'acidité totale du lait entier, nous avons pu estimer le degré de lipolyse dans des laits acides de femme. Voici par exemple, les résultats obtenus sur 10 échantillons de lait de femme qui sont arrivés acidifiés au Lactorium de l'Œuvre Nationale de l'Enfance de Bruxelles, le

13 décembre 1949. Certains de ces échantillons étaient congelés, d'autres ne l'étaient pas.

Echantillons (du 12-12-1949) (Provenance)	Acidité en degrés Dornic			Acidité due à la lipolyse en % de l'acide total — l'acidité due au Tampon- nement (%)
	Acidité totale	Acidité totale — Tampon- nement (3° Dornic)	Acidité due à la lipolyse	
1. Bruxelles	11	8	5,5	67
2. Bruxelles	16	13	9	62
3. Malines	17	14	13	93
4. Anvers (non congelé) .	15	12	11	92
5. Anvers (non congelé) .	12,5	9,5	5,5	58
6. Anvers (congelé)	16	13	12,5	96
7. Anvers (congelé)	9	6	6	100
8. Anvers (congelé)	22	19	16	84
9. Turnhout (congelé) ..	21	18	15	83
10. Turnhout (congelé) ..	16	13	9	62

On peut donc dire que les échantillons 3, 4, 6 et 7 ont été entièrement acidifiés par la lipase, les échantillons 1, 8 et 9 ne l'étaient qu'à raison de 75 % et les échantillons 2, 5 et 10, à raison de 50 %. Les 25 et 50 % restants de l'acidification sont produits par les micro-organismes.

De plus, ces chiffres nous montrent que la congélation n'a pas d'influence marquée sur les acidités lipolytiques obtenues. Nous voyons en effet un lait congelé [7], faire 100 % d'acidité lipolytique tandis que, un lait non congelé [5] ne fait que 50 % d'acidité lipolytique.

Numération des microorganismes dans le lait

Les numérations ont été effectuées suivant la méthode NEWMANN-LAMPERT [6], que nous avons légèrement modifiée. Le procédé que nous utilisons est le suivant : sur une lame de microscope bien dégraissée et tarée, on dépose à l'aide d'un fil de platine environ 10 milligrammes du lait à examiner. On l'étend sur une surface d'exactly 1 cm². On pèse immédiatement et on soustrait la tare de manière à connaître le poids exact de lait déposé. On laisse sécher et on colore en trempant pendant 5 minutes la lame dans un colorant qui dégraisse la préparation, fixe et colore les microorganismes. Ce colorant se compose de :

1 à 2 grammes de bleu de méthylène (en poudre).

54 cm³ d'alcool éthylique.

40 cm³ de tétrachloréthane.

5 cm³ d'acide acétique glacial.

Pour le préparer, on ajoute l'alcool au tétrachloréthane et on chauffe à 70° C. Le bleu de méthylène est dissout dans le mélange chaud. On laisse refroidir et on ajoute l'acide acétique glacial et on filtre.

On laisse sécher le colorant sur la lame puis on lave à l'eau pour enlever l'excès. On laisse sécher et on examine au microscope à l'immersion.

On utilise un oculaire muni d'un micromètre quadrillé, préalablement étalonné avec un micromètre objectif.

On sait ainsi exactement quelles sont les dimensions de la portion de champ vue à travers un des petits carrés du micromètre oculaire.

On compte pour de nombreux champs le nombre de micro-organismes par carré. On ramène ce chiffre à 1 cm² et on le traduit en nombre de microorganismes par gramme de lait.

Nous avons adopté pour le comptage, la convention suivante : chaque individu d'une chaîne est compté comme s'il était isolé.

Résultats expérimentaux

I. Influence de l'agitation sur le lait de femme.

Notre premier soin en nous attaquant à ce travail fût de vérifier si les affirmations de ENGEL [1], ENFINGER [2] et BEHRENDT [4], concernant l'acidification du lait de femme par simple agitation étaient exactes.

10 cm³ de lait de femme ont été agités violemment pendant cinq heures au Microïd Flask Shaker, tandis qu'un témoin était maintenu au repos pendant le même temps. Après agitation, les acidités déterminées par titration directes du lait entier étaient les suivantes :

1. Lait agité : 2 cm³ 5 de NaOH N/10 ou 22°3 Dic.

2. Lait non agité : 0 cm³ 45 de NaOH N/10 ou 4° Dic.

On voit donc qu'en effet l'agitation provoque une forte acidification du lait de femme qui est environ cinq fois plus acide que le témoin.

II. Influence d'un refroidissement préalable sur l'acidification.

Etant donné que certains enzymessont, dans le lait, fixés sur la surface des globules gras, nous avons voulu vérifier s'il n'en est pas

de même pour la lipase. Pour cela, 10 cm³ de lait de femme sont refroidis à la glacière dans un bain de glace fondante, pendant trente minutes, puis sont violemment agités au Shaker pendant cinq heures. Dix autres centimètres cubes de lait de femme sont, sans refroidissement préalable, agités pendant cinq heures au Shaker. Deux tubes témoins de 10 cm³ de lait de femme sont laissés en repos, l'un à la température ambiante et l'autre à la glacière pendant cinq heures également.

Les acidités après agitation sont les suivantes :

1. Lait refroidi puis agité : 2 cm³ 7 NaOH N/10 ou 24° 3 Dornic.
2. Lait agité (sans refroidissement) : 2 cm³ 5 NaOH N/10 ou 22° 3 Dornic.
3. Témoin (5 h. à temp. ambiante) : 0 cm³ 45 NaOH N/10 ou 4° Dornic.
4. Témoin (5 h. à la glacière) : 0 cm³ 35 NaOH N/10 ou 3° Dornic.

Ces résultats montrent donc qu'un refroidissement préalable du lait n'a pas d'influence sur l'acidification, les différences rentrant dans les limites d'erreurs possibles.

III. Les acides produits sont-ils solubles dans l'eau ?

L'acide lactique, qui est produit dans le lait par les *Streptococcus lactis*, est soluble dans l'eau. Les acides gras ne sont pas solubles dans l'eau sauf ceux à courtes chaînes. La proportion d'acides se trouvant dans le lait écrémé et dans la crème après agitation, nous renseignera donc sur le genre d'acides produits car les glycérides à courtes chaînes sont en quantités relativement faibles dans le lait. Si donc la crème est plus acide que le lait écrémé, c'est que l'acidification produite par l'agitation du lait de femme est d'origine lipasique. Dans le cas contraire elle serait due aux microorganismes.

La crème et le lait écrémé devront donc être titrés séparément.

On agite violemment au Shaker pendant cinq heures à la température ambiante, 10 cm³ de lait de femme. Un témoin est laissé au repos.

Après agitation, l'acidité est déterminée sur 5 cm³ de lait écrémé, séparé par centrifugation et sur 5 cm³ de crème et de lait écrémé.

L'acidité a été également déterminée de la même manière, sur le lait frais, avant agitation.

1. Lait frais :

A = 0 cm³ 2 de NaOH N/10 pour 5 cm³ de lait écrémé.

B = 0 cm³ 21 de NaOH N/10 pour 5 cm³ de crème et de lait écrémé.

G = 5,75 % de matière grasse (déterminée par la méthode Gerber).

D = 0,94 (densité moyenne de la matière grasse).

La matière grasse occupe un volume de $\frac{0,575}{0,94} = 0 \text{ cm}^3 6$.

Soit pour :

9 cm³ 4 de lait écrémé : $A + \frac{A(50D-G)}{50D} = 0 \text{ cm}^3 376$ de NaOH N/10
ou 3°6 Dornic.

0 cm³ 6 de crème : $B - \frac{A(50D-G)}{50D} = 0 \text{ cm}^3 034$ de NaOH N/10
ou 5°1 Dornic.

10 cm³ de lait entier : 0 cm³ 41 de NaOH N/10 ou 3°7 Dornic.

2. Lait après agitation :

A = 1 cm³ 47 de NaOH N/10 pour 5 cm³ de lait écrémé.

B = 2 cm³ 36 de NaOH N/10 pour 5 cm³ de crème et de lait écrémé.

Soit pour :

9 cm³ 4 de lait écrémé : 2 cm³ 72 de NaOH N/10 ou 26° Dornic.

0 cm³ 6 de crème : 1 cm³ 11 de NaOH N/10 ou 34°5 Dornic.

10 cm³ de lait entier : 3 cm³ 83 de NaOH N/10 ou 34°5 Dornic.

3. Témoin (après 5 heures) :

A = 0 cm³ 35 NaOH N/10 pour 5 cm³ de lait écrémé.

B = 0 cm³ 42 NaOH N/10 pour 5 cm³ de crème et de lait écrémé.

Soit pour :

9 cm³ 4 de lait écrémé : 0 cm³ 66 de NaOH N/10 ou 6°3 Dornic.

0 cm³ 6 de crème : 0 cm³ 11 de NaOH N/10 ou 1°1 Dornic.

10 cm³ de lait entier : 0 cm³ 77 de NaOH N/10 ou 7°4 Dornic.

Ces chiffres nous montrent que l'augmentation d'acidité par agitation dans le lait de femme se produit surtout dans les matières grasses.

Les acides produits sont donc en majorité insolubles, ce sont vraisemblablement des acides gras à chaîne moyenne ou longue.

En effet, la crème du lait agité est environ dix fois plus acide que celle du témoin, alors que le lait écrémé ne l'est que quatre fois plus.

Cependant nous constatons aussi que le témoin a doublé d'acidité par rapport au lait frais, mais dans ce cas l'augmentation d'acidité dans la crème est à peine plus forte que dans le lait écrémé. Les acides produits sont solubles et proviennent peut-être ainsi que dans le lait écrémé agité d'un développement de microorganismes.

IV. Les acides produits par l'agitation du lait de femme sont bien des acides gras libres.

Etienne GOIFFON [7] a proposé une méthode de dosage des acides gras libres non saturés par colorimétrie qui est basée sur le fait suivant :

Une solution de bleu de Nil (chlorure ou sulfate), vire du bleu au rouge par addition de CO^3Na^2 saturé, sauf si elle contient des traces d'acides gras libres non saturés, comme par exemple l'acide oléique.

D'après le travail de GOIFFON, nous avons mis au point, une technique de coloration microscopique dans le but de montrer que ce sont bien des acides gras qui sont libérés par agitation dans le lait de femme.

Nous avons procédé de façon suivante : on centrifuge du lait de femme acidifié par agitation. On sépare la crème et on la remet en suspension dans un volume de solution de bleu de Nil à 0,5‰, égal à celui du lait écrémé. Après un temps d'action de 5 minutes environ, on centrifuge à nouveau, on sépare la crème colorée en bleu et on la lave à l'eau physiologique.

On ajoute à la crème un volume de CO^3Na^2 à 20 %, identique à celui du lait écrémé. On laisse agir 5 minutes et on sépare à nouveau la crème que l'on examine au microscope. On constate que certains globules gras sont roses, mais que d'autres sont bleus, particulièrement ceux qui semblent avoir été endommagés par l'agitation. Il y a donc dans ces globules, des acides gras libres, non saturés qui proviennent de l'hydrolyse des glycérides par la lipase.

V. Rapport entre la population bactérienne et l'acidification en fonction du temps.

Nous avons vu plus haut (III) que des acides solubles dans l'eau étaient produits en même temps, bien qu'en quantités moindres que les acides gras libres, insolubles dans l'eau.

Ces acides solubles sont vraisemblablement constitués en grande majorité par de l'acide lactique produit par des microorganismes. C'est pourquoi nous avons suivi l'augmentation de l'acidité et de la population microbienne dans du lait de femme agité et dans un témoin pendant soixante-cinq heures.

Nous avons opéré sur un lait particulièrement frais et prélevé le plus aseptiquement possible, de manière à n'avoir qu'une population microbienne très réduite au départ.

L'acidité a été déterminée sur le lait entier par titration directe.

Les numérations de microorganismes ont été faites par la méthode directe (voir tableau suivant).

Une première constatation se fait immédiatement par l'examen de ce tableau. L'acidification se fait au début, dans le lait agité, sans qu'il y ait une notable prolifération bactérienne. Cette phase est suivie d'un palier puis il y a une nouvelle acidification qui se fait en même temps qu'une considérable augmentation de la population microbienne. Il est encore à remarquer que l'une et l'autre phase

Heures	Lait agité		Témoin	
	Acidité en cm ³ NaOH N/10. % cm ³ de lait	Numération en million/gr. de lait	Acidité en cm ³ de NaOH N/10 % cm ³ de lait	Numération en million/gr. de lait
0	5,5	—	5,5	—
1	15,5	—	6,1	—
3	23,3	—	7,7	—
7	25,5	—	9,4	—
11	25,5	—	9,4	—
17	28,9	54	10,5	64
26	37,2	4.400	15,0	950
41	81,6	7.700	34,4	5.370
50	57,2	14.400	30,6	3.322
65	113,3	—	38,5	8.700

sont influencées par l'agitation. En effet l'agitation est indispensable à la première et favorise fortement la seconde. Cela peut s'expliquer de la manière suivante :

La première phase est une acidification par lipolyse avec production d'acides gras libres et la lipase serait « révélée » par l'agitation du lait de femme. La seconde phase de l'acidification est une phase bactérienne avec production d'acide lactique. On suppose que l'agitation favorise fortement la prolifération microbienne en cassant les chaînes de streptocoques dont chaque microorganisme se reproduit, tandis que dans une chaîne non rompue, la croissance ne se fait que par les deux bouts.

On voit donc la nécessité d'opérer sur le lait aussi frais que possible et de produire des acidifications rapides de manière à éliminer l'influence des microorganismes.

C'est dans ce but que nous avons utilisé un procédé d'agitation beaucoup plus violent que le Shaker et ceci pendant un temps très court suivi d'une période de repos, suffisante pour permettre à la diastase d'agir.

VI. Acidification du lait de femme par agitation très violente et brève, suivie d'un repos et comparaison avec le lait de vache, ayant subi le même traitement.

On utilise comme moyen d'agitation, le Turmix dans lequel on traite pendant 3 minutes (chronomètre) 100 cm³ de lait frais et refroidi à 0° C., environ. Après traitement, la température du lait est d'environ 25° C. On laisse reposer le lait à 25° C. pendant

deux heures, puis on mesure l'acidification. Ainsi on élimine l'influence de l'agitation continue qui, nous l'avons vu, favorise la prolifération microbienne.

On a fait un examen microscopique des globules gras du lait tel quel et du lait passé au Turmix.

En parallèle, les mêmes essais ont été effectués sur le lait de vache.

L'augmentation d'acidité a été déterminée par titration directe du lait écrémé et du lait écrémé avec crème.

Le lait de femme frais avait une teneur de 4,4 % de matières grasses, soit un volume de $\frac{0,44}{0,94} = 0 \text{ cm}^3 47$ dans 10 cm^3 de lait.

Le lait de vache frais (prélevé directement en flacon stérile) avait 3 % de matières grasses, occupant un volume de $\frac{0,3}{0,94} = 0 \text{ cm}^3 31$ dans 10 cm^3 de lait.

Après passage au Turmix, les globules gras présentaient un aspect légèrement différent de ceux du lait tel quel. Il y avait un plus grand nombre de gros globules et certains n'étaient plus sphériques mais semblaient déchiquetés.

Heures	Acidité en centimètres cubes de NaOH N/10, pour 10 cm^3 de lait							
	Lait de femme				Lait de vache			
	Témoin		Lait passé au Turmix		Témoin		Lait passé au Turmix	
	Lait écrémé	Crème	Lait écrémé	Crème	Lait écrémé	Crème	Lait écrémé	Crème
0	0,53	0,05	0,53	0,05	1,83	0,12	1,83	0,12
$\frac{1}{2}$. . .	0,58	0,03	0,95	0,49	1,94	0,175	2,04	0,12
1 $\frac{1}{2}$. . .	0,53	0,08	1,01	0,52	2,15	0,02	2,15	0,07
3 $\frac{1}{2}$. . .	0,58	0,17	1,01	0,63	2,15	0,07	2,37	0,13
7 $\frac{1}{2}$. . .	0,635	0,20	1,06	0,75	2,15	0,1	2,58	0,31
21 $\frac{1}{2}$. . .	0,635	1,09	0,95	0,88	3,	4,95	3,38	6,01
23 $\frac{1}{2}$. . .	1,27	1,73	1,69	1,24	9,035	1,465	11,08	0,2

Ces chiffres montrent que seule la crème du lait de femme passé au Turmix s'acidifie rapidement, dès les premières trente minutes. Mais par la suite elle s'acidifie de la même manière que la crème du témoin et du lait de vache. Cette dernière acidification atteint d'ailleurs une valeur beaucoup plus élevée et est proportionnelle à l'augmentation de la population microbienne.

L'acidification du lait de femme qui a été agité se fait donc en

deux stades successifs. Le premier stade est très rapide et se fait en moins d'une demi-heure mais s'arrête à un palier. Il est dû à la lipase. Le second est causé par les microorganismes qui se développent dans le lait.

Dans le lait non agité et dans le lait de vache, le premier stade ne se produit pas. Dans le lait de vache, il y a vraisemblablement trop peu de lipase pour qu'elle soit mise en évidence par ce procédé.

La limite de l'acidification lipolytique, premier stade, à laquelle on arrive est vraisemblablement proportionnelle au nombre de globules gras démolis par l'agitation.

VII. Influence de la durée de l'agitation sur le degré de l'acidification lipolytique.

Plus l'agitation du lait dans le Turmix sera longue, plus le nombre de globules gras démolis sera élevé. On soumet 100 cm³ de lait de femme à des durées d'agitation au Turmix, de plus en plus longues. Des prises sont faites après chaque agitation et sont titrées après un repos d'une demi-heure à 25° C. par titration directe du lait entier.

Durée de l'agitation en seconde	Acidité en cm ³ de NaOH N/10 pour 10 cm ³ de lait
0	0,2
10	0,25
30	0,25
60	0,25
180	0,45
540	0,80

Plus l'agitation est longue, plus l'acidification obtenue est élevée, bien que les différences ne se marquent qu'à partir d'une minute d'agitation.

L'acidification due à la lipolyse augmente donc avec le nombre de globules gras démolis.

Il s'agit maintenant de savoir par quel mécanisme la destruction des globules gras déclenche brusquement la lipolyse.

VIII. Où se trouve la lipase, dans la phase aqueuse ou dans la phase lipidique du lait de femme ?

La lipase étant aisément détruite, par chauffage vers 55°, on a chauffé deux fois 10 cm³ de lait de femme à 80° pendant une minute, puis on a séparé la crème du lait écrémé par centrifugation.

D'autre part, on a séparé la crème et le lait écrémé de 2 × 10 cm³ de lait de femme tel quel.

Les crèmes chauffées ou non, ont été lavées à l'eau physiologique et séparées à nouveau par centrifugation.

Les mélanges suivants sont réalisés :

1. Lait écrémé de femme, tel quel + crème de lait de femme telle quelle.
2. Lait écrémé de femme, chauffé à 80° C. / crème de lait de femme tel quel.
3. Lait écrémé de femme, tel quel + crème de lait de femme chauffé à 80° C.
4. Lait écrémé de femme chauffé à 80° C. + crème de lait de femme chauffé à 80° C.

Les différents mélanges ont été soumis pendant deux heures à une agitation continue au microïde Flask Shaker. Puis les acides gras libres formés par la lipolyse ont été extraits et titrés par NaOH N/10.

1. 1 cm³ 0 de NaOH N/10.
2. 0 cm³ 125 de NaOH N/10.
3. 1 cm³ 0 de NaOH/N/10.
4. 0 cm³ de NaOH N/10.

Le mélange, lait écrémé non chauffé et crème chauffée, s'acidifie autant que le lait entier tel quel.

Le système lipasique se trouve donc dans la phase aqueuse du lait de femme, contrairement à la xanthine-déhydrase [8], qui se trouve fixée sur les globules gras.

Le lait entier chauffé ne s'acidifie pas du tout, il n'y a donc pas de lipolyse. Et si le lait écrémé chauffé et la crème non chauffée s'acidifie très légèrement, c'est qu'il restait probablement un peu de phase aqueuse dans la crème. Nous avons également démontré ce fait d'une autre manière.

Nous savons que la lipolyse est beaucoup plus faible dans le lait de vache que dans le lait de femme. C'est pourquoi nous avons remplacé la crème de lait de vache par celle du lait de femme et la crème du lait de femme par celle du lait de vache en prenant comme témoins le lait entier de femme et le lait entier de vache. Les mélanges ont été agités pendant deux heures au Shaker et titrés après extraction des acides gras libres formés.

Mélanges	Acidité en cm ³ de NaOH N/10
1. Lait écrémé de femme + crème de lait de femme	0,9
2. Lait écrémé de femme + crème de lait de vache	1,5
3. Lait écrémé de vache + crème de lait de femme	0,1
4. Lait écrémé de vache + crème de lait de vache	0,2

Le lait entier de femme ainsi que le lait écrémé de femme + la crème de lait de vache s'acidifient, tandis que le lait entier de vache et le lait écrémé de vache + la crème de lait de femme ne

s'acidifient pas. Cela signifie donc, comme nous l'avons montré plus haut, que la lipase se trouve dans la phase aqueuse du lait de femme.

Ceci nous éclaire fortement sur le rôle de l'agitation dans le lait de femme. En effet la lipase hydrolyse la matière grasse du lait en libérant des acides gras qui acidifient le milieu. Mais la lipase se trouve dans la phase aqueuse où la matière grasse est dispersée en globules. Or SCHWARZ [9] a mis en évidence pour le lait de vache une membrane protéique qui entoure les globules gras.

Nous avons tout lieu de croire qu'une membrane semblable existe autour des globules gras du lait de femme et que c'est elle qui empêche la lipase d'attaquer la matière grasse dans le lait frais au repos. L'agitation détruirait cette membrane et permettrait à la lipase d'hydrolyser les lipides du lait de femme.

On pourrait également supposer, comme le pensait BEHRENDT, que la diastase est libérée d'un complexe (protéique) par l'agitation.

IX. Rôle de l'agitation.

Le but de cette expérience est de démontrer que cette dernière supposition est fausse.

200 cm³ de lait de femme sont centrifugés. On prélève le lait écrémé et on lave la crème avec un volume d'eau physiologique égal à celui du lait écrémé. On centrifuge et on sépare la crème. La moitié de la crème est remise en suspension dans un volume d'eau physiologique correspondant à celui du lait écrémé et on y additionne 4 % d'oléate de soude comme émulsifiant (l'oléate de soude avait au préalable été reconnu comme inactif sur la lipase du lait de femme). La crème en suspension dans l'eau physiologique est passée au Turmix pendant quatre minutes et la moitié du lait écrémé également.

Acidité en cm³ de NaOH N/10
sur l'extrait des A.G.L. de 10 cm³

Crème agitée	0
Crème non agitée	0
Lait écrémé agité	0
Lait écrémé non agité	0

La crème agitée et en suspension dans l'eau physiologique en est séparée par centrifugation et on réalise les mélanges suivants :

1. Crème non agitée + lait écrémé non agité.
2. Crème non agitée + lait écrémé agité.
3. Crème agitée + lait écrémé non agité.
4. Crème agitée + lait écrémé agité.

Après un repos de deux heures à 25° C., on extrait les acides gras libres de 10 cm³, que l'on titre par NaOH N/10.

Acidité de l'extrait en cm³
de NaOH N/10

Crème agitée	0
Crème non agitée	0
Lait écrémé agité	0
Lait écrémé non agité	0
Lait écrémé non agité + crème non agitée	0,28
Lait écrémé agité + crème non agitée	0,28
Lait écrémé non agité + crème agitée	0,67
Lait écrémé agité + crème agitée	0,67

Dans le cas de la crème agitée, on a une acidification identique que l'on soit en présence de lait écrémé agité ou non et cette acidification est plus du double de celle que l'on obtient avec la crème non agitée.

Dans le cas de la crème non agitée, l'acidification est également la même que le lait écrémé soit agité ou ne le soit pas.

Ceci démontre que ce sont les globules gras qui doivent être agités et leur membrane démolie pour que l'acidification se produise.

X. Phénomènes lipolytiques dans le lait de vache.

Il existe une lipase dans le lait de vache, comme ont pu le montrer de nombreux expérimentateurs et en particulier tout récemment JOHNSON et GOULD, [5] qui lui ont consacré un travail important.

Dans le but de nous rendre compte de l'importance pratique globale que possèdent les phénomènes lipolytiques au cours du ramassage du lait de vache, nous avons déterminé l'acidité totale et l'acidité provenant de la lipolyse sur des laits altérés au moment de la réception.

Voici par exemple, les chiffres se rapportant à quatre échantillons de laits différents :

Acidité totale directe		Acidité totale directe — Acidité due au tamponnement (16° D.)		Acidité extractible due à la lipolyse		Acidité due à la production d'acide lactique		
En cm ³ NaOH N/10	En degré Dornic	En cm ³ NaOH N/10	En degré Dornic	En cm ³ NaOH N/10	En % d'acidité totale — Tamponnement	En cm ³ NaOH N/10	En degré Dornic	En milli- grammes de lact.
4,2	37,8	2,4	21,8	0,35	14,6	2,05	18,45	184,5
4,8	42,2	2,9	26,2	0,25	8,6	2,65	23,85	238,5
6,0	54,0	4,2	38	0,3	7,1	3,9	35,1	351
4,45	40,0	2,65	24	0,35	13,2	2,3	20,7	207

Il ressort de ces essais que les actions lipolytiques sont loin de présenter pour le lait de vache, la même importance pratique que pour le lait de femme.

Signalons cependant que cette action peu se manifester dans certains cas particuliers et nous citerons le cas de laits de vache en fin de lactation, beaucoup plus riches en lipase.

Signalons aussi que la lipase naturelle manifeste énergiquement son action dans le cas où un lait est soumis à l'homogénéisation ou encore lors de la fabrication et du stockage de beurres de crèmes non pasteurisées.

Récemment, C. E. PARMELEE et F. E. NELSON [10] ont signalé que cette lipase naturelle aurait une action importante sur la lipolyse dans les fromages de Roquefort.

De plus, il n'est pas impossible que les actions lipasiques soient en rapport avec certains phénomènes pouvant se produire par agitation du lait et en particulier, l'apparition de grumeaux que l'on désigne sous le nom de casse de lait. Ce phénomène ne semble pas être dû uniquement à un début de barattage, mais bien à un mécanisme plus complexe.

Conclusions

Nous avons vérifié les travaux de ENGEL [1], ENFINGER [2] et BEHRENDT [4] au sujet de l'acidification du lait de femme par agitation continue. La part qui revient dans cette acidification à la lipase et celle qui revient aux microorganismes ont été délimitées.

L'influence des microorganismes a été éliminée, soit par le procédé d'agitation, soit par la méthode de dosage de l'acidité formée utilisée.

Après avoir prouvé que le système lipasique du lait de femme se trouve dans la phase aqueuse, nous avons pu montrer que par ce mécanisme, l'agitation provoque la lipolyse.

Contrairement à ce que pensait BEHRENDT [4], en 1922, la lipase est libre dans la phase aqueuse. Il semble prouvé qu'elle entre en activité lorsque l'on agite du lait de femme parce que la membrane protéique des globules gras, qui l'empêche d'entrer en contact avec son substrat, est rompue.

Nous avons pu déterminer dans des laits avariés le pourcentage de l'acidification, due à la lipolyse. Dans les laits de femme que nous avons testé, celle-ci était responsable de 50 à 100 % de l'acidification totale. Tandis que dans les laits de vache, l'acidification due à la lipolyse était beaucoup plus faible, de l'ordre de 10 % de l'acidification totale. Bien que beaucoup plus faible, la lipolyse dans le lait de vache peut être la cause de phénomènes importants en pratique.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ENGEL. *Monatsschr. f. Kinderheilk*, **11**, 578, 1913 ; **12**, 555, 1913.
- [2] ENFINGER. *Die Veränderung der Frauen und Kuhmilch durch Schütteln*. Inaug. Diss. Giessen, 1912.
- [3] DAVIDSSOHN. *Zeitschr. f. Kinderheilk*, **8**, 14, 1913.
- [4] BEHRENDT. Zur Analyse der Schüttelwirkung auf Frauen und Kuhmilch. *Biochemische Zeitschrift*, **127-28**, 450, 1922.
- [5] B. C. JOHNSON et I. A. GOULD. *Journal of Dairy Science*, **32**, 435-451, 1949.
- [6] NEWMAN-LAMPERT. *Standard Methods for Examination of Dairy Products*, 8th, Ed. Am. Pub. Health Assoc. New-York, 1941.
- [7] Etienne GOIFFON. *Le Lait*, **288**, 466-476, 1949. — *Annales de Biologie Clinique*, **5**, 282, 1948.
- [8] POLONOWSKI, BAUDU et NEUZIL. *Le Lait*, **281-282**, 1, 1949 ; **282-283**, 128, 1949.
- [9] SCHWARZ. Die Hüllen der Fettkügelchen. *Molkerei Zeitung Hildersheim*, avril 1947.
- [10] C. E. PARMELEE et F. E. NELSON. *Journal of Dairy Science*, **32**, 993-1012, 1949.

DÉTERMINATION DES TENEURS EN MATIÈRE SÈCHE, EN CALCIUM ET EN PHOSPHORE DE DIVERSES VARIÉTÉS DE FROMAGES A PÂTE FERME OU DEMI-DURE, ET A CROûTE RÉSISTANTE

par

LUCIE RANDOIN et COLETTE JOURDAN-VATINEL

INTRODUCTION

Dans un précédent article, nous avons exposé les résultats que nous avons obtenus relativement à la valeur calcio-phosphorique des principales variétés de fromages à pâte molle[1], et nous avons montré que l'étude de la richesse en calcium de ces variétés nous permet de distinguer, à ce point de vue spécial, plusieurs catégories de fromages à pâte molle :

— le *Livarot* et le *Pont-l'Evêque* (fromages à croûte lavée), dont 100 grammes de matière sèche renferment la quantité relativement considérable de 1 gr. 33 (*Livarot*) et 1 gr. 12 (*Pont-l'Evêque*) ;

— le *Munster* (autre fromage à croûte lavée), dont 100 grammes de matière sèche renferment 0 gr. 63 ;

— le *Carré de l'Est*, le *Coulommiers* et le *Brie* (fromages à moisissures externes), dont 100 grammes de matière sèche contiennent respectivement 0 gr. 49, 0 gr. 46 et 0 gr. 42 ;