Il en suit que, à la capacité horaire de 4.500 litres la seconde supercentrifugation élimine encore 90 % des bactéries que contenait le lait après le premier traitement, tandis que à la capacité de 6.000 litres, la seconde supercentrifugation élimine 83 %.

La double supercentrifugation à l'échelle industrielle de 4.500 litres par heure permet donc d'éliminer 99,5 % des bactéries que contenait le lait préchauffé et d'atteindre un effet bactérifuge supérieur à 99, 95 %. Quant à la durée de conservation de ce lait elle est, à 15°, de 8,6 jours en moyenne.

30 décembre 1958.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] P. SIMONART et G. DEBEER. *The Neth. Milk and Dairy Journal*. 1953, **7**, 117.
- [2] P. SIMONART et G. DEBEER. *The Neth. Milk and Dairy Journal*. 1954, **8**, 101.
- [3] P. SIMONART et G. DEBEER. *The Neth. Milk and Dairy Journal*. 1954, **9**, 163.
- [4] P. SIMONART, R. POFEE et WUYTACK. *Le Lait*, 1957, **37**, 253.
- [5] P. SIMONART. *Document, Fédération Internationale de Laiterie*. 1956, 48.
- [6] P. SIMONART. *Molkerei-Zeitung*. 1956, **38**, 1303.

RELATION ENTRE LA LACTÉNINE L₂ ET LA LACTOPEROXYDASE

par

A. PORTMANN et J. E. AUCLAIR

Avec la collaboration technique d'Yvonne GATÉ

Station Centrale de Microbiologie et Recherches Laitières
(Jouy-en-Josas)

I. — INTRODUCTION

En étudiant l'action inhibitrice du lait cru ou pasteurisé sur les streptocoques lactiques des levains de fromagerie, WRIGHT et TRAMER [1] ont montré que, pour certaines souches de streptocoques, l'effet inhibiteur du lait pouvait être attribué à une agglutination des germes par l'agglutinine des globules gras, les cellules bactériennes étant entraînées à la surface du lait avec la crème. Dans un second article [2], ces auteurs ont montré que, pour d'autres souches sensibles, l'inhibition était due vraisemblablement à la lactoperoxydase. Ils trouvaient en effet une étroite corrélation entre la destruction de la lactoperoxydase par divers facteurs physiques ou chimiques (température, pH, inhibiteurs variés) et la disparition de l'inhibition exercée par le lait sur la

souche *Streptococcus cremoris* 972, lorsque le lait servant à cultiver cette souche était soumis aux traitements provoquant la destruction de la lactoperoxydase. WRIGHT et TRAMER montraient en outre que les propriétés de la lactoperoxydase étaient très voisines de celles de la lacténine L_2 , substance inhibitrice du lait cru particulièrement active sur *Str. pyogenes* [3], [4], et pensaient que ces deux substances, lactoperoxydase et lacténine L_2 étaient identiques.

C'est cette hypothèse que nous nous sommes proposés de vérifier dans ce travail. Nous avons tout d'abord isolé la lactoperoxydase du lait par adsorption sur résine échangeuse d'ions en dosant à tous les stades de la séparation à la fois l'activité peroxydasique et la teneur en lacténine L_2 . Nous avons ensuite comparé l'action du chauffage à différents pH, ainsi que l'effet de l'azide de sodium, sur la destruction de la lactoperoxydase et de la lacténine L_2 . Enfin nous avons recherché si la peroxydase du raifort (horseradish peroxidase) présentait une activité inhibitrice comparable à celle de la lactoperoxydase.

II. — MÉTHODES

1. Préparation de lactoperoxydase brute.

A partir d'un lait de mélange de plusieurs vaches, nous avons séparé la lactoperoxydase par la méthode de MORRISON et al. [5].

Du lactosérum, obtenu par coagulation d'un lait de mélange à l'aide de présure liquide (coagulation en 10 minutes à 40° C.), était additionné de 1 % (p/v) de résine échangeuse d'ions IRC-50 (XE-64) préparée suivant la technique décrite par MORRISON. La peroxydase adsorbée sur la résine était éluée par une solution molaire de K_2HPO_4 puis précipitée par $(NH_4)_2SO_4$, 4M. Le précipité était centrifugé, repris dans du tampon phosphate à pH 5,7, et dialysé contre le même tampon à 6° C.. La préparation brute de lactoperoxydase ainsi obtenue était environ 150 fois plus active que le lactosérum initial.

2. Purification de la lactoperoxydase par chromatographie sur colonne.

La technique de MORRISON et al. [5] a été utilisée. On fait passer la solution de peroxydase brute sur une colonne de résine IRC-50 (XE-64), puis on élue successivement avec les tampons phosphate suivants :

- à pH 5,7 : 0,1M, 0,2M et 0,4M
- à pH 7,0 : 0,4M.

On recueille les éluats par fractions de 5 millilitres au moyen d'un collecteur de fractions automatique.

La densité optique des fractions obtenues est déterminée à 280, 310 et 412 $m\mu$ à l'aide d'un spectrophotomètre Beckman D. U. L'absorption à 280 $m\mu$ permet d'estimer les protéines totales, l'absorption à 310 $m\mu$ une protéine rouge mentionnée par MORRISON et al. [5] et par POLIS et SHMUKLER [6], tandis que l'absorption à 412 $m\mu$ est due au groupement prosthétique de l'hémoprotéine. Le rapport des densités optiques à 412 et 280 $m\mu$ est considéré comme un indice de la pureté de la lactoperoxydase [5], [6].

3. Mesure de l'activité peroxydasique.

L'activité peroxydasique des diverses préparations était déterminée par la méthode au gaïacol de CHANCE et MAEHLY [7]. Elle était exprimée en unités en prenant comme étalon un échantillon de lait conservé à basse température (-18°C). Ce lait étalon contenait par définition 100 unités de peroxydase par millilitre.

4. Dosage de la lacténine L_2 .

Les échantillons de lait destinés à ce dosage étaient préalablement pasteurisés à 63°C . pendant 30 minutes. Les échantillons de lactosérum étaient stérilisés par filtration sur filtre « Carlson E K S » (ou « Ford's sterimats G S »). Pour les fractions purifiées de lactoperoxydase, nous avons utilisé des membranes filtrantes « Membranfilter Göttingen » n° 5, l'enzyme purifié étant retenu par les filtres E K S et G S.

Le dosage était effectué suivant la méthode décrite par AUCLAIR et HIRSCH [3] qui utilise *Str. pyogenes* (RICHARDS) comme organisme-test. Un échantillon de lait étalon, le même que précédemment, et contenant par définition 100 unités de L_2 par millilitre, était utilisé dans chaque dosage à titre de comparaison.

Pour un certain nombre de dosages la souche de *Str. cremoris* 972 (WRIGHT et TRAMER) a été utilisée comme organisme-test en même temps que *Str. pyogenes* (RICHARDS). Cette souche 972 a déjà été trouvée particulièrement sensible à la lactoperoxydase [2], [8]. Nous avons toujours obtenu des résultats semblables avec ces deux organismes. L'un et l'autre germes peuvent donc être utilisés indifféremment pour le dosage de L_2 .

5. Electrophorèse sur papier.

Nous avons utilisé l'appareil de MACHEBŒUF, DUBERT et REBEYROTTE (Constructeur Lérés, Paris). L'électrophorèse était faite à la température du laboratoire, pendant quatre à six heures, sous une tension d'environ 10 volts par centimètre en utilisant différents tampons, suivant les préparations à étudier. Les protéines étaient mises en évidence sur les électrophorégrammes par coloration avec

l'amidoschwarz, suivant la technique de GRASSMANN et al. [9]. Des courbes d'électrophorèse étaient obtenues à partir des diagrammes ainsi colorés à l'aide d'un photomètre enregistreur automatique Lérés.

A partir de la préparation de lactoperoxydase brute, un isolement des fractions protéiques séparées par électrophorèse sur papier a été réalisé en éluant l'électrophorégramme par bandes parallèles à l'aide d'une technique semblable à celle de GANZIN et MACHEBŒUF [10].

Fig. 1. — A : Electrophorégramme de lactosérum.

B : Electrophorégramme de lactoperoxydase brute.

Tampon véronal pH 9,2 ; 10 volts/cm., 6 heures. En abscisse, distance parcourue en cm.

β = β -lactoglobuline, α = α -lactalbumine, i = immunoglobulines [11].

a , b et c : fractions éluées (voir texte et tableau II).

III. — RÉSULTATS

1. **Activité peroxydasique, teneur en lacténine L₂ et comportement électrophorétique de la préparation de lactoperoxydase brute.**

En partant de lactosérums contenant 60 à 200 unités par millilitre de lactoperoxydase et le même nombre d'unités de lacténine L₂, nous avons obtenu des préparations de lactoperoxydase brute dont les teneurs en peroxydase et en lacténine L₂ sont indiquées dans le tableau I. On voit que les différentes préparations contiennent 50 à 160 fois les quantités de peroxydase et de L₂ du lait étalon, et que, pour chaque préparation, les teneurs en peroxydase et en L₂ sont sensiblement les mêmes.

TABLEAU I
ACTIVITÉ PEROXYDASIQUE ET TENEUR EN L₂
DE DIFFÉRENTES PRÉPARATIONS DE LACTOPEROXYDASE BRUTE

Préparations de lactoperoxydase brute	Lactoperoxydase (u/ml.) (1)	L ₂ (u/ml.) (1)
1	6.500	6.800
2	8.000	12.000
3	15.000	16.000
4	5.000	5.000

(1) Activité peroxydasique et teneur en L₂ rapportées au même lait étalon. Ce lait étalon contient par définition 100 unités par ml. de lactoperoxydase et 100 unités par ml. de lacténine L₂.

L'étude électrophorétique d'une de ces préparations de peroxydase brute nous a donné la courbe d'électrophorèse de la figure 1, B. La comparaison avec la courbe d'électrophorèse obtenue avec du lactosérum (figure 1, A) montre qu'une grande partie des protéines du lactosérum ont été éliminées au cours de l'isolement.

L'élution des fractions séparées par électrophorèse sur papier à partir de cette même peroxydase brute (fractions *a*, *b* et *c* de la figure 1, B) nous a donné les résultats indiqués sur le tableau II.

TABLEAU II
ACTIVITÉ PEROXYDASIQUE ET TENEUR EN L₂
DES FRACTIONS SÉPARÉES PAR ÉLECTROPHORÈSE SUR PAPIER
À PARTIR DE LA PRÉPARATION DE LACTOPEROXYDASE BRUTE

Fractions (1)	Lactoperoxydase (u/ml) (2)	L ₂ (u/ml.) (2)
<i>a</i>	traces	0
<i>b</i>	2.500	3.600
<i>c</i>	300	230

(1) Voir figure 1, B.

(2) Voir tableau I.

Fig. 2. — Isolement de la lactoperoxydase par chromatographie sur colonne d'Amberlite I R C -50

On voit que l'activité peroxydasique se retrouve en presque totalité dans la fraction *b*. Cette même fraction contient également la plus grande partie de la lacténine L_2 . L'activité peroxydasique et la teneur en lacténine L_2 des différentes fractions sont encore du même ordre de grandeur.

2. Activité peroxydasique, teneur en lacténine L_2 et comportement électrophorétique des fractions séparées par chromatographie sur colonne.

La figure 2 donne l'ensemble des résultats obtenus au cours de cette séparation. On voit que deux fractions protéiques principales sont éluées d'une part par le tampon phosphate 0,1 *M* de *pH* 5,7, d'autre part par le tampon phosphate 0,4 *M* de *pH* 7,0. Tandis que les densités optiques à 412 et à 280 $m\mu$ des fractions séparées entre 100 et 250 millilitres d'effluent sont assez voisines (rapport densité optique à 412 $m\mu$ / densité optique à 280 $m\mu$ voisin de 0,8), au contraire, pour les fractions séparées entre 650 et 700 millilitres d'effluent, ce même rapport varie de 0,1 à 0,7, ce qui montre que ces dernières fractions contiennent, en plus de la lactoperoxydase, une quantité assez importante de protéine étrangère. La figure 2 donne d'autre part l'activité peroxydasique, mesurée par la méthode au gaïacol, ainsi que la teneur en L_2 des fractions recueillies au cours de la chromatographie et rassemblées ainsi qu'il est indiqué sur la figure. On constate encore une relation étroite entre l'activité peroxydasique et la teneur en L_2 de chaque fraction.

La figure 3 montre par ailleurs les courbes d'électrophorèse obtenues avec les fractions les plus riches en peroxydase rassemblées entre 120 à 200 millilitres d'effluent, et entre 670 et 675 millilitres d'effluent. Dans le premier cas (fig. 3, A) la courbe d'électrophorèse présente un seul pic à 1 centimètre environ du point de départ, tandis que les fractions recueillies entre 670 et 675 millilitres (fig. 3, B) donnent une courbe irrégulière indiquant la présence, en plus de la lactoperoxydase (pic à 1 cm.) d'une autre protéine (pic à 2 cm. environ). Ceci confirme les observations indiquées plus haut résultant de la mesure des densités optiques des fractions à 412 et 280 $m\mu$.

3. Action du *pH* et de la température sur la lactoperoxydase et la lacténine L_2 .

Les courbes de destruction de la lacténine L_2 à des températures et des *pH* variables ont été décrites précédemment [3]. Dans les expériences présentes, du lactosérum obtenu comme il a été indiqué plus haut, était stérilisé par filtration sur filtre Carlson E K S, puis additionné de lactoperoxydase brute également sté-

rilisée par filtration, de façon à obtenir une concentration d'environ 500 unités par millilitre de lactoperoxydase.

Ce lactosérum enrichi en lactoperoxydase était ensuite ajusté avec de la soude *N* ou de l'acide chlorhydrique *N* à des *pH* variant entre 5 et 9. Les différentes préparations réparties en tubes de 18 × 180 millimètres étaient chauffées pendant 20 minutes à 73° C. ± 0,1.

Fig. 3. — A : Electrophorégramme des fractions recueillies par chromatographie entre 120 et 200 ml. d'effluent.

B : Electrophorégramme des fractions recueillies entre 670 et 675 ml. d'effluent.

Tampon véronal *pH* 9,2 ; 10 volts/cm. ; 6 heures. En abscisse, distance parcourue en cm.

Le tableau III donne les résultats obtenus. On observe encore une relation étroite entre l'activité peroxydasique et la teneur en L₂ des diverses préparations.

4. Action de l'azide de sodium sur la lactoperoxydase et la lacténine L₂.

La lactoperoxydase est inactivée par différents inhibiteurs dont l'eau oxygénée et l'azide de sodium. Nous avons déjà montré [4] que la lacténine L₂ était également inactivée par l'eau oxygénée. WRIGHT et TRAMER [2] ont confirmé ce résultat et observé en outre

TABLEAU III
 ACTIVITÉ PEROXYDASIQUE ET TENEUR EN L_2
 DE LACTOSÉRUM ENRICHÉ EN PEROXYDASE
 ET CHAUFFÉ A 73° C A DES pH VARIABLES

Lactosérum chauffé à 73°C. pendant 20 min. aux pH suivants	Lactoperoxydase (u/ml) (1)	L_2 (u/ml) (1)
5,0	0	0
5,5	190	180
6,0	250	250
6,5	250	250
7,0	250	250
7,5	220	200
8,0	125	125
8,5	80	90
9,0	0	0
Lactosérum non chauffé	440	500

(1) Voir tableau I.

une corrélation entre la destruction de la peroxydase et l'activité de la souche 972 dans du lait traité par l'azide.

Nous avons confirmé à notre tour ce dernier résultat au cours de plusieurs essais dont le tableau IV donne un exemple. On constate

TABLEAU IV
 ACTIVITÉ PÉROXYDASIQUE ET TENEUR EN L_2
 DE LACTOSÉRUM ADDITIONNÉ D'AZIDE DE SODIUM

Lactosérum additionné d'azide de sodium aux concentrations suivantes	Lactoperoxydase (u/ml) (1)	L_2 (u/ml) (1)
0	100	100
M		
64.000	50	50
M		
32.000	35	25
M		
16.000	15	traces
M		
8.000	6	0
M		
4.000	0	0

(1) Voir tableau I.

encore une relation étroite entre l'activité peroxydasique du lactosérum additionnés de différentes concentrations d'azide de sodium et la teneur en lacténine L_2 de ces mêmes préparations.

5. Action inhibitrice de la peroxydase du raifort.

Une solution de peroxydase de raifort (horse-radish peroxydase, Worthington Biochemical Corp.) a été préparée à raison de 65 milligrammes pour 100 millilitres puis dialysée contre de l'eau distillée. Elle avait une activité peroxydasique de 1.500 unités par millilitres mesurée par la méthode au gaïacol.

Cette préparation ne montra aucune activité inhibitrice par la méthode de dosage de la lacténine L_2 soit vis-à-vis de *Str. pyogenes*, soit vis à vis de *Str. cremoris* 972.

IV. — DISCUSSION

Les résultats précédents confirment l'hypothèse émise par WRIGHT et TRAMER selon laquelle la lacténine L_2 serait identique à la lactoperoxydase.

Nous avons constaté à tous les stades de préparation et de purification de la lactoperoxydase une relation étroite et constante entre l'activité peroxydasique des préparations obtenues et leur teneur en lacténine L_2 . C'est en particulier le cas des fractions les plus purifiées de lactoperoxydase obtenues par chromatographie, pour lesquelles la lactoperoxydase est dans un grand état de pureté, puisqu'elle représente environ 80 % des protéines totales.

La lacténine L_2 disparaît en même temps que l'activité peroxydasique dans les processus qui inactivent la lactoperoxydase : traitement par la chaleur à différents pH et par l'azide de sodium.

On a donc tout lieu de penser que lacténine L_2 et lactoperoxydase représentent la même substance.

Mais il est intéressant de noter que l'activité antibactérienne observée sur les deux organismes utilisés, *Str. pyogenes* et *Str. cremoris* 972, est spécifique de la lactoperoxydase et qu'une autre autre peroxydase, telle que la peroxydase du raifort, ne présente pas d'activité inhibitrice vis-à-vis de ces mêmes germes.

RÉSUMÉ

En isolant la lactoperoxydase du lait par adsorption sur résine échangeuse d'ions, une relation étroite et constante a été trouvée entre l'activité peroxydasique et la teneur en lacténine L_2 des préparations obtenues.

La lacténine L_2 disparaît en même temps que l'activité peroxydasique au cours des processus qui inactivent la lactoperoxydase tels que le chauffage à différents pH ou l'addition d'azide de sodium.

Ces résultats confirment l'hypothèse de WRIGHT et TRAMER selon laquelle lacténine L_2 et lactoperoxydase seraient identiques.

La peroxydase du raifort ne montre aucune activité inhibitrice vis-à-vis des micro-organismes sensibles à la lactoperoxydase tels que *Str. pyogenes* (RICHARDS) et *Str. cremoris* 972.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] R. C. WRIGHT et J. TRAMER. The influence of cream rising upon the activity of bacteria in heat-treated milk. *J. Dairy Res.*, **24**, 174-183, 1957.
- [2] R. C. WRIGHT et J. TRAMER. Factors influencing the activity of cheese starters. The role of milk peroxidase. *J. Dairy Res.*, **25**, 104-118, 1958.
- [3] J. E. AUCLAIR et A. HIRSCH. The inhibition of micro-organisms by raw milk. I. The occurrence of inhibitory and stimulatory phenomena. Methods of estimation. *J. Dairy Res.*, **20**, 45-59, 1953.
- [4] J. E. AUCLAIR. The inhibition of micro-organisms by raw milk. III. Distribution and properties of two inhibitory substances, lactenin 1 and lactenin 2. *J. Dairy Res.*, **21**, 323-336, 1954.
- [5] M. MORRISON, H. B. HAMILTON et E. STOTZ. The isolation and purification of lactoperoxidase by ion exchange chromatography. *J. Biol. Chem.*, **228**, 767-776, 1957.
- [6] B. B. POLIS et H. W. SHMUKLER. Crystalline lactoperoxidase. I. Isolation by displacement chromatography. II. Physicochemical and enzymatic properties. *J. Biol. Chem.*, **201**, 475-500, 1953.
- [7] A. D. MEALHY, in D. GLICK. Methods of biochemical analysis, New-York, **1**, 386, 1954.
- [8] J. E. AUCLAIR et A. PORTMANN. Action inhibitrice des lacténines sur les streptocoques lactiques des levains de fromagerie. *XV^e Congrès Intern. Laiterie*, Londres, 1959 (sous presse).
- [9] Ch. WUNDERLY. Electrophorèse sur papier. Vigot Frères, Paris, p. 40, 1956.
- [10] M. GANZIN et M. MACHEBŒUF. Application de la microélectrophorèse sur papier à l'isolement à partir de très petits volumes de sérum de fractions protéiques homogènes à l'électrophorèse et non dénaturées. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **34**, 32-42, 1952.
- [11] R. JENNESS, B. L. LARSON, T. L. McMEekin, A. M. SWANSON, C. H. WHITNAH et R. MCL. WHITNEY. Nomenclature of the proteins of bovine milk. *J. Dairy Sci.*, **39**, 536-541, 1956.