LE LAIT

REVUE GÉNÉRALE DES QUESTIONS LAITIÈRES

SOMMAIRE

MÉMOIRES ORIGINAUX :

- S. ANNIBALDI. — Contribution à l'étude de la caséine . 533
- S. KUZDZAL-SAVOIE et G. MOCQUOT. — Observations sur les qualités organoleptiques du lait . 603
- F. V. KOSIKOWSKI et R. A. LEDFORD. — Test pour la recherche des antibiotiques dans le lait . 620

SUPPLÉMENT TECHNIQUE :

- G. GÉNIN. — L'emploi de la caséine dans les mélanges à base de latex synthétique pour la fabrication du papier couché . 627

BIBLIOGRAPHIE ANALYTIQUE :

- 1^o Les livres . 642
- 2^o Journaux, Revues, Sociétés savantes . 648

BULLETIN BIBLIOGRAPHIQUE :

- 1^o Journaux, Revues, Sociétés savantes . 682

DOCUMENTS ET INFORMATIONS :

- Y. GANDON. — La situation laitière . 687
- Exceptions à l'obligation de pasteuriser les laits et les crèmes servant à la fabrication des fromages frais . 690
- Le prix du lait, en Suisse . 691
- Production et marché international du lait et des produits laitiers . 694
- Sacs en polyéthylène . 696
- Production laitière . 696
- XVI^e Congrès International de laiterie . 696
- Communiqués . 700
- Table des matières . 704
- Table des auteurs . 708
- Table des ouvrages analysés . 722

MÉMOIRES ORIGINAUX (1)

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA CASÉINE

par

SERGIO ANNIBALDI

Institut Expérimental de Zootechnie — Modène

Directeur : P. SEMPRINI

Première remarque

On sait bien [1] que le sédiment de phosphocaseinate obtenu par ultracentrifugation du lait n'est pas homogène, mais qu'il se présente distribué en plusieurs couches parmi lesquelles il est possible de distinguer d'une façon évidente, une couche superfi-

(1) Reproduction interdite sans indication de source.

cielle transparente et hyaline de consistance gélatineuse et une autre profonde, blanche, opaque, bien plus consistante [2].

Il est évident que le manque d'homogénéité du sédiment est dû à la différence des caractéristiques tant physiques que chimiques qui existent entre les micelles colloïdales de la caséine, dont la sédimentation se produit au moyen de la centrifugation [3] [4] [5].

HOSTETTLER et IMHOF [6] eurent déjà la possibilité de constater, au moyen de la centrifugation fractionnée du lait, que le contenu de phosphate de calcium n'est pas le même dans toutes les micelles de la caséine, mais qu'il est proportionnel à leurs dimensions, puisque les particules plus grandes renferment davantage de phosphate de calcium que les petites.

Les A. susdits, au moyen du microscope électronique, ont pu aussi constater que les particules de la caséine ont des dimensions très variables; en outre, ils ont remarqué qu'il y a une relation inverse entre les dimensions des micelles mêmes et le temps de coagulation par la présure [7] [8] [17].

Parce que nous croyons qu'un examen plus profond des deux aspects relatifs à la transparence et à l'opacité considérés dans une même caséine, peut présenter un assez grand intérêt, nous avons fait cette recherche dans l'intention d'apporter une aide pour favoriser une meilleure connaissance de cet important élément azoté qui entre dans la composition du lait.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Séparation de la caséine transparente et opaque

On réchauffe à 30° C du lait frais de masse, on l'écume à l'aide d'une petite écrémeuse mécanique; ensuite, on le fait immédiatement refroidir à 2-4° C et on le soumet à une centrifugation au moyen d'une ultra-centrifugeuse préparatoire réfrigérée Spinco Mod. L. La centrifugation est effectuée à la vitesse de 40 000 tours/minute pendant 60 minutes, en gardant une température inférieure à 5° C. Dans de telles conditions, on a obtenu la séparation presque totale de la caséine sans la dénaturer, ayant ainsi des sédiments qui pouvaient ensuite être facilement dissous de nouveau.

La centrifugation achevée, il est possible de remarquer, dans les éprouvettes, le sérum du lait, verdâtre et très limpide, une couche très mince de matière surnageant et, au fond, la caséine sédimentée, dans laquelle on peut clairement distinguer une couche transparente et une couche opaque.

Bien que les dimensions des particules de caséine soient très

variables [6] comme est variable le rapport entre les micelles ayant différentes dimensions, il est résulté, d'une quinzaine de mensurations, que la couche nettement transparente constitue 35 p. 100 environ du sédiment. Après avoir vidé le sérum et égoutté les éprouvettes pendant 5 minutes, les tubes en cellulose (lusteroid) sont coupés à l'aide de ciseaux le long de l'axe longitudinal pour rendre plus facile la réunion du sédiment. Au moyen d'une spatule en acier, on prélève la couche nettement transparente, ensuite la couche intermédiaire, qui, cependant n'est pas examinée, et enfin, on recueille la caséine opaque qui adhère au fond des éprouvettes. On a prélevé, de quelques tubes, le sédiment intégral, dans le but d'apprêter des échantillons afin de pouvoir les comparer.

Avec les paramètres des centrifugations qu'on a adoptés, une petite partie de caséine formée par les micelles colloïdales plus petites, n'a pas fait de sédiment. En moyenne, comme il en est résulté d'après quelques déterminations de substances azotées exécutées sur le lait et sur le sérum d'ultracentrifugation, on a séparé environ 90 p. cent de la quantité totale de caséine.

Il faut aussi tenir compte qu'ayant effectué la centrifugation au moyen des tubes ayant une inclinaison de 26° , le sédiment transparent recueilli était composé d'une partie des micelles plus petites de la couche superficielle et de quelques micelles à dimensions moyennes qui appartiennent à une couche un peu plus profonde.

La zone comprise dans le triangle A correspond à la caséine transparente prise en examen. — La zone B n'a pas été considérée. — La zone C correspond à la caséine opaque prise en examen.

Les caractéristiques des deux couches prises en examen sont

très différentes. La couche transparente apparaît humide et d'une consistance qui, suivant la température de centrifugation, passe de la densité de la gelée à celle de l'agar pour bactériologie. La couche opaque apparaît au contraire plus sèche, blanche et plus compacte que la précédente.

Les analyses exécutées sur 5 échantillons de sédiments totaux et sur le lait d'où ils ont été obtenus, ont fourni les résultats moyens suivants :

Lait		Sédiment	
Ca p. 100	14,08	Ca p. 100	27,84
P p. 100 (sur les cendres) ...	23,12	P p. 100 (sur les cendres) ...	26,97

L'eau a été déterminée par pesée à la suite d'une évaporation dans une étuve, les cendres par pesée également, en utilisant le four à moufle, le calcium par mensuration volumétrique à l'état d'oxalate et le phosphore colorimétriquement au moyen du réactif molybdique et d'un spectrophotomètre à réticule.

Comportement, à la présure, des caséines transparente et opaque

L'examen du comportement, à la présure, des deux parties de caséine, la fraction transparente et la fraction opaque, a été effectué au moyen de la technique des laits reconstitués [1] [5], en se servant de la méthode tensiométrique [9] [10] [11], mise au point par l'auteur de cet ouvrage et employée avec succès dans d'autres recherches. Cette méthode est basée sur la mensuration, effectuée à intervalles de temps régulier, des variations de tension superficielle qui se produisent dans le lait au cours de la coagulation au moyen de la présure. On a exécuté les mensurations à une température constante de 35° C, à l'aide d'un tensiomètre dynamique Lecomte de Nouy, avec nonius, fabriqué par la maison A. Krüss d'Hambourg.

La préparation des échantillons de lait « reconstitué » a été effectuée en dispersant grossièrement, au moyen d'un petit homogénéisateur mécanique, les différentes parties de la caséine, la transparente, l'opaque et la totale, dans le sérum obtenu à la suite de l'ultracentrifugation préparatoire du même lait. La caséine transparente s'est facilement dispersée dans le sérum et a fourni un lait reconstitué blanc verdâtre, la fraction opaque a fourni du lait qui est nettement plus blanc que le naturel; la solution avec le sédiment intégral au contraire, ressemblait beaucoup au lait.

Les trois caséines en suspension dans le sérum du même lait y étaient contenues en quantités à peu près pareilles et égales à 2,6 p. 100. Les trois solutions avaient aussi un pH égal et, ayant été préparées avec le même sérum, renfermaient le même taux de calcium soluble nécessaire à la coagulation par la présure. On a obtenu

la coagulation à l'aide d'une solution diluée de présure du commerce.

Le comportement, à la présure, des trois caséines a été différent, comme il résulte des diagrammes rapportés, et a toujours donné des résultats concordants tout en opérant avec des laits de différente provenance et dans des conditions chaque fois un peu différentes.

Le lait reconstitué avec la caséine transparente s'est coagulé le premier d'une façon constante, avec une avance de temps qui atteint presque 20 p. 100 de celui de la fraction opaque, fournissant un gel suffisamment compact et contractile.

Dans le lait reconstitué, la caséine opaque a provoqué une coagulation plus lente que la caséine transparente, en fournissant un coagulum aussi compact et contractile.

Le lait reconstitué avec le sédiment intégral, c'est-à-dire comprenant à la fois la caséine opaque et la caséine transparente, dans les proportions naturelles, s'est coagulé en une période de temps intermédiaire entre les deux périodes précédentes, donnant un gel un peu plus compact et aussi contractile que celui qu'on a remarqué dans les deux laits précédents. On croit qu'il est bon de rappeler que le lait naturel, qui a servi à la préparation des sédiments et du sérum pour les laits reconstitués, s'est coagulé en la même période de temps employée par le lait reconstitué avec la fraction de caséine transparente, c'est-à-dire la plus rapide.

TABLEAU I

TABLEAU RÉCAPITULATIF DES DONNÉES DE COAGULATION OBTENUES

						Valeurs moyennes
<i>Lait reconstitué avec caséine transparente</i>						
Durée de la coagulation	14'	14'	14'	14'	14'	14'
Compacité du coagulum	6,1	7,4	5,7	8,4	10,2	7,56
Contractilité du coagulum	2,1	2,0	0,9	1,7	5,6	2,46
<i>Lait reconstitué avec caséine opaque</i>						
Durée de la coagulation	18'	18'	16'	16'	18'	17,2
Compacité du coagulum	6,2	7,6	5,8	6,7	10,2	7,3
Contractilité du coagulum	3,5	2,2	2,9	1,7	3,5	2,76
<i>Lait reconstitué avec caséine intégrale</i>						
Durée de la coagulation	16'	16'	16'	16'	16'	16'
Compacité du coagulum	7,3	9,6	5,8	7,6	8,0	7,66
Contractilité du coagulum	2,0	2,1	2,9	2,5	3,0	2,5

Pour rendre plus facile la lecture des diagrammes rapportés, on rappelle que le sommet de la courbe indique l'instant où toute la caséine s'est coagulée, la hauteur du graphique indique la compacité du coagulum et la longueur de la branche descendante, la capacité de synérèse du coagulum même.

Le différent comportement, à la présure, des deux fractions, la partie transparente et la partie opaque de la même caséine, peut sembler tout d'abord incompréhensible, même si l'on admet qu'en homogénéisant de nouveau à l'aide du procédé artificiel et mécanique adopté dans la préparation des laits reconstitués, on n'a pas atteint l'état de dispersion naturelle des micelles ; c'est pour cela qu'on n'a pas la certitude, qu'en homogénéisant de nouveau la caséine composée de micelles petites, on ait obtenu encore une suspension à micelles petites, et de même avec les grandes. Probablement, l'état de dispersion de la caséine dans les

différentes solutions considérées n'était pas très différent, même s'il y a eu une certaine influence exercée, par les dimensions initiales des particules de caséine. On peut, bien plus, admettre que les laits reconstitués avec des micelles petites de caséine ont des particules bien plus dispersées que les autres.

Examen électrophorétique des caséines transparente et opaque

Afin d'éclairer le différent comportement, à la présure, des deux fractions de caséine en question, on a examiné leur structure au moyen de l'électrophorèse.

On a employé l'électrophorèse en phase libre effectuée à l'aide d'un appareil du type Tiselius, fabriqué par la maison Hilger et Watts de Londres [16].

La préparation des échantillons des différentes caséines qui devaient être soumises à l'électrophorèse a constitué un petit problème dont la solution a demandé la mise au point d'une technique originale élaborée exprès.

La caséine a été séparée du lait au moyen de l'ultra centrifugation effectuée suivant la manière et les conditions précédemment décrites. Chaque fraction de la caséine sédimentée, la transparente, l'opaque et la caséine totale, a été dissoute dans 20 ml d'une solution tampon au véronal-sodique ayant un pH de 8,6. A l'aide d'un homogénéisateur mécanique, on a obtenu, en peu de temps, la dissolution presque complète de la caséine dans le tampon sans dépasser la température de 15-20° C. Les solutions ainsi obtenues paraissent très lactescentes et opaques et, par conséquent, elles ne sont pas propres à l'électrophorèse optique qui demande, au contraire, des solutions parfaitement transparentes.

Pour les rendre transparentes, on a ajouté à chacune d'elles, quelques gouttes d'une solution aqueuse saturée du sel disodique de l'acide éthylendiaminotétracétique. On sait que ce réactif a la capacité de saisir des ions bivalents et trivalents, en leur faisant perdre toute caractéristique ionique. On a obtenu de la sorte, dans ces solutions, un complexe soluble renfermant tout le calcium. La soustraction des ions calcium a provoqué la transformation de la caséine qui est passée d'un état de dispersion grossière à l'état de solution moléculaire, permettant ainsi d'obtenir des solutions de caséine parfaitement transparentes. Les liquides ainsi obtenus, portés par dilution avec tampon à une concentration protéique de 1,3 p. 100 environ, sont dialysés contre la susdite solution tampon pendant 62-63 heures à la température de 4° C, puis examinés à l'électrophorèse.

Les électrophorétogrammes obtenus, dont quelques-uns sont ici rapportés, ont mis en évidence que les deux caséines, la transparente et l'opaque, ont une structure différente. La première en effet a montré qu'elle possédait à l'égard de la caséine opaque, un taux plus élevé de fraction α et un taux plus bas de fraction β , et surtout de fraction γ . La caséine γ qui apparaît à l'état de traces dans la caséine opaque, manque dans la caséine transparente, où les fractions α et β ont montré une forte tendance à former des combinaisons [14] [15].

La caséine transparente formée par les petites et moyennes micelles a donc une structure électrophorétique différente de la caséine opaque; c'est une structure qui pourrait éclairer son comportement à la présure. En effet, elle paraît particulièrement douée de fraction α qui renferme la caséine K [13] [18]; c'est la caséine qui réagit avec la présure, tandis qu'elle est plus pauvre en fraction β qui, suivant la démonstration de PRYNE [12], remplit la fonction de colloïde protecteur [18] et tend par conséquent à ralentir la coagulation même.

La structure électrophorétique différente des deux caséines examinées pourrait donc expliquer suffisamment leur comportement différent à la présure.

Des électrophorétogrammes rapportés, il paraît évident que la composition des caséines en question soit différente.

Discussion des résultats

D'après les résultats obtenus au moyen des preuves de coagulation et l'examen électrophorétique, on peut affirmer que l'ultra-centrifugation du lait fournit un sédiment qui n'est point homogène.

A la suite de cette recherche, en effet, il est résulté que les particules de caséine, moyennes et petites, qui forment la partie transparente du sédiment du lait, et les plus grandes qui en forment la partie opaque, sont très différentes dans leur structure intime, étant donné que la caséine transparente est plus riche en caséine α et qu'elle est plus pauvre en protecteur ; c'est pour cela qu'elle coagule par la présure plus rapidement que la caséine opaque.

Le fait que HOSTETTLER et IMHOF aient remarqué à l'aide du microscope électronique que la vitesse de coagulation de la caséine est plus forte pour les micelles de plus grandes dimensions n'est point en contradiction avec ce qu'on a constaté au cours de cette recherche, puisque, en homogénéisant de nouveau le sédiment dans le sérum, on n'a pas la certitude d'avoir atteint l'état de dispersion naturelle qui appartient à chaque dimension de chaque micelle.

Toutefois les expériences de MOCQUOT et Coll. [1] tiennent pour démontré que l'ensemble des manipulations effectuées sur un même échantillon de lait, ne modifie pas sensiblement les temps de coagulation par la présure, même lorsque la dissolution du sédiment, exécutée de nouveau, est imparfaite.

Dans ce cas, on produit une augmentation moyenne du temps de coagulation de 10 p. 100. En effet, la « reconstitution » des laits entraîne généralement une augmentation de la durée de coagulation. Mais, comme dans cette expérience, on a fait des preuves de comparaison et qu'on a remarqué que les différences de coagulation entre les caséines comparées étaient considérables (15-20 p. 100), nous sommes enclins à croire, qu'en fait, la structure particulière de la caséine transparente peut compenser les plus petites dimensions des micelles et provoquer une plus rapide coagulation par la présure.

Alors que l'hypothèse d'une différence dans la structure peut expliquer la différente vitesse de coagulation des deux caséines, on n'a pu remarquer que très peu de choses au sujet de la compacité et de la contractilité des coagulums respectifs. De plus, le fait que l'échantillon préparé avec la caséine intégrale a démontré l'aptitude à fournir le meilleur coagulum quant à la compacité, fait supposer que l'union des deux caséines, la transparente et l'opaque, permettra une influence réciproque et respective dans la construction

de l'édifice constitué par le coagulum, en se complétant réciproquement. L'étude des faits les plus importants remarqués au cours de cette recherche va être poursuivie.

SUMMARY

The deposit from ultracentrifugation of milk shows a deep coating of opaque casein and a superficial coat of transparent casein.

The proof of coagulation through rennet conducted according to the technique of reconstituted milk prepared by dispersing the fraction of the sediment examined, amongst milk serum, has made it clear that transparent casein composed of small and medium colloidal micellæ, coagulates more rapidly than opaque casein composed, on the contrary, of larger particles of casein.

The electrophoretic structure of transparent and opaque caseins has also been examined and it has been ascertained that the transparent fraction, in respect of opaque casein, has a greater casein content α and a smaller casein β content.

The structure of transparent casein, particularly fitted for coagulation through rennet due to its high rate of coagulable α fraction and a weaker rate of β fraction, fulfilling the duties of protector, adequately explains its special behaviour with regard to rennet.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] G. MOCQUOT, C. ALAIS, R. CHEVALIER. *Annales de Technologie*, 1954, vol. I, 1.
- [2] I. KIYOSAWA, J. RYOKI, M. MAENO. *Dairy Sci. Abstr.*, 1960, vol. I, 41.
- [3] G. S. DE KADT, G. VAN MINNEN. *Rec. Trav. Chim.*, 1943, **62**, 257.
- [4] Z. ZELTER. *Le Lait*, 1953, XXXIII, 328, 594.
- [5] C. H. WITNAH, R. BASSETTE. *Journal Dairy Sci.*, 1959, **42**, 898.
- [6] H. HOSTETTLER, K. IMHOF. *Landw. Ju. Schweiz*, 1952, **66**, 309.
- [7] M. BEAU. *Le Lait*, 1955, XXXV, 1.
- [8] D. F. WAUGH. *Abstr. Pap. Amer. Chem.*, 1959, **4**, 49.
- [9] S. ANNIBALDI. *Il Latte*, 1959, XXXIII, 7.
- [10] S. ANNIBALDI. *Il Latte*, 1959, XXXIII, 6.
- [11] C. H. WITNAH. *J. Dairy Sci.*, 1959, **42**, 1437.
- [12] G. T. PYNE. *Chemistry and Industry*, 1951, n° 3, 171.
- [13] R. A. SULLIVAN, M. M. FITZPATRICK, E. K. STAUTON. *Nature Land.*, 1959, **183**, 616.
- [14] D. F. WAUGH. *Disc. Farad y Soc.*, 1958, **25**, 186.
- [15] D. F. WAUGH. *Abstr. Pap. Amer. Chem. Soc.*, 1959, **49**.
- [16] S. ANNIBALDI. *Le Lait*, 1959, XXXIX, 7, 381.
- [17] C. H. ZITTLE, L. PEPPER. *J. Dairy Sci.*, 1958, **41**, 1671.
- [18] D. F. WAUGH, P. H. VAN HIPPEL. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1956, **78**, 4576.