

DINGER (1). Vu le fait que l'extrait isolé de cette manière est thermolabile et en même temps très sensible aux variations de concentration en ions hydrogène, nous sommes persuadé qu'il s'agit dans ce cas d'une vraie diastase. Pour cette diastase nous proposons, pour nous conformer à l'usage établi, le nom de *fibrinogénase*.

* * *

En dehors de cette diastase, nous avons été conduit à mettre en évidence encore un facteur existant dans le lait et possédant la propriété de coaguler les solutions de fibrinogène. Il s'agit cette fois d'une substance se trouvant dans la fraction non saponifiable de l'extrait éthéré de la matière grasse du lait.

L'action de cette substance sur les solutions de fibrinogène ne se manifeste pas par une coagulation massive comme cela se passe avec la fibrinogénase, mais par un phénomène de précipitation du fibrinogène. Comme ce dernier facteur est plus résistant à la chaleur, il se pourrait qu'il ne soit rien d'autre que la vitamine K.

Cette supposition paraît être corroborée par l'expérience avec le lait de femme ictérique, pour la raison que, dans l'ictère l'absorption intestinale des graisses étant entravée, il se pourrait que la synthèse de la vitamine R soit, elle-même, troublée sinon supprimée.

SUR LA RUPTURE DE L'ÉQUILIBRE PHOSPHATIQUE DANS LES LAITS MICROBIENS FORTEMENT CHAUFFÉS

CAS DES LAITS STÉRILISÉS (2)

par

M. G. GUITTONNEAU

M^{lle} M. BEJAMBES

Professeur à l'Institut agronomique,

Chef de travaux

Directeur

du Laboratoire national des Industries laitières.

Introduction.

Nous avons précédemment montré [1] que, chauffés dans du lait cru de vache, un certain nombre de microorganismes, les ferments lactiques en particulier, retenaient par adsorption les phosphates calciques libérés des complexes phosphocaséinatiques du lait à la faveur des traitements thermiques.

Le revêtement de phosphates ainsi fixé à la surface des corps microbiens est tel qu'il peut les protéger contre l'action des colorants.

(1) BURUANA. Recherches potentiométriques sur l'enzyme de Schardinger. Thèse, Bucarest, 1935.

(2) Publié également dans les *Annales de Technologie agricole*, t. III, 1940.

et permet d'expliquer le phénomène de la chromo-résistance que nous avons antérieurement décrit. On est ainsi amené à penser que la dose de phosphate retenue présente une certaine importance. C'est sur ce point que nous avons tout d'abord porté notre attention.

On peut, en effet, se demander si, dans les laits microbiens fortement chauffés, les microorganismes enrobés et alourdis de leur revêtement phosphatique, ne vont pas tendre à se séparer, provoquant un appauvrissement du liquide en phosphates minéraux.

Nous avons réussi à mettre en évidence cette instabilité présumée de l'équilibre phosphatique des laits microbiens chauffés soit en les soumettant à une action mécanique, la centrifugation, soit, dans le cas des laits stérilisés, en les abandonnant à l'action de la pesanteur.

Dans le présent mémoire, nous résumerons les études qui ont abouti aux résultats que nous venons d'indiquer. Elles seront groupées sous les trois rubriques suivantes :

Sur la proportion de phosphore minéral du lait fixé par les cellules bactériennes au cours d'un chauffage énergétique ;

Séparation par la centrifugation des cellules bactériennes enrobées de phosphate dans les laits chauffés ;

Séparation spontanée, sous l'action de la pesanteur, des cellules bactériennes enrobées de phosphate dans les laits stérilisés.

Dans nos travaux antérieurs, nous avons surtout porté notre attention sur le *Sc. thermophilus*, espèce bien définie dont l'observation microscopique est particulièrement facile. C'est également à ce microorganisme que nous avons fait appel pour la mise au point des techniques expérimentales qui seront décrites par la suite. Ces techniques une fois établies, nous les avons appliquées à l'étude d'autres agents microbiens choisis parmi ceux que l'on rencontre le plus communément comme agents de la contamination des laits.

SUR LA PROPORTION DE PHOSPHORE MINÉRAL DU LAIT FIXÉ PAR LES CELLULES BACTÉRIENNES AU COURS D'UN CHAUFFAGE ÉNERGIQUE

Pour avoir une idée de la proportion de phosphore fixé à la surface des cellules bactériennes, il nous fallait séparer aussi complètement que possible les corps microbiens du lait dans lequel ils ont été chauffés.

Choix d'une technique de séparation des corps microbiens.

Pour obtenir la séparation recherchée, nous avons tout naturellement fait appel à une centrifugation dans des conditions qu'il nous fallait tout d'abord préciser. A cet effet, nous avons réalisé plusieurs expériences parmi lesquelles nous ne retiendrons que la suivante :

6 godets de centrifugeuse ont reçu chacun 25 centimètres cubes d'un même lait additionné de 400 millions par centimètre cube de *Sc. thermophilus* préparés suivant la technique antérieurement décrite [1]. Ils ont ensuite été maintenus une heure à 100°. Après refroidissement, 3 tubes ont été centrifugés à la vitesse de 4.000 tours à la minute, respectivement pendant 5, 15 et 30 minutes. Les 3 autres ont été soumis pendant les mêmes temps à une centrifugation plus énergique : 9.000 tours à la minute. (Dans les conditions de nos essais, les forces centrifuges développées correspondaient respectivement à 3.000 et 10.000 fois l'action de la pesanteur.) Les culots de centrifugation lavés à l'eau, puis à la soude diluée et de nouveau à l'eau (chaque opération étant suivie d'une centrifugation), ne contiennent finalement que les microorganismes enrobés de phosphate. Mis en suspension dans quelques gouttes d'eau distillée, les corps microbiens sont soumis à un barbotage de gaz carbonique qui dissout le phosphate, puis séparés par une nouvelle centrifugation. Dans le liquide, on dose le phosphore minéral par une méthode classique. Nous avons adopté la méthode de POSTERNAK (en milieu nitrique à froid) [2] qui nous a semblé la mieux appropriée à l'ensemble de nos recherches.

Les résultats des dosages sont groupés dans le tableau suivant :

TABLEAU I

Centrifugation		P minéral en mg. dosé dans le culot de centrifugation
Vitesse en tours à la minute	Durée en minutes	
4.000	5	0,66
	10	1,66
	15	2,58
9.000	5	1,25
	10	4,91
	15	4,91

Le tableau I montre qu'une vitesse de centrifugation de 4.000 tours à la minute, même prolongée pendant une demi-heure, est insuffisante pour séparer la totalité des corps microbiens enrobés. La quantité de phosphore dosée est, en effet, toujours restée inférieure à celle qu'on obtient par une centrifugation plus rapide.

Dans le cas d'une vitesse de 9.000 tours au contraire, on a trouvé les mêmes résultats après 15 ou 30 minutes de centrifugation. On peut en conclure que la totalité des germes enrobés de phosphate était rassemblée dans le culot après 15 minutes. Nous avons donc adopté pour la suite de nos recherches une centrifugation de 15 minutes à la vitesse de 9.000 tours à la minute.

Recherche de la proportion de phosphore minéral fixé à la surface des cellules microbiennes dans le cas des laits chauffés en présence de *Sc. thermophilus*.

Deux échantillons de 25 centimètres cubes de lait sont introduits dans 2 godets de centrifugeuse. L'un d'eux est additionné de *Sc. thermophilus* à raison de 600 millions de germes par centimètre cube. Ils sont portés à 100° pendant une heure, puis centrifugés 15 minutes à 9.000 tours à la minute et traités comme il vient d'être dit.

D'autre part, sur 2 échantillons du même lait préparés comme les précédents, mais non soumis à l'action de la force centrifuge, on dose le phosphore minéral par la méthode de POSTERNAK après défécation par l'acide trichloracétique à 10%.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau suivant :

TABLEAU II

Désignation des échantillons	P minéral en mg.		Pourcentage de P adsorbé par les corps microbiens
	Total	Adsorbé par les corps microbiens	
Lait-témoin	17,55	0,73	4,1
Lait rechargé en <i>Sc. thermophilus</i>	17,44	6,22	35,7

Il est à noter qu'une quantité de phosphore non négligeable — 0,73 milligrammes pour 25 centimètres cubes de lait — a été adsorbée par les corps microbiens dans le cas du lait témoin. Ce chiffre peut paraître anormal. Il s'explique par le fait que le lait sur lequel nous avons expérimenté était déjà largement contaminé : 2 millions de germes par centimètre cube.

Adsorption des phosphates minéraux par divers types microbiens agents habituels de la contamination des laits.

L'expérience précédente a été répétée avec quelques-unes des espèces que l'on rencontre le plus communément parmi les agents de la contamination des laits, notamment *Sc. cremoris*, *Sc. lactis*, et une souche d'*Aerobacter* isolée d'un lait (souche L).

On trouvera ci-dessous quelques-uns des résultats obtenus.

TABLEAU III

Désignation des microorganismes	Nombre de germes ajoutés en millions par centimètre cube	Proportion de P adsorbé pour 100 du P minéral total
<i>Sc. cremoris</i>	100	44,5
<i>Sc. lactis</i>	1.000	43,4
<i>Aerobacter</i> (souche L)	55	18,5

De l'examen du tableau III, il ressort nettement que la proportion de phosphore minéral absorbé au cours du chauffage a toujours été très notable, parfois même considérable.

Enrobage et chromorésistance.

Dans les essais que nous venons de résumer, nous avons pu remarquer que, dans certains cas où l'adsorption des phosphates est révélée par l'analyse, une partie seulement des cellules bactériennes se montre chromorésistante. Parfois même aucune ne présente nettement le phénomène de l'image blanche. On s'explique facilement ce manque de corrélation entre la chromorésistance et l'adsorption phosphatique révélée par l'analyse si, conformément à l'observation précédente, on admet que la proportion de phosphore minéral adsorbé est insuffisante à provoquer à la surface des corps microbiens un revêtement assez épais pour les protéger contre l'action des colorants.

En accord avec cette manière de voir, nous avons d'autre part noté que, parmi les germes enrobés, ceux qui présentent le phénomène de l'image blanche se montrent les plus sensibles à l'action de la force centrifuge.

SÉPARATION PAR CENTRIFUGATION MÉNAGÉE DES CELLULES BACTÉRIENNES ENROBÉES DE PHOSPHATE DANS LES LAITS CHAUFFÉS

Rappelons tout d'abord l'hypothèse que nous avons formulée au début de ce mémoire :

Alourdis par leur charge phosphatique, les microbes enrobés tendraient à se séparer du lait dans lequel ils ont été chauffés entraînant avec eux le phosphate dont ils sont enrobés et à provoquer ainsi un appauvrissement en phosphates solubles et pseudo-solubles du lait surnageant.

De nombreux examens microscopiques nous ont, en effet, confirmé que la séparation spontanée des corps microbiens dans les laits stérilisés abandonnés au repos est effective. Mais elle est lente. Une vérification de notre hypothèse ne mettant à profit pour la séparation des germes que l'action de la pesanteur, ne se prêtait donc pas à une expérimentation rapide. Aussi avons-nous pensé à substituer à l'action trop lente de la pesanteur une action de même nature mais plus énergique qui fut capable, sans altérer sa constitution physico-chimique, de séparer rapidement du lait les microorganismes enrobés. L'idée d'une centrifugation s'imposait.

Choix d'une technique de centrifugation ménagée.

Les appareils dont nous disposions nous permettaient de réaliser des vitesses de centrifugation de 4.000 et 9.000 tours-

minute développant dans les conditions de notre travail des forces centrifuges équivalant respectivement à 3.000 et 10.000 fois l'action de la pesanteur.

De nombreux essais nous ont montré qu'une centrifugation à la vitesse de 9.000 tours à la minute qui sépare rapidement les germes microbiens du lait dans lequel ils ont été chauffés, a le grave inconvénient d'entraîner dans le culot de centrifugation, même pour des temps très réduits et particulièrement lorsqu'il s'agit de laits chauffés, du phosphate des complexes phosphocaséinatiques en quantité appréciable. A 4.000 tours à la minute au contraire, l'entraînement des phosphates des complexes est, au début de la centrifugation, assez réduit pour être considéré comme nul.

Nous avons finalement adopté la technique opératoire suivante qui constitue notre « centrifugation d'épreuve » : 25 centimètres cubes de lait, traité ou non dans les conditions que nous définirons plus loin, sont introduits dans un godet cylindrique et centrifugés pendant 5 minutes à la vitesse de 4.000 tours à la minute. Un culot plus ou moins important se sépare surmonté d'une colonne de liquide que nous divisons en deux portions égales : la portion supérieure, désignée par S, comprise entre la surface et la mi-hauteur de la colonne de liquide, et l'inférieure désignée par I, comprise entre la mi-hauteur de la colonne et le culot. Dans chacune des portions S et I, prélevées séparément et rendues homogènes, nous dosons le phosphore minéral sur 10 centimètres cubes par la méthode de POSTERNAK. On fait également sur chaque portion une numération microbienne par comptage direct sous le microscope.

Rupture, sous l'influence d'une centrifugation ménagée, de l'équilibre phosphatique des laits chauffés en présence de *Sc. thermophilus*.

Dans l'expérience suivante, nous avons soumis à une même centrifugation d'épreuve : un lait cru bactériologiquement propre (éch. n° 1) — le même lait additionné de *Sc. thermophilus* à raison de 120 millions par centimètre cube (éch. n° 2) — le même lait préalablement chauffé à 100° pendant une heure (éch. n° 3) — le même lait additionné de 120 millions de *Sc. thermophilus* par centimètre cube puis chauffé une heure à 100° (éch. n° 4). Les chiffres figurant dans le tableau ci-dessous représentent la proportion de phosphore minéral éliminé par la centrifugation dans les couches S et I. Cette proportion est rapportée à 100 du phosphore minéral initial.

TABLEAU IV

Phosphore éliminé	Ech. 1	Ech. 2	Ech. 3	Ech. 4
Dans la couche S	2	1,3	1,2	38,8
Dans la couche 1	1,1	1	1	1,2

La numération directe sous le microscope sur les échantillons 2 et 4 a donné les résultats rassemblés dans le tableau V.

TABLEAU V

Prélèvement des échantillons	Nombre de germes en millions par centimètre cube de lait		Pourcentage de germes éliminés par la centrifugation du lait	
	Cru	Chauffé	Cru	Chauffé
	Ech. 2	Ech. 4	Ech. 2	Ech. 4
Avant centrifugation	120	120		
Après centrifugation :				
Dans la couche S	110	30	9	75
Dans la couche 1	125	80	0	33

En rapprochant les données des tableaux IV et V, on voit que, dans la couche S, l'élimination des phosphates et la séparation des corps microbiens ne sont importantes que dans le cas de l'échantillon 4 (lait chauffé après addition de 120 millions de *Sc. thermophilus*). Dans le cas du lait additionné de germes, mais non chauffé (éch. n° 2) où l'adsorption des phosphates par les corps microbiens ne s'est pas produite, l'élimination des germes non alourdis par le revêtement phosphatique a été réduite et corrélativement on n'a qu'un appauvrissement insignifiant du lait en phosphates minéraux.

L'ensemble de ces résultats montre bien, dans le cas du *Sc. thermophilus*, que l'élimination des phosphates est sous la dépendance de leur adsorption par les corps bactériens.

Centrifugation ménagée des laits chauffés en présence de quelques agents habituels de la contamination des laits.

La centrifugation ménagée telle qu'elle vient d'être décrite a été appliquée au cas des laits chauffés en présence d'espèces fréquemment rencontrées dans les laits. Les résultats obtenus ont été tout à fait comparables à ceux enregistrés avec *Sc. thermophilus*. Aussi nous sommes-nous bornés à faire figurer dans le tableau VI le pourcentage de phosphore minéral éliminé par la centrifugation des laits chauffés en présence de *Sc. cremoris*, *Sc. lactis*, *Sc. faecium* et notre souche L d'*Aerobacter*.

TABLEAU VI

Désignation des microorganismes	Nombre de germes ajoutés avant chauffage en millions par centimètre cube	Pourcentage de P éliminé de la couche S par la centrifugation
<i>Sc. cremoris</i>	500	42,4
<i>Sc. lactis</i>	400	37,5
<i>Sc. faecium</i>	450	32,7
<i>Aerobacter</i> (souche L)	800	20,2

Comme dans le cas du *Sc. thermophilus*, nous avons pu constater, dans les couches S et I, une corrélation entre la séparation des germes et l'élimination des phosphates.

SÉPARATION SPONTANÉE SOUS L'ACTION DE LA PESANTEUR, DES CELLULES BACTÉRIENNES ENROBÉES DE PHOSPHATES DANS LES LAITS STÉRILISÉS

Ainsi que nous l'avons dit, nous nous étions surtout préoccupés, dans les essais précédents, de réaliser un mode opératoire expéditif permettant de conduire rapidement l'étude entreprise.

Mais, pour vérifier l'hypothèse que nous avions émise, il nous restait à démontrer que l'action de la pesanteur aboutit aux mêmes résultats que nos centrifugations d'épreuve.

Dans le cas où on veut étudier l'action de la pesanteur, qui ne peut être mise en évidence qu'après un temps assez long, il est nécessaire de mettre le liquide à l'abri de toute altération en poussant le chauffage jusqu'à la stérilisation.

Mode opératoire adopté.

25 centimètres cubes d'un lait reconnu bactériologiquement propre par un examen microscopique, additionné ou non de microorganismes, sont stérilisés par un chauffage à 120° pendant 20 minutes en tubes hermétiquement clos de manière à éviter toute évaporation et toute perte de CO², puis abandonnés à la température du laboratoire. Après un temps de repos variable suivant les cas, on prélève à la pipette 10 centimètres cubes du liquide pris en surface en évitant soigneusement de mettre en suspension le dépôt qui s'est formé.

On effectue alors sur cette prise d'échantillon un dosage de phosphore minéral et une numération bactérienne.

On effectue également ces déterminations immédiatement après le chauffage sur des échantillons traités comme les précédents.

Rupture de l'équilibre phosphatique des laits stérilisés en présence de charges variables de *Sc. thermophilus*.

Appliquée à un lait bactériologiquement propre, additionné de

Sc. thermophilus à raison de 50 et 330 millions de germes par centimètre cube, cette technique a donné les résultats groupés dans le tableau VII. Le temps de dépôt des échantillons a été de 21 jours. Pour le lait témoin, nous n'avons pas évalué le nombre de germes éliminés, ceux-ci étant trop peu nombreux pour qu'une numération directe sous le microscope permit de les compter.

TABLEAU VII

Nombre de germes ajoutés au lait en millions par centimètre cube	Pourcentage de P min. éliminés de la portion supérieure du liquide	Pourcentage de germes éliminés de la portion supérieure du liquide
0	1,1	»
50.....	9,6	35
330.....	26,8	60

Nous retrouvons là, entre les pourcentages de phosphore éliminé et de germes séparés, la corrélation que nous avons observée dans le cas des centrifugations ménagées.

La concordance des résultats est parfois saisissante. Dans le cas précédent, par exemple, un échantillon avait été soumis aussitôt après chauffage à la centrifugation d'épreuve antérieurement définie. On avait noté pour la couche S une élimination de phosphore minéral de 24,4% du phosphore minéral total, alors que par repos cette élimination a été de 26,8%. On trouvera dans ce fait une justification *a posteriori* du choix que nous avons fait des conditions expérimentales choisies pour notre centrifugation d'épreuve.

On voit d'autre part que si l'élimination de phosphates résultant du dépôt des corps microbiens enrobés peut être considérable lorsque le lait a reçu un nombre de germes très élevé (330 millions par centimètre cube) elle reste encore très notable, même après un temps de repos limité à 21 jours, lorsque la charge microbienne a été beaucoup plus réduite et de l'ordre de grandeur de celle que l'on peut rencontrer dans un lait de ramassage (pour 50 millions de germes, 9,6% du phosphore éliminé).

Rupture de l'équilibre phosphatique des laits stérilisés en présence de quelques agents habituels de la contamination des laits.

Substituons à *Sc. thermophilus* quelques-uns des microorganismes fréquemment rencontrés dans le lait.

Le tableau VIII nous montre que, dans tous les cas étudiés, les éliminations de phosphore sont sous la dépendance de l'espèce microbienne et aussi, pour une même espèce, du nombre des germes introduits dans le lait (exemple du *Sc. faecium*).

TABLEAU VIII

Désignation des microorganismes	Nombre de germes ajoutés en millions par centimètre cube	Nombre de jours de repos	Proportion min. de P éliminé de la partie supérieure
<i>Sc. cremoris</i>	200	14	25,4
<i>Sc. lactis</i>	550	14	34,2
<i>Sc. faecium</i>	200	20	14,8
<i>Idem</i>	1.000	20	29,5
<i>Aerobacter</i> (souche L)	850	10	15,3

Résumé et conclusions.

Ayant antérieurement démontré que les corps de certains micro-organismes sont capables de fixer par adsorption du phosphate calcique sous l'action d'un chauffage énergique dans du lait cru de vaches, nous avons étudié les répercussions qu'entraîne dans les laits microbiens chauffés cette adsorption phosphatique. Nous avons expérimentalement établi les points suivants :

1° Une proportion importante (40 et même 45%) du phosphore minéral d'un lait peut être adsorbée par les bactéries lactiques et pseudo-lactiques à la faveur d'un chauffage énergique ;

2° Les corps microbiens alourdis par leur enrobage phosphatique se séparent facilement du lait sous l'action d'une centrifugation ménagée incapable à elle seule d'altérer d'une manière sensible la constitution du liquide. La dissociation phosphatique provoquée par l'adsorption microbienne tend donc à rompre l'équilibre physico-chimique du milieu en facilitant sa déphosphatation ;

3° Dans les laits fortement chargés de germes microbiens mais stérilisés avant toute altération appréciable, les corps bactériens enrobés de phosphate se séparent progressivement en se déposant sous l'action de la pesanteur. Les laits stérilisés ne restent donc stables dans leur équilibre phosphatique que s'ils ont été préparés à partir de laits crus dont la propreté bactériologique était satisfaisante.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] G. GUITTONNEAU et M^{lle} M. BEJAMBES (1937, 1938, 1939). Chromorésistance et enrobage phosphocalcique des microbes chauffés dans le lait. *Comptes rendus Académie des Sciences*, 205, p. 1013 à 1015 ; *Annales de Technologie agricole*, t. I, p. 51 à 57 ; *Le Lait*, t. XIX, p. 225 à 234.
- [2] S. POSTERNAK (1920). Sur le dosage de petites quantités d'acide phosphorique à l'état de phosphomolybdate de baryum en présence et en l'absence du phosphore en combinaison organique. *Bull. Société Chim.*, XXVII, p. 507 à 518 et 564 à 568.