

# LE LAIT

REVUE GÉNÉRALE DES QUESTIONS LAITIÈRES

## SOMMAIRE

### Mémoires originaux :

- E. GOIFFON. — Dosage pratique des protides du lait par la mesure colorimétrique de la tyrosine et du tryptophane . . . . . 449
- J. PIEN. — Production biologique des substances concourant à la formation de l'arome du beurre (*Fin*) . . . . . 455
- W. KOPACZEWSKI. — Stabilisation du lait . . . . . 466
- L. COTONI, P. FORGEOT et G. THIEULIN. — Sur les streptocoques des mammites bovines . . . . . 505
- P. MACHEREL. — Contribution aux études sur la graduation des butyromètres à lait, d'après les tra-

voux de A. de VLEES-  
CHAUWER et de H. HEN-  
DRICHK. . . . . 515

### Bibliographie analytique :

- 1<sup>o</sup> Les livres . . . . . 518
- 2<sup>o</sup> Journaux, Revues, Sociétés savantes . . . . . 527

### Bulletin bibliographique :

- 1<sup>o</sup> Les livres . . . . . 546
- 2<sup>o</sup> Journaux, Revues, Sociétés savantes . . . . . 550
- 3<sup>o</sup> Brevets . . . . . 555

### Documents et informations :

- La production mondiale du lait et des produits laitiers pendant les années de guerre . . . . . 556

## MÉMOIRES ORIGINAUX (1)

### DOSAGE PRATIQUE DES PROTIDES DU LAIT PAR LA MESURE COLORIMÉTRIQUE DE LA TYROSINE ET DU TRYPTOPHANE

par

ETIENNE GOIFFON

Ingénieur I. A. N.

Nous avons cherché à doser les protides du lait, selon une méthode rapide et précise (par voie colorimétrique), inspirée de celle qui a été proposée par Wü pour les albumines du sérum sanguin.

### Principe

Son principe est d'utiliser le pouvoir réducteur des noyaux phénols de la tyrosine contenue dans les protides, sur l'acide phosphotungsto-molybdique, donnant une coloration bleue en milieu fortement alcalin.

(1) Reproduction interdite sans indication de source.

Ces noyaux ont la même action, qu'ils appartiennent aux acides aminés libres, ou à ceux qui sont inclus dans les protides complexes.

WÜ et LING ont vérifié à nouveau la valeur de ce procédé et GREENBERG l'a amélioré en employant, au lieu du réactif des phénols de Folin et Denis, jusqu'alors employé, une modification de sa composition par FOLIN et CIOCALTEÛ.

Dans les conditions employées par FOLIN et CIOCALTEÛ, 1 mgr. de tryptophane donne de 88 à 92 % de la couleur fournie par 1 mgr. de tyrosine.

La caséine de Cohn contient 1,4 % de tryptophane et 6,55 % de tyrosine, d'après FOLIN et CIOCALTEÛ. Puisque la valeur chromogène est constante pour une protéine donnée, l'intensité de coloration produite dans les mêmes conditions pourra être utilisée pour la mesure de la quantité de ces protides. Elle doit être déterminée expérimentalement. C'est ainsi que d'après GREENBERG, la coloration obtenue par 1 mgr. de tyrosine correspond à 14 mgr. 4 de globuline, à 16 mgr. 6 d'albumine du sérum humain.

Le dosage des protéines par le réactif des phénols, que WÜ attribuait spécialement aux noyaux phénols de la tyrosine, se fait au moyen du pouvoir chromogène à la fois de la tyrosine et du tryptophane.

A vrai dire cette méthode est très précise quand il s'agit de mesurer la concentration d'une albumine déterminée telle que l'ovalbumine, mais elle a montré des discordances pour le sérum sanguin : non seulement le sérum albumine et la globuline n'ont pas les mêmes teneurs en tyrosine et tryptophane, mais encore la globuline est composée de multiples « globulines », dont la composition n'est pas uniforme.

De plus les protides du sérum sont engagés dans des cénapses glyco et lipoprotidiques en proportion très variable, qui semblent ne pas permettre aux noyaux tyrosine de réagir également avec le réactif des phénols.

Nous avons pensé que la caséine jouit d'une plus grande uniformité de composition, et que ces objections qui ont fait abandonner cette méthode pour le sérum, ne seraient plus valables pour les protides du lait.

Etant donnée la grande simplicité de la réaction nous avons essayé de rendre également simple et facile son application au lait, en réduisant au minimum les opérations de délipidation des protides.

### Réactifs

#### 1. Réactif de Folin et Ciocalteü.

Dissoudre 100 gr. de tungstate de soude :  $\text{Na}^2\text{TuO}^2\text{H}^2\text{O}$  et

25 gr. de molybdate de soude :  $\text{Na}^2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  dans 700  $\text{cm}^3$  d' $\text{H}_2\text{O}$  dans un ballon de 1.500  $\text{cm}^3$ . Ajouter 50  $\text{cm}^3$  d'acide phosphorique sirupeux (85%) et 100  $\text{cm}^3$  d' $\text{HCl}$  concentré. Adapter au ballon un réfrigérant à reflux, par un bouchon en caoutchouc. Faire bouillir doucement pendant dix heures. On ajoute alors 150 gr. de sulfate de lithine, 50  $\text{cm}^3$  d'eau et quelques gouttes de brome liquide. Faire bouillir sans réfrigérant pendant un quart d'heure pour éliminer l'excès de brome.

Refroidir, amener à 1 litre et filtrer. Le réactif a alors une teinte jaune, non verte.

Conserver à l'abri de la lumière.

2. Lessive de soude à 36° B..

3. Ether.

4. Alcool sodé.

### Appareils

Colorimètre ou photolorimètre.

Pipettes de : 1  $\text{cm}^3$ , 5  $\text{cm}^3$ .

Eprouvettes jaugées de 50  $\text{cm}^3$ .

### Technique opératoire

A 1  $\text{cm}^3$  de lait mesuré exactement, placé dans un tube jaugé de 10  $\text{cm}^3$ , on ajoute 4  $\text{cm}^3$  d'alcool sodé (dissoudre 0 gr. 50 de  $\text{NaOH}$  pure dans 100  $\text{cm}^3$  d'alcool à 60°).

On agite en retournant le tube, on ajoute 5  $\text{cm}^3$  d'éther, on agite jusqu'à ce que la lactescence du lait ait disparue, ce dont on s'aperçoit après quelques instants de repos.

En notant la séparation des phases eau-éther, on ajoute goutte à goutte de l'eau jusqu'à ce qu'après agitation la phase aqueuse atteigne 10  $\text{cm}^3$ .

On plonge rapidement une pipette, dont on a obturé avec le doigt l'extrémité supérieure, à travers l'éther, jusqu'à la phase aqueuse.

On prélève 1  $\text{cm}^3$  5 qu'on place dans un ballon jaugé de 50  $\text{cm}^3$ . On ajoute 25  $\text{cm}^3$  d'eau plus 1  $\text{cm}^3$  de lessive de soude, on mélange, on projette rapidement dans ce liquide 3  $\text{cm}^3$  de réactif de Folin et Ciocalteu en mélangeant aussitôt puis on ajoute de l'eau en quantité suffisante pour 50  $\text{cm}^3$ . Il se développe aussitôt une coloration bleue.

Au bout de 5 à 10 minutes on peut doser cette couleur au photomètre avec l'écran rouge. On peut utiliser le colorimètre.

Quand on utilise le photomètre, il faut soustraire, de la densité optique obtenue avec ce liquide coloré, celle qui est fournie par la cuve utilisée, remplie d'eau.

Pour établir ce témoin avec plus d'exactitude, on place dans le godet, un liquide obtenu de la façon suivante : dans un ballon jaugé de 50 cm<sup>3</sup> on met 25 cm<sup>3</sup> d'eau, on ajoute 1 cm<sup>3</sup> de lessive de soude, en agitant, on projette 3 cm<sup>3</sup> de réactif de Folin. Le liquide primitivement jaune, se décolore rapidement, au bout de 10 minutes on ajoute 1 cm<sup>3</sup> 5 de la dilution de lait délipidé et on complète à 50 cm<sup>3</sup>. Le mélange ne doit pas se teinter de bleu.

Nous avons vérifié que des petites quantités d'alcool et d'éther pouvant se trouver incluses dans la prise d'essai après la délipidation éthéro-alcoolique, ne modifiaient en rien l'intensité de coloration obtenue.

### Mesure

Que ce soit au colorimètre ou au photomètre, il faut comparer l'intensité de la coloration à celle obtenue dans les mêmes conditions par une solution de caséine à titre connu.

Il était difficile de proposer d'aborder une méthode simple dans des conditions quelquefois malaisées à réaliser, car la caséine dégraissée et séchée telle qu'on peut l'obtenir dans le commerce se dissout souvent mal même en milieu alcalin, surtout quand elle est vieille. Nous avons pu la réaliser, en utilisant une caséine pure, fraîchement préparée, conservée au froid, et que nous devons à l'obligeance de M. PIEN (Directeur des laboratoires de la S.A.F.R.).

Ceci nous a permis d'établir une relation entre les quantités croissantes de caséine et les densités optiques lues à notre photomètre Bonet-Maury.

Nous avons contrôlé l'exactitude de cette mesure en dosant l'azote d'une solution de protides extraits du lait par notre procédé et en mesurant son pouvoir chromogène au réactif de Folin et Ciocalteu.

Par ailleurs, en déterminant la même relation avec un corps phénolique facile à peser et à dissoudre, nous pouvions établir les corrélations entre le pouvoir chromogène des protides et celui de ce corps et par conséquent proposer l'usage de cette substance comme étalon de référence.

Nous aurions pu comme les auteurs américains, utiliser la tyrosine qui est précisément une des substances que nous nous proposons de doser, mais nous avons jugé plus simple d'utiliser dans le même but la résorcine.

Nous avons vérifié qu'une solution de résorcine pure et sèche à 0 gr. 048‰ d'eau (contenant 2 gouttes de HCl pur pour empêcher son oxydation spontanée) a le même pouvoir chromogène qu'une solution de protides du lait à 1 gr. ‰, traitée dans les mêmes conditions par le réactif des phénols.

On pourra donc se servir de cette solution de résorcine pour les dosages colorimétriques, soit pour étalonner une courbe de photomètre, soit pour faire les comparaisons au colorimètre de Dubosq. Avec le colorimètre de Dubosq, on préparera d'une part une solution étalon contenant 5 cm<sup>3</sup> de la solution de résorcine que l'on traitera en même temps et de la même façon que 1 cm<sup>3</sup> 5 de la solution de lait délipidé.

Si l'on appelle H la hauteur sous laquelle s'observe la liqueur, H' la hauteur du liquide protidique avec laquelle l'égalité de teinte est obtenue, on aura :

$$\frac{H}{H'} \times 5 = \text{nombre de milligrammes de la prise d'essai.}$$

Celle-ci étant de 1 cm<sup>3</sup> 5, il faut multiplier par 666 pour avoir le nombre de grammes de protides par litres.

#### Sensibilité et exactitude de la méthode

Il semble au premier abord inutile d'utiliser une micro-méthode pour le lait dont les quantités disponibles ne sont pas limitées.

Evidemment au point de vue physiologique, le microdosage des protides du lait peut être intéressant chez les petits animaux de laboratoire, car cette méthode peut être aisément réduite à une prise d'essai de 0 cm<sup>3</sup> 5.

Remarquons cependant que nous n'achetons pas la petitesse de la prise d'essai au prix de l'inexactitude du procédé. L'erreur maxima, qui ne peut être due qu'à une inexactitude de la mesure de la prise d'essai ou de la lecture photométrique, ne dépasse pas 5%. Elle est donc aussi précise que toute autre macro-méthode.

Un des procédés les plus démonstratifs de l'exactitude et de la rigueur d'une méthode, consiste à doser des quantités croissantes de la substance à examiner et d'étudier sur un graphique la proportionnalité des valeurs obtenues.

On place sur un système de coordonnées, en ordonnées, les poids de caséine et en abscisse les valeurs colorimétriques.

Remarquons, sur le graphique obtenu, la régularité avec laquelle les points expérimentaux s'inscrivent sur une droite.

Nous avons vérifié avec quelques échantillons de lait de vache, la concordance de notre méthode avec celle que l'on pouvait obtenir avec les dosages azotométriques : pour cela on inscrit le point de rencontre entre la ligne des densités optiques obtenues par voie colorimétrique et le poids des protides obtenu par voie azotométrique.

On voit que ces points s'écartent peu de la quantité de protides indiquée par la courbe colorimétrique.

Densités Optiques

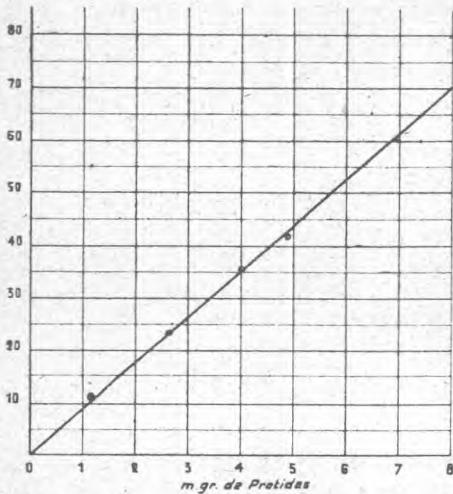


Fig. 1. — Correspondance entre les densités optiques et les poids de protides.

titre en caséine ; il peut s'écouler au plus selon les opérateurs 20 à 25 minutes dont 10 minutes employées pour l'achèvement de la réaction colorée.

Si nous nous sommes servi du photocolorimètre à cellules dans notre travail, on obtient des résultats très satisfaisants avec un simple colorimètre peu coûteux et que l'on trouve dans tous les laboratoires. C'est par là que cette mesure peut devenir d'un emploi courant aux premiers échelons de l'industrie laitière.

## BIBLIOGRAPHIE

- FOLIN et CIOCALTEÛ. On tyrosine and tryptophane determination in Proteins. *Journal Biol. Chem.*, 1.927, 73, 627.
- GREENBERG. The colorimétric determination of the serum proteins. *Journal Biol. Chem.*, 1929, 82, 545.
- WU. A new colorimetric method for the determination of plasma proteins. *Journal Biol. Chem.*, 1.922, 151, 35.
- WU et LING. Colorimetric determination of proteins in plasma cerebrospinal fluid and urine. *Chimic Journal Physiol.*, 1.927, 1, 161.

Il est évident que dans ce dosage est incluse non seulement la caséine, mais encore la lactalbumine.

Mais si nous remarquons que le lait contient 2 gr. de lactalbumine et 30 gr. de caséine, la teneur en tyrosine de ces deux protides étant de même ordre de grandeur, l'erreur ne serait que d'environ 1/15 ce qui est négligeable étant donné l'emploi industriel que nous proposons pour cette méthode.

Un avantage non négligeable de cette méthode est sa vitesse d'exécution depuis le moment où s'opère le prélèvement du lait jusqu'au moment où on obtient le