

V. Conclusion

Malgré les difficultés d'observation et autres qui empêchent que l'examen du lait en poudre au microscope électronique ne devienne une opération de routine, cette recherche nous permet néanmoins d'avoir une idée plus claire de la constitution des particules du lait en poudre. Elle nous montre, en effet, que dans chaque particule les composants du lait se trouvent bien distribués, notamment que la graisse est extrêmement divisée et que certains sels sont cristallisés, alors que le lactose ne l'est peut-être pas.

Les auteurs sont reconnaissants au Chef du Laboratoire de Recherches Scientifiques du Département Fédéral de la Sécurité Publique de Rio de Janeiro d'avoir bien voulu permettre que ces recherches soient faites dans la Section de Chimie Légale, et lui adressent tous les remerciements.

(Rio de Janeiro, juin 1959).

BIBLIOGRAPHIE

- [1] N. BELL RUSSEL. Polarizing microscope. A quality control instrument. *Food Industries*, 20, 1775, 1948.
- [2] N. KING. Torrmjölkens Fysikaliska Struktur. *Svenska Mejeritidningen*, 10, 95, 1949.
- [3] Ch. PORCHER. Le lait desséché, Lyon, 1912. 2^e édition, 1926.
- [4] R. M. WASHBURN. The physical analysis of dry milk. *Journal of Dairy Science*, 5, 388, 1922. (Cité par KING l. c.).

SUR LA MATURATION DES FROMAGES (1)

par

MAURICE BEAU

Ingénieur Agronome

La maturation des fromages est une opération extrêmement compliquée, sur laquelle nous n'avons jusqu'alors que des données très restreintes. Nous savons bien qu'elle est, en majeure partie, due à des diastases ou enzymes secrétées par les microbes et qui agissent sur la caséine de la même façon que le font les enzymes du tube digestif, c'est-à-dire en produisant une digestion de la caséine insoluble du caillé.

En ce qui concerne les enzymes de l'appareil digestif, on en compte au moins trois groupes : la *pepsine*, de l'estomac, la *trypsine*

(1) La plus grande partie du présent travail est basée sur l'étude très détaillée des méthodes de dosage des produits de la maturation des fromages, exécutée à la laiterie d'essai de l'Etat suédois à Alnarp, par le Professeur danois *Mogens T. Sode Mogensen* et publiée dans les *Meddelande fran Statens Mejeri Forsök*, n° 21, 1947, sous le titre : « Bestemmelse af Osten proteolytiske Spaltningsgrad med saerligt Henblick paa Formoltitreringen ».

du pancréas, l'érepsine de l'intestin ; l'action de toutes ces diastases est spécifique, c'est-à-dire que chacune agit sur un groupe déterminé de protides, la pepsine sur les protéines complexes (caséine), la trypsine sur les peptides composés provenant de l'action précédente, enfin l'érepsine sur les peptides simples provenant des actions des deux premières diastases, cette triple action aboutissant aux acides aminés (1).

Dans les fromages, nous sommes bien moins avancés, notamment dans le cas des fromages à pâte molle : nous ignorons quelles sont les diverses sortes de ferments qui agissent et comment ils agissent, c'est-à-dire quels sont, au simple point de vue chimique, les produits de digestion, de décomposition de la caséine auxquels ils donnent naissance dans les différents fromages.

Tout ce que nous pouvons dire, c'est que cette décomposition donne naissance à une série de produits « dégradés », c'est-à-dire moins complexes que la caséine elle-même, et qui, alors que cette dernière est insoluble et insipide, sont, au contraire, solubles et sapides.

En première approximation, ces produits sont les suivants classés par ordre de dégradation croissante :

1. Les peptones ou caséones, qui sont simplement solubles, mais sans goût ni odeur ; leur production paraît être due exclusivement à l'action de la présure, à laquelle il faut éventuellement ajouter l'action dissolvante du sel marin NaCl.

2. Les acides aminés ou peptides, caractérisés par le fait que ce sont les corps ayant à la fois dans leur molécule des groupes carboxylés $\text{COO}-$, donnant naissance à des fonctions acides COOH , et les groupes aminés NH^2- , donnant naissance à des fonctions basiques NH^3 ; ce sont tous des produits odorants et sapides qui donnent leur goût aux fromages et qui sont par suite de première importance.

3. Les ammoniacales composées et l'ammoniaque elle-même combinée ou libre, la présence de celle-ci dénotant un début de putréfaction, à laquelle s'ajoute parfois une saponification des glycérides présents.

Suivant que la maturation est plus ou moins avancée, on obtient des fromages à goût plus ou moins prononcé, plus ou moins agréable. En fait, si l'on dépasse le stade des acides aminés, qui donnent aux bons fromages, bien faits sans exagération, leur goût fin et agréable, le produit devient rapidement immangeable, et tout l'art du fromager doit consister à ne pas dépasser le stade des acides aminés, qui est du reste plus ou moins atteint suivant le genre de fromage.

2) *Waldschmidt Leitz*. Vorträge auf dem Gebiete der Eiweisschemie, Leipzig, 1931.

Il résulte de ce qui précède que la maturation d'un fromage peut être considérée à deux points de vue ; au point de vue de son extension en largeur, et au point de vue de son intensité en profondeur.

L'extension de la maturation en largeur se mesure à la quantité d'azote soluble du fromage par rapport à l'azote total ; c'est ce que l'on appelle le *degré global de maturation* ; il varie de 0 pour les caillés frais à 20 ou 25% pour les fromages à pâte dure et peut monter jusqu'à 80% pour certains fromages à pâte molle.

L'intensité en profondeur de la maturation, c'est-à-dire le *degré effectif de maturation*, se mesure au contraire à la quantité d'azote faisant partie des acides aminés présents dans la pâte ; c'est ce qu'on appelle l'azote aminé et on peut le rapporter, soit à l'azote total du fromage, soit de préférence à l'azote soluble, dont il mesure précisément le degré de dégradation.

Mais si la maturation va trop loin, il se produit de l'ammoniaque et la mesure de celle-ci indique ce qu'on peut appeler le *degré global de putréfaction* du fromage. Cette mesure se fait toujours en dosant l'azote ammoniacal et exprimant le résultat, soit par rapport à l'azote total, soit par rapport à l'azote soluble. Dans le premier cas on compare facilement le degré global de putréfaction au degré global de maturation.

On voit, par ce qui précède, l'importance, au point de vue de la qualité organoleptique des fromages, de la notion d'acides aminés et l'intérêt qu'il y a de savoir à quoi s'en tenir à ce sujet.

Les premières recherches faites sur la maturation des fromages sont les travaux exécutés en France à la fin du siècle dernier et au commencement de celui-ci, et qui n'ont malheureusement pas été suivis depuis d'une façon systématique, malgré que les laboratoires s'occupant de questions laitières soient actuellement bien plus nombreux qu'à cette époque ancienne.

Emile DUCLAUX (3) d'une part, LINDET et AMMANN (4) d'autre part, déterminaient par filtration sur bougie de porcelaine poreuse, d'une solution de fromage dans l'eau distillée, l'azote soluble, l'ammoniaque combinée et libre, enfin les acides gras volatils exprimés en acide butyrique.

Le premier définissait le rapport de maturation par le pourcentage de protéine filtrable par rapport à la protéine totale. Les seconds ne définissaient pas de rapport de maturation, mais il va de soi que, d'après leurs chiffres, on peut facilement le calculer comme ci-dessus. Ni l'un ni l'autre ne déterminaient l'azote des acides aminés libérés par la maturation.

(3) *Le Lait*, Paris, 1889.

(4) *Le Lait*, Paris, 1907.

C'est seulement dans les travaux subséquents qu'on s'est préoccupé de ces derniers, comme représentant tout particulièrement l'intensité de la maturation et l'on a tout d'abord détaillé la classification ci-dessus des produits de dégradation en distinguant :

1. *Les protéines natives*, qui comprennent :

a) Des protéines non transformées, donc insolubles dans l'eau, en suspension dans celle-ci, mais précipitant par la chaleur (lactalbumine) ou les acides (caséine) ;

b) Les protéines solubilisées qui comprennent les polypeptides (peptides à haut poids moléculaire) suivants :

Les protéines primaires (albumoses) précipitant par NO^3H .

Les protéines secondaires précipitant par ZnSO^4 .

Les peptones précipitant par le tannin ou SnCl^2 .

Aucun de ces produits n'a de goût ni d'odeur.

2. *Les protéines dégradées*, qui comprennent :

c) Les oligopeptides (à bas poids moléculaire) précipités par l'acétate de plomb ;

d) Les acides aminés, précipités, les uns par l'hydroxyde de cuivre, les autres (acides diaminés) par l'acide phosphotungstique, les derniers (acides monoaminés) par rien.

3. *L'ammoniaque* libre, précipitée également par l'acide phosphotungstique.

Le tableau I indique les divers produits azotés précipités par chaque réactif et l'on voit que certains présentent des trous à cet égard : l'acide phosphotungstique notamment ne précipite pas les acides (monoaminés) à très bas poids moléculaire, qui sont les plus intéressants au point de vue organoleptique. Nous y reviendrons plus loin.

En tout cas, ce qu'il faut d'abord faire, c'est une *solution de fromage* et la filtrer. Comme dit ci-dessus, on peut faire cette dernière solution dans l'eau pure et c'est ainsi que l'on a opéré jusqu'à ces toutes dernières années. Cette méthode a l'inconvénient de dissoudre, non seulement les produits de dégradation, mais aussi une partie de la caséine, qui est soluble notamment en présence de NaCl . Pour éviter cet inconvénient, SÖNCKE-KNUDSEN et OVERBY (5) dissolvent la totalité du fromage dans le citrate de soude, puis précipitent la caséine non digérée par l'acide acétique au point isoélectrique ($p\text{H} = 4,4$) : MOGENSEN emploie l'acide chlorhydrique, dont il faut une quantité moindre, qui est meilleur marché et qui donne des solutions plus limpides. De plus l'emploi de l'acide

(5) Kong. Veterinaer og Landbohøjskole Aarskrift, Copenhague, 1942.

TABEAU I
PRÉCIPITABILITÉ DES PROTIDES PAR DIVERS RÉACTIFS (MOGENSEN)

Protides	Acide acétique	Acide ferrocyanique	Acide azotique	Sulfate de cuivre	Sulfate d'ammoniaque demi-saturé	Acide sulfosalicylique	Acide trichloracétique	Sulfate de zinc	Sulfate d'ammoniaque saturé	Acide picrique	Chlorure d'étain	Iodure de potassium et de mercure	Acide tannique	Hydroxyde de cuivre	Acétate de plomb	Acide phosphotungstique
Protéines (caséine)	↓															
Polypeptides à hauts poids moléculaires	Protéoses primaires	↓	↓	↓	↓	↓										
	Protéoses secondaires					↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓				
	Peptones (caséone)												↓	↓		↓
Oligopeptides à bas poids moléculaires														↓		
Acides aminés	Acides aminés précipitables par CuO													↓		
	Acides diaminés															↓
	Acides monoaminés															
Ammoniaque															↓	

acétique nécessite que l'on détermine pour chaque fromage, la quantité optimum d'acide à employer : avec HCl au contraire, on peut, quelque soit le degré de maturation du fromage, employer une même quantité fixe d'acide pour obtenir un pH de $4,4 \pm 0,02$.

La solution de citrate de soude s'obtient en dissolvant dans l'eau 105 grammes d'acide citrique cristallisé pur, qu'on neutralise en présence de phénolphthaléine par une solution de soude NaOH à 33,33 %, de densité 1,36 et complétant à 1 litre. Cette solution a un pouvoir tampon très élevé et très régulier, que ne possède pas une solution obtenue avec le citrate de soude cristallisé du commerce, sans doute à cause des variations de la teneur en eau de ce dernier.

La dissolution du fromage dans le citrate dépend de la concentration du fromage, c'est-à-dire du rapport entre la quantité de ce dernier employée par rapport à la quantité de citrate, également de la quantité de produits solubles présents, de l'intensité de brassage du fromage dans le citrate, enfin de la température et de la durée du contact :

10 grammes de fromage finement râpé sont placés dans un bécher au bain-marie à 40-50° et additionnés de 40 cm³ de citrate de soude. On agite avec une baguette de verre garnie à son extrémité d'un bout de tube de caoutchouc permettant d'écraser contre la paroi de verre les morceaux de fromage pour faciliter leur dissolution. On ajoute 50 cm³ d'eau et on laisse au contact une demi-heure jusqu'à complète dissolution. On laisse refroidir, on porte le tout dans un ballon jaugé qu'on complète à 200 cm³. C'est la solution-mère, dont la concentration en fromage est de 5 %, ce qui est le maximum possible, si l'on veut obtenir des solutions claires. La matière grasse monte à la surface et forme, dans le col du ballon, un bouchon qu'il faut, à chaque prise d'échantillon, faire fondre et remélanger d'une façon homogène avec le liquide.

Le dosage de l'azote total se fait comme d'habitude par la méthode Kjehldal sur 10 cm³ de solution correspondant à 0 gr. 5 de fromage.

Puis on ajoute à 100 cm³ de solution de citrate placés dans un ballon jaugé de 125 cm³ à la température de 10-15°, la meilleure pour obtenir un filtrat clair, 10 cm³ d'acide chlorhydrique 1,41 normal, l'addition se faisant à la fin lentement et goutte à goutte. On complète à 125 cm³ ; on filtre en repassant les premiers filtrats pour avoir un liquide bien clair ; la concentration n'est plus alors que de 4 %, ce qui est la meilleure concentration pour la détermination de l'azote soluble tout en conservant la limpidité des filtrats.

Le dosage de l'azote soluble se fait également par la méthode de Kjehldal sur 25 cm³ du filtrat correspondant à 1 gramme de fromage. On l'exprime en pour cent de l'azote total.

Il s'agit maintenant de déterminer le degré effectif de maturation en profondeur (intensité de la maturation). Trois sortes de dosages sont possibles dans ce but : le dosage par polarisation ; le dosage par précipitation ; le dosage par titration.

1. Dosage par polarisation

Les acides aminés, sauf la glycine, ont des atomes de carbone asymétriques et sont par suite optiquement actifs, ainsi que les peptides. Les protides purs sont en général lévogyres (albumoses, peptones), la rotation spécifique αD étant, par exemple pour les peptones, de -100° à -150° .

Les acides aminés sont au contraire, soit lévogyres, soit dextrogyres ; leur ensemble, dans un protéolysat, donne en tout cas une rotation gauche d'autant plus faible qu'ils sont plus nombreux, donc que la décomposition est plus avancée. Connaissant la quantité que chacun présente dans la molécule de caséine, on peut en multipliant cette dernière par la rotation spécifique, calculer le moment optique de l'acide aminé correspondant tel qu'il se présentera dans un protéolysat total de caséine dans l'eau pure.

On trouve ainsi un total de rotation à gauche de $-13^{\circ}61$ contre un total de rotation à droite de $+4^{\circ}97$, soit net une rotation gauche de $\alpha D = -8^{\circ}6$.

Ce dernier chiffre, comparé avec celui obtenu sur un protéolysat quelconque, peut donner une idée de l'avancement de la protéolyse. Cette méthode est applicable aux protéolysats obtenus avec des enzymes digestives telles que pepsine, trypsine, érepsine, etc., agissant sur des protides purs. Elle est plus difficilement applicable aux filtrats obtenus par précipitation chlorhydrique des solutions de fromage dans le citrate de soude, à cause, d'une part, de l'opalescence de ces filtrats, qui rend difficile la lecture au polarimètre, d'autre part de la présence éventuelle dans ceux-ci d'autres produits optiquement actifs, tels que lactose, acide lactique (droit, gauche ou inactif), etc.

Cependant les mesures expérimentales faites sur des filtrats de fromages suffisamment avancés en maturation (10% à 20% d'azote non précipitable par l'acide phosphotungstique) ont donné des résultats en assez bonne concordance avec ceux obtenus après précipitation à l'acide phosphotungstique. Par suite, la méthode polarimétrique peut être employée pour les analyses rapides en série, notamment pour les fromages contenant plus de 12% d'azote Np précipitable par l'acide phosphotungstique ($\alpha D < -65^\circ$).

C'est ainsi que, dans un fromage de deux semaines où Np = 3%, $\alpha D = 90^\circ$ en moyenne, tandis que dans un fromage de Västerbotten, vieux de dix-huit mois, dans lequel le pourcentage d'azote

non précipitable par l'acide phosphotungstique était de 23,6%, on a trouvé $\alpha D = -27^\circ$. Un calcul basé sur les données obtenues par précipitation au tannin, en posant pour le filtrat de protéolyse totale, comme indiqué ci-dessus, $\alpha D = -8^\circ$, a donné $\alpha D = -23^\circ$, c'est-à-dire un chiffre très voisin du précédent.

La méthode est la suivante :

Le filtrat chlorhydrique, obtenu comme indiqué ci-dessus en repassant les liquides jusqu'à obtention d'un filtrat clair, est placé dans le tube polarimétrique de 20 cm. de long : on fait dix lectures successives dont on prend la moyenne et on applique la formule suivante :

$$\alpha D = \frac{\alpha}{b} \times 1.400^\circ$$

où α est l'angle mesuré et b le nombre de centimètres cubes de HCl N/10 employés pour 25 cm³ de filtrat dans l'analyse au Kjehldal.

αD est toujours négatif, mais plus le filtrat contient d'azote non précipitable par l'acide phosphotungstique, c'est-à-dire d'acides aminés à bas poids moléculaires (monoaminés), plus la rotation spécifique est faible. La formule reliant αD exprimé en degrés à la teneur pour cent N_p en azote non précipitable par l'acide phosphotungstique est la suivante $\alpha D = -92,11 + 2,152 N_p$, mais le coefficient de corrélation n'est que de 0,73 ; c'est-à-dire que cette méthode ne peut donner qu'une expression très approximative de la profondeur de la maturation.

En effet, en portant en abscisses le pourcentage d'azote non précipitable par l'acide phosphotungstique et en ordonnées la rotation spécifique des protides solubles ($N \times 6,37$), on obtient une série de points (résultats obtenus sur 140 fromages) se répartissant assez grossièrement autour d'une droite inclinée sur l'axe des x , avec pente dirigée vers les x croissants. Il résulte de là que la méthode est trop peu exacte pour pouvoir servir dans le cas de recherches scientifiques précises et également pour un usage industriel et commercial, par exemple en vue d'un paiement des fromages proportionné à leur maturation.

Mais elle peut donner, surtout à cause de sa rapidité, des résultats intéressants dans le cas de recherches d'orientation, surtout pour les fromages à maturation avancée.

2. Dosage par précipitation

Méthode Orla-Jensen (6). Le dosage, dans le filtrat de l'extrait aqueux, de l'azote soluble total donne le degré de maturation en

(6) *Landwirtschaftliche Jahrbücher der Schweiz*, 1906 et *The lactic acid bacteria*, Kgl. Danske Videnskab. Selskab, 1919.

largeur. On précipite alors l'extrait aqueux par divers réactifs, notamment par l'acide phosphotungstique, ce qui donne une mesure des produits de décomposition à bas poids moléculaires, comprenant les acides aminés, c'est-à-dire le degré de maturation en profondeur.

L'auteur a ainsi trouvé :

Dans un fromage d'Emmental de 28 à 36% d'azote soluble.

Dans un fromage de Backstein très mûr 90% d'azote soluble, dont 16% précipités à l'ébullition — lactalbumine — et 55% par l'acide acétique (caséine).

Méthode Söncke-Knudsen et Overby (5). En opérant comme indiqué ci-dessus, c'est-à-dire en dissolvant la totalité du fromage dans le citrate de soude, puis précipitant la caséine non digérée par l'acide acétique au point isoélectrique ($pH = 4,4$), les auteurs ont trouvé, comme azote soluble : 1% dans un fromage d'un jour et jusqu'à 60% (maximum observé) dans un Stilton.

L'avantage est que l'opération est plus facile à reproduire et qu'on peut déterminer l'azote total dans la solution elle-même.

Méthode Barthel (6). On extrait par pression le jus du fromage et on opère comme ci-dessus. Cette méthode a l'inconvénient de nécessiter un appareillage spécial, mais l'avantage de ne pas modifier, par addition d'eau, l'équilibre salin du fromage, d'où peut dépendre la solubilité des produits.

Cette méthode donne le maximum d'azote soluble, puis vient ensuite le traitement au citrate sous réaction acide, enfin la méthode primitive à l'eau.

Méthode Stutzer (7). On extrait le fromage à l'eau bouillante on filtre puis on précipite successivement par $ZnSO_4$, ce qui donne les protéoses (en réalité les protéoses plus la caséine solubilisée), puis par l'acide phosphotungstique, ce qui donne les acides aminés et l'ammoniaque, le reste étant constitué par les peptides à bas poids moléculaire, et les acides monoaminés.

Méthode Van Slyke (7). L'extrait aqueux est acidifié par HCl et l'azote dosé dans le précipité (caséine) ; on traite le filtrat par $ZnSO_4$ (protéose), puis par le tannin (acides aminés + NH_3 , qu'on détermine à part et soustrait) ; le solde d'azote soluble constitue les peptones. En plus on dose l'azote de la protéine insoluble dans l'eau, mais soluble dans $NaCl$.

Méthode Richmond (7). On opère sur les extraits secs, des filtrats,

(6) *Le Lait*, Paris, 1928 et 1930.

(7) *Richmond. Dairy Chemistry*, Londres, 1942.

déduction faite des cendres et de la matière grasse, en employant d'abord l'hydroxyde de cuivre, ce qui sépare :

Les produits primaires de maturation (paracaséine, protéoses, peptones et acides aminés précipités par Cu).

Les produits secondaires de maturation (acides aminés non précipités par Cu).

La protéine non transformée, différence entre l'extrait sec total et l'extrait sec soluble.

On ne tient pas compte de NH_3 qui disparaît dans le traitement à chaud par le réactif cupro-alcalin.

Comme seuls les acides aminés sont susceptibles de donner un goût aux fromages et ont par suite une importance prépondérante, et que, d'autre part, les ammoniacques composées ou non sont une preuve que la maturation est allée trop loin, il semble que, dans une étude systématique applicable à tous les fromages, on pourrait se borner à mesurer l'azote soluble, l'azote aminé et l'azote ammoniacal, et, pour cela, opérer comme suit :

Faire une solution au citrate de soude, dans laquelle on dosera l'azote total.

Précipiter la solution par HCl et filtrer, ce qui séparera la caséine dissoute et donnera, dans le premier filtrat, l'azote soluble total.

Précipiter le premier filtrat par le tannin, ce qui donnera dans le précipité les peptides à haut poids moléculaire (protéoses et peptones), filtrer :

Précipiter le deuxième filtrat par l'acétate de plomb, ce qui donnera les oligopeptides (à bas poids moléculaires) ; filtrer.

Le solde d'azote, déduction faite de l'ammoniaque, dosée séparément, donnera le total des acides aminés.

On pourrait même supprimer la troisième opération, ce qui amènerait à ne faire que quatre groupes de produit, savoir :

- a) La caséine non attaquée ;
- b) Les protéoses et les peptones (sans saveur) ;
- c) Les acides aminés totaux (arôme et goût) ;
- d) L'ammoniaque (signe de putréfaction).

On calculerait ensuite les rapports suivants :

Le rapport $\frac{b + c + d}{a + b + c + d} =$ Degré global de maturation en largeur (extension).

Le rapport $\frac{c + d}{b + c + d} =$ Degré global de maturation en profondeur (intensité).

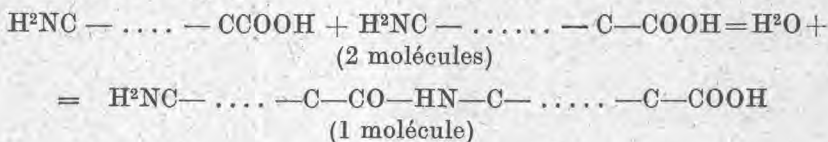
Le rapport $\frac{d}{a + b + c + d} =$ Degré global de putréfaction.

L'inconvénient de ces méthodes de précipitation est qu'il n'y a pas toujours de limites nettes entre les différentes réactions, celles-ci pouvant être influencées par les conditions physiques (température, concentration) et chimiques (pH , sel marin) présentes. Les séparations ne sont pas par suite toujours aussi nettes qu'indiqué ci-dessus, d'où une certaine incertitude dans les résultats. Enfin, ceux-ci ne sont que des résultats globaux, ne permettant pas de connaître les espèces d'acides aminés obtenus et leurs quantités respectives. Or le goût d'un fromage dépend de ces derniers facteurs.

D'autre part il est bien évident que ces différentes méthodes, basées sur des principes différents, ne peuvent pas donner des résultats comparables, et que le besoin se fait sentir d'établir une méthode standard, à la fois simple, rapide, facile à reproduire, économique et donnant une image satisfaisante du degré de maturation des fromages.

3. Dosage par titration

Les acides aminés qui entrent dans la composition de la caséine, sont unis les uns aux autres, comme dans toutes les protéines, par des liaisons dites « peptidiques » obtenues, avec élimination d'une molécule d'eau, par une formule analogue à la suivante (8) :



La liaison peptidique a donc la forme : $-\text{C}-\text{CO}-\text{HN}-\text{C}-$ et la formule de la caséine a la forme indiquée sur la figure 1. Elle est constituée par une chaîne principale présentant de place en place un certain nombre de liaisons peptidiques, sur lesquelles sont greffés les radicaux d'acides aminés indiqués.

Les acides aminés actuellement connus de la caséine sont au nombre d'une vingtaine et leurs pourcentages respectifs sont indiqués dans le tableau II.

(8) *M. Mogensen* a adopté, dans son étude, la structure des acides aminés, dite structure « Zwitterion », proposée par *Bjerrum* (*Zeitschrift für Physikalische Chemie*, 1923) comme formule générale $\text{NH}^3\text{-R-COO}$ au lieu de $\text{NH}^2\text{-R-COOH}$, formule classique, que nous avons gardée pour simplifier.

TABLEAU II
COMPOSITION DE LA CASÉINE

Noms communs et chimiques (9)	Formules chimiques (9)	% dans la caséine (10)
1° Acides aminés monocarboxylés (33,09%) :		
Glycine (A. aminoacétique)	$\text{H}-\text{CH}(\text{NH}^2)-\text{COOH}$	1,85
Alanine (A. aminopropionique)	$\text{H}-\text{CH}^2-\text{CH}(\text{NH}^2)-\text{COOH}$	0,45
Valine (A. aminoisovalérique)	$(\text{CH}^3)^2=\text{CH}-\text{CH}(\text{NH}^2)-\text{COOH}$	7,93
Leucine (A. aminoisocaproïque)	$(\text{CH}^3)^2=\text{CH}-\text{CH}^2-\text{CH}(\text{NH}^2)-\text{COOH}$	7,92
Isoleucine (A. aminométhylvalérique)	$\text{CH}^3-\text{CH}^2-\text{CH}(\text{CH}^3)-\text{CH}(\text{NH}^2)-\text{COOH}$	1,43
Phénylalanine (A. phénylamino-propionique)	$\text{C}^6\text{H}^5-\text{CH}^2-\text{CH}(\text{NH}^2)-\text{COOH}$	3,88
Tyrosine (A. oxyphénylamino-propionique)	$\text{HO}-\text{C}^6\text{H}^4-\text{CH}^2-\text{CH}(\text{NH}^2)-\text{COOH}$	5,70
Sérine (A. aminoxypropionique)	$\text{HO}-\text{CH}^2-\text{CH}(\text{NH}^2)-\text{COOH}$	0,43
Méthionine (A. aminométhylbutyrique)	$\text{CH}^3-\text{S}-\text{CH}^2-\text{CH}^2-\text{CH}(\text{NH}^2)-\text{COOH}$	3,50
2° Acides monoaminés dicarboxylés (36,37%) :		
Acide aspartique (aminosuccinique)	$\text{COOH}-\text{CH}^2-\text{CH}(\text{NH}^2)-\text{COOH}$	4,10
Acide glutamique (aminoglutarique)	$\text{COOH}-\text{CH}^2-\text{CH}^2-\text{CH}(\text{NH}^2)-\text{COOH}$	21,77
Acide hydroxyglutamique (aminohydroxyglutarique)	$\text{COOH}-\text{CH}^2-\text{CHOH}-\text{CH}(\text{NH}^2)-\text{COOH}$	10,50
3° Acides diaminés (15,97%) :		
Arginine (A. diaminoguanido-valérique)	$(\text{NH}^2)-(\text{CH}^2)^3-\text{CH}(\text{NH}^2)-\text{COOH}$	4,84
Lysine (A. diaminocaproïque)	$\text{NH}^2-(\text{CH}^2)^4-\text{CH}(\text{NH}^2)-\text{COOH}$	7,72
Histidine (A. imidazolamino-propionique)	$\text{NH}^2-\text{CH}-\text{CN}-(\text{CH}^2)^2-\text{CH}(\text{NH}^2)-\text{COOH}$	3,39
Cystine (A. diaminothiopropionique)	$\left\{ \begin{array}{l} \text{S}-\text{CH}^2-\text{CH}(\text{NH}^2)-\text{COOH} \\ \text{S}-\text{CH}^2-\text{CH}(\text{NH}^2)-\text{COOH} \end{array} \right.$	0,02
4° Acides divers (10,63%) :		
Tryptophane (A. indolaminopropionique)	$\text{C}^6\text{H}^4=\text{C}^2\text{H}^2\text{N}-\text{CH}^2-\text{CH}(\text{NH}^2)-\text{COOH}$	1,70
Proline (A. pyrrolidinecarboxylique)	$\text{C}^3\text{H}^2\text{N}-\text{CH}-\text{COOH}$	8,70
Hydroxyproline (A. oxypyrrolidinecarboxylique)	$\text{HO}-\text{C}^3\text{H}^2\text{N}-\text{CH}-\text{COOH}$	0,23
5° Produits divers (5,32%) :		
Ammoniaque	NH^3	1,61
Acide phosphorique	P^2O^5	3,71

(9) D'après V. Grignard. Traité de Chimie organique, vol. XIII, Paris, 1941.

(10) D'après Ch. Porcher, Le lait au point de vue colloïdal, Paris, 1931.

On connaît donc la composition de la caséine presque totalement. Toutefois, il faut remarquer que le poids de chaque acide aminé a été obtenu par rupture d'une liaison peptidique avec addition d'une molécule d'eau.

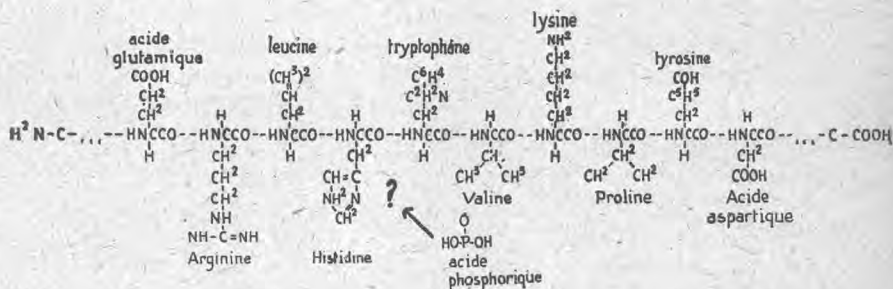
Le phosphore est sous forme d'un radical $P(OH)^3$ (phosphoryle), lié d'une manière inconnue à la chaîne peptidique.

Au total chaque acide aminé étant représenté plusieurs fois, il y a des milliers de molécules d'acides aminés, si bien que la chaîne principale, à l'échelle de la figure, devrait avoir 50 mètres de long.

Remarquons qu'au point de vue organoleptique, le tableau range les acides aminés par ordre croissant d'odeur et de saveur : alors que les acides monoaminés monocarboxylés ont tous un goût douceâtre, les dicarboxylés ont un goût plus prononcé ; l'acide glutamique possède un goût très net de viande cuite ; les diaminés monocarboxylés ont une réaction alcaline avec une saveur tendant vers l'ammoniaque ; la proline a une odeur forte, et le tryptophane, encore appelé indolaloline ou acide amino-acéto-scatoïque est très voisin des produits de putréfaction, puisqu'il donne par fermentation de l'indol et du scatol à odeur très prononcée et désagréable.

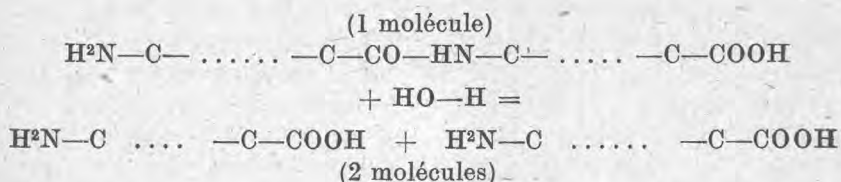
D'après la composition ci-dessus, le poids moléculaire de la caséine serait compris entre 12.000 et 13.000 (10) avec trois atomes de phosphore (9 groupes OH), 83 groupes NH^2 et 114 groupes COOH. Dans l'ensemble la caséine a une réaction acide prédominante. L'intervalle isoélectrique est très petit $pH = 4,5$ à $4,6$.

Fig.1. Représentation schématique de la construction peptidique en chaîne ramifiée de la Caséine.

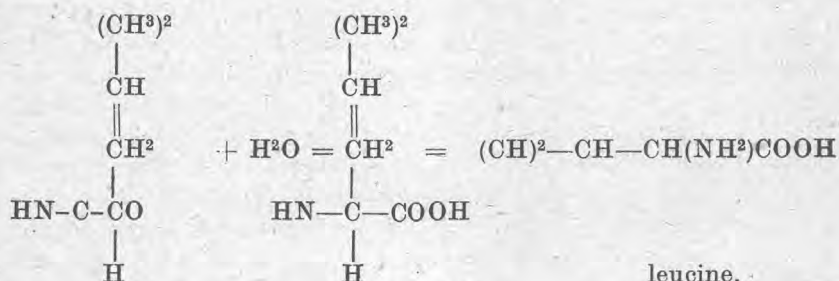


La composition ci-dessus a été obtenue par hydrolyse de la caséine au moyen de réactifs minéraux forts (acides et bases) ou d'enzymes telles que celles secrétées par le tube digestif des animaux ou par les microbes dans la maturation des fromages. Or, cette hydrolyse consiste :

a) Soit à rompre une ou plusieurs liaisons peptidiques de la chaîne centrale avec addition, à chaque rupture, d'une molécule d'eau suivant une formule inverse de celle ci-dessus :



b) Soit à rompre la liaison des radicaux d'acides aminés avec les chaînes peptidiques, en donnant, également, par addition d'une molécule d'eau, l'acide aminé correspondant, par exemple, pour la leucine :



Pour mesurer l'action des enzymes, il n'y a donc qu'à titrer les groupes aminés et carboxylés mis en liberté aux extrémités des chaînes peptidiques dans l'une ou l'autre des réactions (a) et (b). Puisque les quantités de valences basiques d'une part, acides de l'autre, sont équivalentes, les résultats des deux titrages exprimés en équivalents de base et d'acide, sont nécessairement égaux.

On détermine les groupes aminés libres par le formol (méthode de S.P.L. Sørensen (11) en titrant par la soude NaOH l'acidité du formol avant et après l'addition du filtrat.

On détermine les groupes carboxylés libres par l'acétone (méthode Linderström-Lang) (12) de la même façon, mais avec l'acide chlorhydrique.

Dans les deux cas 1 milliéquivalent de base ou d'acide correspond à 1 milliéquivalent d'azote.

Ces deux méthodes sont facilement applicables tant qu'il ne s'agit que de mono-peptides, c'est-à-dire d'acides aminés mono-

(11) Meddelelser fra Carlsberg Laboratorium, Copenhagen, 1925, 1927, 1928 et 1932.

(12) Meddelelser fra Carlsberg Laboratorium, Copenhagen, 1907 et Zeitschrift für physiologische Chemie, 1909.

aminés et monocarboxylés. Toutefois une action peptidique, qui coupe une molécule en deux suivant la formule (a) donne le même résultat qu'une action peptidique séparant une chaîne latérale de la chaîne principale suivant la formule (b) ; dans les deux cas, il y a libération d'un groupe aminé et d'un groupe carboxylé.

Par suite le titrage au formol (ou à l'acétone) n'est pas une mesure spécifique de la formation d'acides aminés par rupture des ramifications latérales, d'autant moins que cette rupture peut s'accompagner de la rupture de la chaîne principale, soit au total mise en liberté de trois groupes acides et basiques.

Autrement dit, le résultat obtenu donne la somme de l'azote des acides aminés libérés et de l'azote de tous les polypeptides libérés en même temps, c'est-à-dire une expression directe des liaisons peptidiques rompues suivant les formules (a) et (b).

D'autre part il n'est pas possible d'appliquer directement aux fromages les méthodes ci-dessus, en particulier, celle de Sørensen de titrage au formol, à cause de la présence, dans les filtrats, d'une part de corps minéraux, tels que carbonates et phosphates, susceptibles de donner des ions H qui sont titrés simultanément, d'autre part, d'ammoniaque résultant d'une maturation très poussée (putréfaction). On peut, il est vrai, éliminer cette dernière par borbottage d'air, mais c'est une opération extrêmement longue et pas toujours complète. Enfin le titrage au formol ne donne que des différences, car il faut connaître le titrage au départ, ce qui est possible dans l'étude de l'action progressive d'une enzyme, mais ne l'est pas toujours dans le cas des fromages pour lesquels on ne connaît en général pas le titrage au départ, au sortir du moule.

Pour toutes ces raisons, MOGENSEN, après avoir étudié très en détail les courbes de titrage dans un nombre considérable de fromages, a mis sur pied la méthode suivante d'opération, dite « méthode au formol réduit », en la comparant notamment, avec la méthode de précipitation par l'acide phosphotungstique.

Méthode Sørensen « au formol réduit »

25 cm³ du filtrat précédemment obtenu par précipitation au moyen de HCl, sont additionnés de 5 gouttes (0 cm³ 25) de phénolphtaléine à 2% et neutralisés avec 2 cm³ 6 de soude normale ; puis on ajoute avec précaution de la soude N/10 jusqu'à obtention de la même couleur rouge qu'une solution de fuchsine correspondante à une solution tampon de borate de soude de pH = 8,3.

A ce moment on ajoute 10cm³ d'une solution de formol à 30-40%, puis deux gouttes de phénolphtaléine et on titre en retour jusqu'à la même couleur, c'est-à-dire jusqu'au même pH.

Le chiffre obtenu, correspondant à 1 gramme de fromage et

corrigé de la quantité de base nécessaire pour neutraliser le formol ajouté, est désigné par le terme : pourcentage de l'azote « au formol réduit » par rapport à l'azote total (%NfR). On en déduit le pourcentage d'ammoniaque obtenu par distillation du filtrat en présence de carbonate de baryum.

Méthode Orla-Jensen à l'acide phosphotungstique

50 cm³ du même filtrat sont additionnés de 25 cm³ d'une solution de 100 grammes d'acide phosphotungstique pour analyse par litre. On complète à 100 cm³ avec de l'acide sulfurique à 25 volumes pour cent ; on laisse reposer à la glacière et on filtre. Dans 50 cm³ du filtrat tout à fait clair on dose l'azote par la méthode Kjelhdal, correspondant à 0 gr. 5 de fromage et on exprime le résultat en l'appelant : pourcentage d'azote non précipitable par l'acide phosphotungstique (%Np) ; c'est, d'après le tableau I, une mesure des oligopeptides à bas poids moléculaires des acides aminés précipitables par le cuivre et des acides diaminés (ainsi que de l'ammoniaque), mais pas des acides monoaminés.

140 fromages ont été ainsi comparés ; ils étaient constitués par les types suivants : Svecia, Herregaard et Stilton. Portant en abscisses les chiffres obtenus par la méthode au formol, en ordonnées ceux obtenus par la méthode à l'acide phosphotungstique, on constate que les points obtenus se répartissent de part et d'autre et très près d'une ligne droite inclinée sur l'axe des X ; la fonction correspondante est une fonction linéaire :

$$\%NfR = -0,779 + 1,002 = \%Np$$

avec un coefficient de corrélation très voisin de 1 (0,96) et une erreur moyenne de 0,0239.

Pour donner une idée de ce que représente cette méthode « au formol réduit », nous reproduisons deux des nombreux graphiques publiés par l'auteur donnant les courbes de titrage d'une part d'un acide aminé pur, la leucine (fig. 2), d'autre part d'un filtrat de fromage à 47,5% d'azote soluble (fig. 3) ; en abscisses sont portées les valeurs du pH, en ordonnées les quantités de soude correspondantes, en milliéquivalents de NaOH par millimolécule d'azote total. Les trois courbes sont :

1. La courbe de titrage en solution aqueuse (traits « continus »).
2. La courbe de titrage en solution formolée (tr. « interrompus »).
3. La courbe de titrage « au formol réduit » (tr. « pointillés »).

On voit facilement :

1° Que les deux graphiques ont la même allure générale, la première partant d'un niveau de neutralisation obtenu avec

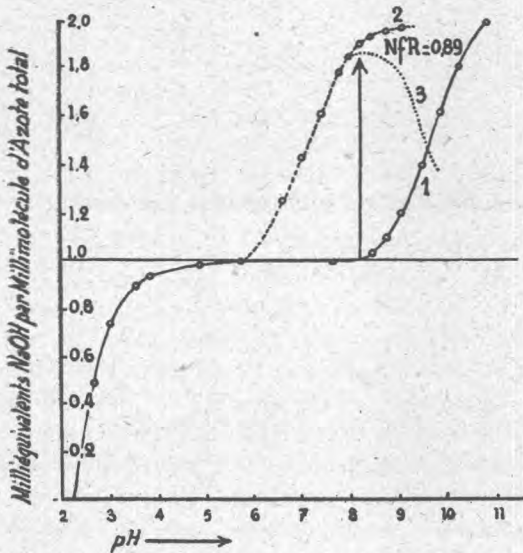


Fig2 Courbes de titrage de la leucine.

c'est le point où le titre au formol réduit est le plus grand (0,235) et où sa variation est la plus faible de part et d'autre de ce pH ; c'est donc le point où l'exactitude du titrage est le plus grand, d'où le choix de ce pH pour opérer.

4° Que, pour la leucine, au pH = 8,3 on titre environ 90 % de ce corps et

il en est de même de la plupart des acides aminés, y com pris l'ammoniaque elle-même, mais avec les exceptions suivantes :

Tyrosine	100 %
Tryptophane	45 %
Proline	25 %
Arginine	22 %
Histidine	18 %

1 de NaOH, la seconde, d'une niveau de neutralisation égal à 0.

2° Que les courbes « au formol réduit » représentent pratiquement la différence entre les deux autres courbes (2-1), c'est-à-dire qu'elles donnent la différence entre le titre en solution formolée et le titre en solution non formolée.

3° Que la courbe « au formol réduit » passe par un maximum pour pH = 8,3 ;

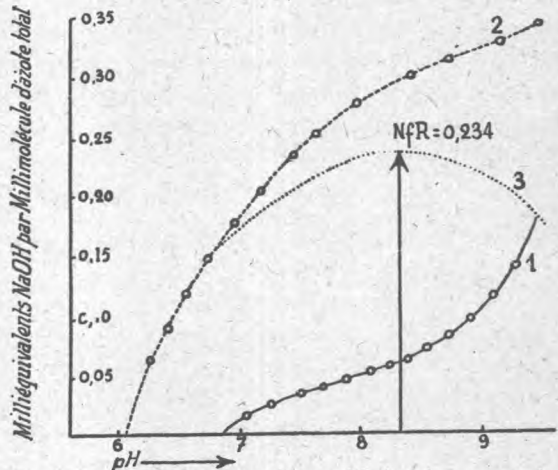


Fig3. Courbes de titrage d'un filtrant chlorhydrique provenant d'un fromage à 47,5 % d'azote soluble

En conséquence, la méthode « au formol réduit » peut remplacer celle à l'acide phosphotungstique, évidemment plus compliquée qu'un simple titrage colorimétrique. Son avantage vient aussi de ce que, dans les cas où se trouvent en présence les corps non protidiques susceptibles de donner les ions de même nature que ceux provenant des protides, il n'y a pas besoin d'éliminer ces ions au préalable. C'est le cas des fromages qui contiennent des carbonates et des phosphates que, dans la méthode primitive au formol non réduit, il faut d'abord précipiter par le chlorure de baryum. Les ions fournis par ces sels se trouvent en effet titrés tant au début qu'à la fin de l'opération et leurs titrages s'annulent par suite.

Dans les fromages de 1 jour, NfR = 0,5, ce qui est par suite le point de départ de la protéolyse ; le maximum (NfR = 33,0) a été trouvé dans un fromage de Stilton. Il est probable que l'on trouverait les chiffres encore plus élevés dans les fromages à pâte molle bien mûrs.

Des diverses considérations auxquelles se livre MOGENSEN, il résulte que la méthode au formol réduit enregistre de préférence les groupes aminés des acides aminés libres et seulement une petite partie des produits de décomposition à haut poids moléculaire (polypeptides), ce qui fait qu'elle n'est pas utilisable dans le cas de mesures de digestions peptiques ou tryptiques.

Par contre, lors de décompositions tant soit peu profondes, cette méthode peut être utilisée avec avantage, notamment lorsqu'on veut déterminer le degré de décomposition protéolytique par la quantité d'acides aminés libres (et d'ammoniaque). C'est le cas des fromages, pour lesquels il se produit une sorte de sélectivité, telle que les résultats obtenus par cette méthode donnent une mesure de haute valeur de la teneur en acides aminés proprement dits.

Afin de le démontrer, des quantités de divers acides aminés purs et même d'ammoniaque ont été ajoutés à un filtrat chlorhydrique de titre « au formol réduit » connu et ce titre mesuré et calculé après addition en se basant sur les résultats déjà obtenus avec les acides aminés purs. La concordance entre la mesure et le calcul furent excellents.

Solution d'acides aminés ajoutés	NfR de la solution après addition	
	Mesuré	Calculé
Histidine	0,14	0,15
Arginine	0,22	0,23
Leucine	0,86	0,89
Lysine	0,88	0,89
Ammoniaque	0,93	0,92

* * *

De tout ce qui précède, on peut tirer les conclusions suivantes :

1. Le travail de MOGENSEN ne résout pas évidemment toutes les questions posées au début, ni même, jusqu'à un certain point, celle de la détermination de l'intensité de maturation des fromages ; elle ne la résout que d'une manière fortuite. Ainsi que l'auteur le dit lui-même, la concordance entre les deux méthodes employées, celle au formol réduit et celle à l'acide phosphotungstique, paraît due à un hasard ; d'après ce hasard la quantité d'acides aminés qui n'est pas mesurée dans la première méthode(13) est égale à la quantité d'ammoniaque et d'acides monoaminés qui n'est pas mesurée dans la seconde.

Mais cette concordance, constatée pour des fromages à pâte dure, se maintiendra-t-elle pour des fromages à pâte molle tels que le Camembert ou le Brie, mûrs à point ? Plus généralement on ne peut pas compter sur le hasard pour balancer exactement dans un dosage deux actions contraires ou différentes.

2. Il reste que ce très important travail, qui ne comporte pas moins de 150 pages grand format, est bourré d'idées et de faits relatifs à la maturation des fromages et ouvre de nombreux horizons nouveaux à cet égard. Il ne peut passer inaperçu de tout chercheur qui reprendra la question et de ce fait il est susceptible de rendre d'énormes services. C'est pourquoi nous avons cru devoir en donner une idée aux lecteurs de langue française.

3. Le véritable problème consisterait à mesurer ensemble ou mieux séparément, les quatre groupes du tableau II :

Les groupes monoaminés monocarboxylés et dicarboxylés, à saveur douce ou acide, qui prédominent sans doute dans les fromages à goût peu prononcé (Gruyère, Hollande, Cheddar, Tilsitt, Saint-Paulin).

Le groupe des acides diaminés à saveur plus prononcée, qui s'y ajoutent probablement dans les fromages à pâte molle à maturation plus profonde (Camembert, Brie, Livarot, Maroilles, Backstein).

Le groupe des acides divers et de l'ammoniaque, qui apparaissent dans les fromages franchement avancés, quels que soient leur nom et leur origine, et auxquels s'ajoutent, dans les fromages très vieux, l'acide butyrique (Parmesan).

Tout ceci en attendant que l'on arrive à déterminer, pour chaque espèce de fromage, quels sont les acides aminés particuliers

(13) Dans un protéolysat total de caséine on estime que cette quantité atteint 30%, c'est-à-dire la quantité totale d'acides monoaminés monocarboxylés présents.

qui lui donnent son odeur et son goût spéciaux, caractéristiques et qui les distinguent les uns des autres.

Mais nous sommes évidemment encore fort loin de ce but idéal à atteindre.

PROPHYLAXIE CONTRE LA TUBERCULOSE BOVINE, PRODUCTION LAITIÈRE ET « B.C.G. » (1)

par

G. THIEULIN

Parmi les maladies qui font payer un lourd tribut à la production animale, à l'élevage, et, en particulier, à l'exploitation du troupeau bovin français, la tuberculose se situe en bonne place si elle n'en constitue pas le souci majeur.

Du fait de cette maladie, la production de la viande et du lait voit son rendement abaissé, par diminution de quantité et de qualité, et les pertes qui en résultent correspondent au degré même de la gravité de l'infection. Les régions agricoles sont diversement frappées, en raison des conditions variables de vie des animaux, mais, dans certaines d'entre elles, la proportion des animaux atteints dépasse 30 %.

Il convient toutefois de considérer :

1. Qu'il ne s'agit pas, le plus souvent, d'animaux porteurs de lésions décelables cliniquement.
2. Que le test d'appréciation quant à l'existence de l'infection est couramment celui fourni par la réaction à l'épreuve de la tuberculine.
3. Qu'un animal réagissant positivement à cette épreuve peut présenter les signes extérieurs d'une parfaite santé et se trouver dans un excellent état d'engraissement.
4. Qu'un tel animal peut ne révéler, à l'autopsie, que des lésions discrètes ou même sembler n'en pas présenter du tout.
5. Qu'enfin, un animal paraissant en excellent état et réagissant positivement à l'épreuve de la tuberculine (épreuve que, dans ce cas, rien n'incite à pratiquer), peut se révéler porteur de lésions organiques considérables capables de rendre sa viande totalement inutilisable pour la consommation.

Nous avons personnellement souvenir de deux magnifiques bœufs gras, primés au Concours Général Agricole de Paris, qui

(1) L'essentiel de cet article a paru dans *L'Industrie laitière*, 1950, 40, 3.