



# LE LAIT

## REVUE GÉNÉRALE DES QUESTIONS LAITIÈRES

### SOMMAIRE

#### Mémoires originaux :

L.-M. BURUIANA et A. FOSTIROPOL. — Sur le mécanisme de l'action coagulante de la chymosine . . . . .	593
G. THIEULIN et D. BASILLE. — L'inspection sanitaire du lait ( <i>suite</i> ) . . . . .	600
J.-C. GODFRAIN et D. TRACALIS. — Application d'une méthode sinacide de dosage de la matière grasse du lait aux produits laitiers . . . . .	606
D <sup>r</sup> Dj. FILIPOVITCH et M <sup>me</sup> D. FILIPOVITCH. — Recherches sur la teneur en chlore du lait et sa valeur dans le diagnostic des diverses mammites bovines et celui du lait pathologique . . . . .	608

#### Bibliographie analytique :

1 <sup>o</sup> Les livres . . . . .	613
2 <sup>o</sup> Journaux, Revues, Sociétés savantes . . . . .	629
3 <sup>o</sup> Brevets . . . . .	672

#### Bulletin bibliographique :

1 <sup>o</sup> Les livres . . . . .	675
2 <sup>o</sup> Journaux, Revues, Sociétés savantes . . . . .	676

#### Documents et informations :

M. BEAU. — La situation laitière . . . . .	684
Décret n <sup>o</sup> 56-887 du 4 septembre 1956 relatif au paiement du lait selon sa teneur en matière grasse . . . . .	686
Utilisation du lait écrémé sec et de la caséine alimentaire en boulangerie aux Etats-Unis . . . . .	687
L'ensilage et la production laitière . . . . .	688
II <sup>e</sup> Symposium sur les matières étrangères et éléments synergiques dans les aliments . . . . .	690
La consommation de la margarine augmente au Danemark, mais n'a pas encore atteint son niveau d'avant guerre . . . . .	693
Production d'entremets sucrés du type « Mellorine » aux Etats-Unis, en 1954 . . . . .	693
Première Assemblée générale du Centre Expérimental du Froid . . . . .	694
Table des matières . . . . .	695
Table des auteurs . . . . .	699
Table des ouvrages analysés . . . . .	719

## MÉMOIRES ORIGINAUX (1)

### SUR LE MÉCANISME DE L'ACTION COAGULANTE DE LA CHYMOSINE

par

L. M. BURUIANA et A. FOSTIROPOL

La coagulation du lait sous l'influence des divers extraits d'origine animale et végétale est un phénomène connu et utilisé depuis longtemps dans la technique alimentaire et industrielle.

(1) Reproduction interdite sans indication de source.

Malgré les multiples et diverses recherches effectuées jusqu'à présent, le mécanisme intime de cette transformation est encore à préciser. C'est avec raison que C. OPPENHEIMER écrit : « Mit der Besprechung des Labfermentes treten wir in eines der dunkelsten Gebiete der Fermentlehre ein. » Et plus loin : « Hier ist die Kardinalfrage noch zu lösen ob nämlich das Lab als eigenes Ferment überhaupt existiert und wenn, wohin es zu stellen und wie es zu definieren ist » [1].

L'opinion généralement admise aujourd'hui attribuée à une enzyme appelée ferment lab, présure, chymosine, rénine, caséase, etc., cette transformation qui a pour substratum spécifique, une protéine du lait, la caséine. La coagulation de la caséine s'effectuerait en deux étapes : la première a un caractère purement enzymatique, une protéolyse et la seconde colloïdale (pectisation suivie par synérèse). Un rôle important dans la coagulation de la caséine est attribué à ses particularités concernant sa composition chimique et à la configuration stérique de sa molécule. C'est une phosphoprotéine, le groupement prosthétique étant constitué par la phosphatidyl-sérine [2] et en plus petite mesure par la phosphatidyl-thréonine [3] [4]. D'après notre avis, il faut insister sur l'existence des groupements esthers-phosphoriques et probablement polyphosphoriques dans les molécules de la caséine, étant donné que l'hydrolyse et la formation de la liaison phosphorique changent le niveau énergétique et la valeur des fonctions thermodynamiques du système constitué par les macromolécules de cette substance. Les récentes recherches expérimentales et théoriques de R. I. PODOLSKY et M. F. MORALES [5] et S. A. BERNHARD [6], montrent que l'hydrolyse de toutes les liaisons phosphoriques se solde par une libération d'énergie et que, en plus, cette énergie n'est pas plus petite que celle de l'hydrolyse de l'acide adénosine-triphosphorique qu'on considère comme le prototype de « high energy bound » constituant des milieux biologiques.

Il faut insister aussi sur le fait que la caséine a un caractère nettement acide du, en plus des hydroxyles de l'acide phosphorique, aux groupements carboxyliques et phénoliques. En plus, comme l'ont signalé, pour la première fois, P. RADENHAUSEN et A. DANILEWSKY [7], la caséine n'est pas un composé unitaire mais bien un mélange que les recherches électrophorétiques ont bien confirmé. On peut trouver des détails intéressants sur cette question dans la monographie de Z. ZELTER [8].

Dans le lait, la caséine existe sous la forme d'un complexe caséinate de chaux + phosphate de chaux. C'est un complexe qui subit l'action de la chymosine, transformation bien connue de la

coagulation. Ce complexe a une structure variable avec l'espèce comme nous avons pu le démontrer [9].

Les théories sur la coagulation peuvent se rattacher aux suivantes.

1. — *Théorie de O. HAMMARSTEN.*

D'après ce savant, la coagulation de la caséine est due à la fragmentation de la molécule sous l'action protéolytique de la chymosine. Les fragments polypeptidiques qui en résultent donnent naissance à des sels de chaux, insolubles, qui s'organisent dans un gel de structure réticulaire.

2. — *Théorie de M. BEAU [10].*

La chymosine dépolymérise le complexe caséinate de chaux + phosphate de chaux, avec mise en liberté des groupements carboxyles, amines et phosphoryles. Il se produit d'une part une combinaison entre les groupements carboxyles et les ions de calcium et, d'autre part, entre les oxydriles phosphoriques et les groupements aminiques. Il en résulte un polymère, la paracaséine, à grand poids moléculaire et à structure organisée, tridimensionnelle.

3. — *La théorie de la dénaturation de N. J. BERRIDGE [11].*

D'après cette théorie, la chymosine exerce une action protéolytique sur le complexe caséinate de chaux + phosphate de chaux, en hydrolysant certaines liaisons chimiques dans la structure native de la caséine. Il se produit des molécules métastables, dénaturées. Ces molécules, très réactives [12] [13], déclenchent un processus autocatalytique avec des réactions en chaîne [14] [15]. Il en résulte des polypeptides réactives qui se combinent entre elles et aussi avec des molécules de caséine natives. Les grandes micelles formées se gélifient aisément, donnant un coagulum avec structure réticulaire.

On voit qu'entre les trois théories, n'existe, en dernière analyse, qu'une différence de nuance. Il en ressort que le rôle de la chymosine peut être comparé à une amorce, qui déclenche le processus autocatalytique, se poursuivant ensuite sans aucune influence extérieure et dont l'énergie de réaction est fournie par la structure même de la caséine. Le rôle important dans le bilan énergétique est joué, d'après notre avis, par les liaisons esthers-phosphoriques, fait qui trouve sa confirmation dans les recherches de G. T. PUNE [16], qui a établi que la  $\beta$ -caséine qui ne contient pas de phosphore n'est pas coagulée par la chymosine. D'autre part, nos recherches sur le rôle activateur des mucopolysaccharides [17] sur la coagulation par la chymosine, font ressortir encore plus nettement l'importance

des esters-phosphoriques sur la vitesse de coagulation. La coagulabilité est d'ailleurs une propriété caractéristique des phosphoprotéines.

Les nombreuses recherches sur la coagulation du lait par la chymosine ont fait ressortir l'influence frappante de la température sur la vitesse de coagulation [18][19]. Le coefficient thermique de Van't Hoff est anormalement grand ( $Q^{10} = 14$ ), ce qui s'observe surtout dans les réactions ioniques et non dans celles enzymatiques.

En plus, on connaît les irrégularités de la coagulation par la présure, la vitesse de coagulation variant en limites très larges pour la même préparation labique avec la composition individuelle du lait, ce qui a conduit J. SUMMER à caractériser très suggestivement l'appréciation de l'activité de la chymosine par les mots suivants : « Is one of the easiest enzyme determination to carry out, and one of the most difficult to standardize » (« est une des enzymes les plus faciles à déterminer et une des plus difficiles à standardiser ») [20].

Toutes ces considérations et d'autres encore sur lesquelles nous avons insisté en une autre occasion [21], nous conduisent à émettre l'hypothèse que la coagulation labique n'est pas un phénomène enzymatique, mais, purement chimique. L'action de la chymosine consisterait à dénuder les molécules de caséine de leur couche protectrice. La différence entre le caractère nettement acide de la caséine et les autres composants du lait et surtout les protéines, justifie l'apparition, par le jeu des valences semipolaires, covalences, ponts d'hydrogène, etc., d'une couche mono-moléculaire à la périphérie de la macromolécule de caséine. Par l'hétérogénéité du milieu et de sa composition, la structure de cette couche est variable, ce qui explique l'inconstance de la même préparation labique, quant à l'activité coagulante, envers les laits d'origine différente et même envers le lait du même individu, trait à des époques différentes. La standardisation de la méthode de dosage de l'activité de préparations labiques ne serait possible que si on réussissait à préparer des solutions de caséine, identiques du point de vue de la configuration stérique macromoléculaire et implicitement de la couche protectrice tapissant la macromolécule de caséine.

La molécule ainsi dépourvue de protection ou dénaturée, devient réactive en amorçant le processus autocatalytique de polymérisation.

Si à l'aide des moyennes adéquates on empêche la formation de la combinaison entre la protéine labique et la couche protectrice de la molécule de caséine, la coagulation peut être entravée partiellement ou totalement.

Nous avons pu réaliser ces conditions par l'action compétitive de certaines substances protéiques. En ajoutant dans le lait, avant

la chymosine, certaines fractions protéiques du sérum, nous avons réussi à inhiber totalement l'action coagulante. Nous avons précisé [22] [23] l'effet quantitatif des diverses fractions protéiques du sérum de cheval. La fraction la plus active s'est montrée, la fraction des pseudoglobulines (correspondant surtout à la fraction  $\alpha$ -globulinique), 60 milligrammes étant capables d'inhiber complètement l'effet de 1.000 milligrammes de présure Hansen à 1/100.000<sup>e</sup>. L'effet inhibiteur des globulines peut expliquer pourquoi le lait de femme et le colostrum, riche en globuline, ne coagulent pas sous l'action de la chymosine.

L'action des globulines serait due à l'affinité plus grande de celles-ci envers la protéine labique en comparaison avec la protéine de la couche protectrice de la molécule de caséine. Evidemment, pour vérifier cette hypothèse, il serait nécessaire d'effectuer des vérifications directes, comme, par exemple, de mettre en évidence l'existence du complexe « chymosine cristallisée + pseudoglobuline cristallisée », à l'aide de moyens adéquats (poids moléculaire, comportement électrophorétique, groupement N-terminaux, etc.). Ce problème nous préoccupe d'ailleurs présentement.

D'autre part, l'altération, par des moyens chimiques, de cette couche pourrait conduire à des résultats semblables. Nous avons pu vérifier le fait, en ajoutant dans le lait de petites quantités de bicarbonate de soude, qui peut annihiler complètement le pouvoir coagulant de la chymosine. (Voir tableau I.)

En étudiant électrophorétiquement les protéines du lait traité avec du bicarbonate de soude dans les mêmes conditions que plus haut, on constate une altération nette de leur comportement, alors caractérisé par la variation quantitative des fractions protéiques et surtout de la caséine [24]. Le fait confirme que l'intégrité de l'édifice moléculaire de la caséine, et surtout de son état périphérique, peut influencer l'action de la chymosine.

D'ailleurs, H. Luck et F.-I. Joubert [25] ont montré, à l'aide du microscope électronique, que l'effet inhibiteur de l'eau oxygénée sur la coagulation du lait par la présure, correspondait avec la modification du contour de la molécule de caséine sous l'action de l'eau oxygénée.

### Conclusions

1<sup>o</sup> La coagulation du lait par la chymosine n'est pas une réaction enzymatique, mais purement chimique ;

2<sup>o</sup> La chymosine serait une substance protéique qui se combine avec le complexe qui « protège » la molécule de caséine native et passe en solution. La « dépréciation » de la molécule de caséine provoque sa dénaturation. La réactivité de la caséine, ainsi dénaturée,

TABLEAU I  
INFLUENCE DU BICARBONATE DE SOUDE SUR LA COAGULATION DU LAIT PAR LA PRÉSURE

	Propriétés du lait			Temps de coagulation (en minutes et secondes)						
	Densité à 15°	Matière grasse %	Acidité (degrés Thörner)	Bicarbonate de soude ajouté en grammes						
				0	0,05%	0,1%	0,2%	0,3%	0,4%	0,5%
1.....	1,0317	4,1	16,9	7 m	9 m 25 s	11 m 31 s	60 m 5 s	60 m 7 s	200 m	néant
2.....	1,032	3,9	16,9	5 m 26 s	6 m 11 s	9 m	60 m 6 s	200 m	néant	néant
3.....	1,031	4,6	17,5	10 m 50 s	18 m 20 s	25 m 54 s	60 m	70 m	200 m	néant
4.....	1,0312	3,8	17,5	9 m 10 s	26 m 48 s	28 m 14 s	31 m 10 s	33 m	200 m	néant
5.....	1,031	4,4	17,5	9 m	11 m	15 m 25 s	17 m 30 s	20 m 7 s	70 m	200 m
6.....	1,033	4,2	17,5	8 m 24 s	15 m 30 s	—	22 m 5 s	41 m	55 m	200 m

N. B. — La détermination du temps de coagulation a été faite, dans les cas où l'on ajoute du bicarbonate, après rétablissement de l'acidité initiale avec de l'acide chlorhydrique N/10.



augmente, ce qui se traduit par le déclenchement de la réaction autocatalytique de polymérisation. Les groupements phosphoriques jouent un rôle important dans l'état énergétique du système macro-moléculaire constitué par la caséine ;

3° Nos recherches [23] ont démontré que l'action de la chymosine, pouvait être inhibée par l'action compétitive d'autres protéines, spécialement les pseudoglobulines du sérum ;

4° Le bicarbonate de soude, en dénaturant le complexe protecteur de la molécule de caséine, empêche la formation de la combinaison « chymosine + complexe protecteur », ce qui se traduit par l'inhibition de la coagulation du lait par la chymosine.

Cette action du bicarbonate de soude a été démontrée par le comportement électrophorétique différent de la caséine du lait traitée par cette substance [24].

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] C. OPPENHEIMER. *Die Fermente und Ihre Wirkungen*. G. Thieme, Leipzig, Ed. V. Bd. II, 1926, p. 977.
- [2] S. PASTERNAK. *Biochem. Journal*. 1927, **21**, p. 287.
- [3] S. RAPPOPORT. *Biochem. Z.* 1937. Bd. 289, p. 420.
- [4] C. H. VERDIER. *Nature*. 1952, **170**, p. 804.
- [5] R. I. PODOLSKY and M. F. MORALES. *Journal of Biol. Chem.* 1956, **218**, p. 945.
- [6] S. A. BERNHARD. *Journal of Biol. Chem.* 1956. **218**, p. 961.
- [7] P. RADHAUSEN und A. DANILEWSCHI. *Forschungen auf dem Gebiete des Viehhaltung*. Bremen, 1880, H. 9, p. 155.
- [8] Z. ZELTER. *Le Lait*, 1953, **328**, p. 481, **329-330**, p. 594.
- [9] L. M. BURUIANA et D. JONESCO. *Contributions à l'étude de calcium dans le lait*. 1941. Bucarest, **1**, 35 pages.
- [10] M. BEAU. *Le Lait*. 1941, **21**, p. 113.
- [11] N. J. BERRIDGE. *Nature*. 1942, **149**, p. 194.
- [12] A. KLECZKOWSKI. *Brit. Journal Exptl. Path.* 1941, **22**, p. 188.
- [13] F. C. BAWDEN et A. KLECZKOWSKI. *Brit. Journal Exptl. Path.* 1941, **22**, p. 208.
- [14] A. FISCHER. *Enzymologia*. 1937, **1**, p. 353.
- [15] F. W. BERNHART. *Journal Physiol. Chem.* 1941, **45**, p. 1382.
- [16] G. T. PYNE. *Chem. Ind.* 1951, **9**, p. 171.
- [17] L. M. BURUIANA, Gh. BUNESCU et J. CUCUI. L'action directe des extraits tissulaires sur la chymosine et la parachymosine. Studii si Cercetari. Académie R.P.R. Timisoara, Anul II. 1956, n° 1-4, p. 81.
- [18] J. MORGENROTH. *Zentr. Bakt. Parasitenk.* 1899, Bd. 26, p. 349.
- [19] E. FULD. *Biochem. Z.* 1907, Bd. 4, p. 54.
- [20] J. SUMMER et K. MYREÅCK. *The Enzymes*. 1951. Academic Press Inc. Publishers, **1**, part. 2, p. 1086.
- [21] L. M. BURUIANA. La parachymosine et ses propriétés. *Ref. Med. Vet.* Arad. 1954, p. 50.

- [22] L. M. BURUIANA et Gh. BUNESCU. L'influence des protéines sériques sur l'activité de la chymosine et la parachymosine. *Ref. Med. Vet. Arad.* 1953, p. 12.
- [23] L. M. BURUIANA, Ch. BUNESCU et El. HADARAG. L'influence des protéines sériques sur quelques protéinases. *Com. Academie R.P.R.*, 1955, 5, nr. 4, p. 671.
- [24] A. FOSTIROPOL. Comportement électrophorétique des protéines du lait sous l'action du bicarbonate de soude. Communication à la Session scientifique de l'Institut d'Hygiène de l'Académie de R.P.R., juin 1956.
- [25] H. LÜCK et F. I. JOUBERT. *Milchwissenschaft.* 1955. Jahr. X. H. 17, p. 370.

## L'INSPECTION SANITAIRE DU LAIT

par

G. THIEULIN et D. BASILLE

(Suite)

### III. — MÉTHODE D'APPRÉCIATION DE LA QUALITÉ MOYENNE D'UNE FOURNITURE DE LAIT PASTEURISÉ

Dans un texte antérieur, nous avons montré que la thermographie et l'épreuve de la phosphatase permettaient une inspection préventive du lait pasteurisé, un tel contrôle devant être mené, à la fois, par les services officiels et par les techniciens, professionnels responsables des usines de pasteurisation.

D'autre part, nous avons comparé diverses épreuves bactériologiques utilisables pour apprécier la qualité hygiénique d'un échantillon de lait pasteurisé, et nous avons insisté sur la signification des résultats obtenus, ceci étant encore plus important que cela si l'on veut éviter les conclusions erronées.

Nous croyons nécessaire, maintenant, de dégager une notion complémentaire, indispensable au contrôle courant.

A défaut de pouvoir analyser journallement un nombre important d'échantillons, nous admettons que, selon les modalités habituelles de fonctionnement des usines de pasteurisation, des examens par sondage sont capables de nous renseigner sur la qualité courante des fournitures livrées par lesdites usines.

Cette opinion serait entièrement fondée si des conditions préalables d'installation et d'équipement, portant « présomptions favorables de garantie » étaient imposées en France, comme elles le sont dans les pays où l'hygiène du lait a été rationnellement établie.