

# LE LAIT

REVUE GÉNÉRALE DES QUESTIONS LAITIÈRES

## SOMMAIRE

### MÉMOIRES ORIGINAUX :

C. ALAIS. — L'Action de la présure sur la caséine . . . 481

J. RAŠIĆ et S. MITIĆ. — Contribution à l'étude de l'activité antibiotique des souches de culture du yoghourt . . . . . 489

J. LENOIR. — Note sur la composition en matières azotées des fromages affinés de Camembert, Saint-Paulin et Gruyère de Comté . . . . . 500

### Supplément technique :

G. GENIN. — L'emploi des plastiques pour l'emballage des produits laitiers . . . 507

### BIBLIOGRAPHIE ANALYTIQUE :

1<sup>o</sup> Les livres . . . . . 529

2<sup>o</sup> Journaux, Revues, Sociétés Savantes . . . . . 537

3<sup>o</sup> Brevets . . . . . 567

### BULLETIN BIBLIOGRAPHIQUE :

1<sup>o</sup> Les livres . . . . . 573

2<sup>o</sup> Journaux, Revues, Sociétés Savantes . . . . . 573

3<sup>o</sup> Brevets . . . . . 579

### DOCUMENTS ET INFORMATIONS :

Journée d'Etude et d'Information sur l'importance de la matière azotée du lait. . . 582

Du lait cru de haute qualité 589

Communiqués . . . . . 591

## MÉMOIRES ORIGINAUX (1)

### L'ACTION DE LA PRÉSURE SUR LA CASÉINE (2)

par C. ALAIS

Station Centrale de Microbiologie et Recherches Laitières  
Jouy-en-Josas (S. et O.)

*Première Partie*

#### LE PROBLÈME DE LA RÉACTION SPÉCIFIQUE ET DU SUBSTRAT

Notre étude de l'action de la présure sur la caséine trouve son point de départ dans les conclusions d'une précédente série de travaux [1] sur les défauts de coagulation de certains laits ; il semble que la caséine elle-même doit être mise en cause. La néces-

(1) Reproduction interdite sans indication de source.

(2) Extrait de la thèse d'Ingénieur-Docteur (Paris, 1962). Les résultats et la discussion feront l'objet d'un second article.

sité de mieux connaître le processus de la coagulation du lait par la présure s'est ainsi imposée ; nous l'avons envisagé sous l'angle biochimique.

Les premiers travaux importants concernant le mode d'action de la présure sur la caséine ont été faits, il y a bientôt un siècle, par HAMMARSTEN et cependant ce phénomène n'est pas encore complètement élucidé. On ne peut écrire aujourd'hui, comme C. OPPENHEIMER il y a 30 ans [1] : « Mit der Besprechung des Labfermentes treten wir in eines der dunkelsten Gebiete der Fermentlehre ein » (1) mais on doit reconnaître qu'il reste encore des obscurités dans ce domaine. Le but de notre travail est d'essayer d'en dissiper quelques-unes.

Dans la succession des travaux les plus marquants, on peut distinguer quatre étapes principales (2).

1. Reconnaissance de la nature enzymatique de l'action de la présure.
2. Preuves de l'hétérogénéité de la caséine et théorie du colloïde-protecteur décomposé par la présure.
3. Distinction nette des deux stades de la coagulation et étude du stade enzymatique (réaction primaire) à l'aide de la présure cristallisée.
4. Conception du substrat spécifique, à la suite des nouveaux travaux sur le fractionnement de la caséine (caséine  $\alpha$ ).

I. — Avant les publications de HAMMARSTEN il n'y avait que des hypothèses confuses sur le mode d'action des enzymes de coagulation : présure et thrombine. Ce chercheur a montré en 1872 pour la présure [6] en 1876 pour la thrombine [7] qu'il s'agissait d'actions enzymatiques, provoquant une protéolyse limitée, en milieu neutre, indépendantes du processus de coagulation proprement dit, lequel exige la présence de sels de calcium.

Dans le cas du lait, HAMMARSTEN [8] a appelé « Molkeneiweiss » ou « Molkenalbumose » (en France on dit « Protéose de Hammarsten ») la partie de la caséine qui est détachée par la présure et qui est retrouvée dans le lactosérum ; elle forme environ 5 p. 100 de la caséine originelle. Depuis, l'action de la présure sur la caséine native est représentée sous la forme schématique :

(1) « Avec l'étude de la présure nous pénétrons dans un des domaines les plus obscurs de l'enzymologie. »

(2) Outre l'ouvrage de C. Oppenheimer, il existe plusieurs revues des connaissances sur la présure et son action : [3], [4] et [5].

## Présure

Caséinate de calcium  $\longrightarrow$  para-Caséinate de Calcium + Protéose  
 (« soluble ») (Insoluble) (soluble)

HAMMARSTEN n'a pas étudié la protéose, ni prouvé que sa formation était indispensable à la coagulation. La théorie de HAMMARSTEN a été appuyée par les nombreux travaux de PORCHER [9], avec ses « laits synthétiques » (phosphocaséinate de calcium).

Les progrès dans l'étude du substrat ont souvent précédé ou accompagné les progrès dans l'étude de la réaction. HAMMARSTEN considérait la caséine de vache comme une protéine homogène [10] ; par une méthode de préparation, qui est encore la plus suivie aujourd'hui, il retrouvait toujours la même composition élémentaire (C = 52,96 H = 7,05 N = 15,65 P = 0,85 S = 0,72 et, par différence O = 22,77). Cependant dès cette époque l'hypothèse avait été formulée que la caséine est un mélange de plusieurs substances, et, plus tard, un constituant alcool-soluble a été étudié [11].

II. — Une deuxième étape a eu pour point de départ les travaux des chercheurs du Laboratoire de Carlsberg à partir de 1925. En étudiant la solubilité de la caséine dans l'acide chlorhydrique et l'alcool dilués, LINDERSTRÖM-LANG [12], [13] a caractérisé 7 fractions K1, K2, K3... qui se différencient notamment par leur teneur en phosphore et par leur aptitude à précipiter ou à rester en suspension en présence de faibles quantités de calcium. Ayant ainsi montré l'hétérogénéité du substrat, cet auteur, puis HOLTER [14] ont énoncé la théorie la plus satisfaisante du mécanisme de l'action de la présure :

« un constituant de la caséine entière (K 3) doit jouer le rôle de « colloïde protecteur » en maintenant à l'état dispersé l'ensemble du caséinate de calcium originel ; la présure, dans un premier stade, dégrade spécifiquement ce constituant, où le modifie d'une manière telle qu'il devienne inactif ; la suspension colloïdale est détruite et le caséinate de calcium floccule ; c'est le deuxième stade. »

Il est à noter qu'une hypothèse du même genre avait été émise longtemps auparavant par ALEXANDER [15] mais elle faisait intervenir comme protecteur la lactalbumine. Des travaux nombreux, entrepris depuis cette époque, ont apporté des appuis sérieux à cette théorie, notamment ceux de NITSCHMANN et LEHMANN [16].

Au cours d'une série de travaux commencés en 1932, CHERBULIEZ et coll. ont retrouvé l'hétérogénéité de la caséine en la fractionnant par les sels [17]; ils ont émis l'hypothèse originale [18] que leur fraction «  $\delta$  » n'était autre que la protéose de HAMMARSTEN; celle-ci ne serait donc pas un produit de dégradation de la caséine; plus tard ils ont précisé leur théorie [19] d'après laquelle la présure séparerait des paracaséines par coupure de liaisons non-peptidiques.

Les méthodes physiques d'analyse : ultracentrifugation [20] et électrophorèse [21] ont confirmé l'hétérogénéité de la caséine. Les 3 composants électrophorétiques de MELLANDER [21] ont été préparés par diverses méthodes [22] [23]: caséines  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . Ces constituants ne représentent qu'une étape dans la difficile étude de la constitution de la caséine isoélectrique, comme nous le verrons plus loin.

III. — Une distinction nette des deux stades successifs du phénomène global de la coagulation a été faite par BERRIDGE [24]; on peut définir :

a) Un stade enzymatique, au cours duquel la présure attaque la caséine et en solubilise une petite partie; le coefficient de température  $Q_{10}$  est compris entre 2 et 4; la réaction n'exige pas la présence des ions calcium; elle se produit encore à 0°C. On l'appelle également « réaction primaire ».

b) Un stade de coagulation, qui touche la plus grande partie des substances provenant de la réaction précédente; avec un coefficient de température élevé: 1,3 à 1,6 par degré, qui correspond à une réaction de dénaturation. Cette réaction « secondaire » est extrêmement lente au-dessous de 10°C.

L'étude de la réaction primaire a été rendue plus rigoureuse avec l'emploi de la présure pure, que BERRIDGE est parvenu à cristalliser [25]. L'interférence d'autres enzymes, notamment la pepsine était écartée. Avec des solutions de caséinate alcalin, on dissocie la réaction primaire de la réaction secondaire. Nous avons apporté une contribution à l'étude de la réaction primaire en mesurant la libération de l'azote non protéique (N.P.N.) en fonction du temps écoulé après l'emprésurage [26]; on peut ainsi distinguer la réaction primaire, qui est spécifique, d'une réaction de « protéolyse générale » qui n'est pas spécifique. Par cette méthode, NITSCHEMANN et coll. ont pu étudier la cinétique de la réaction primaire [27] et montrer que la caséine  $\alpha$  la subit mais non pas la caséine  $\beta$  [28]. On n'a pas encore clairement démontré que cette dernière réaction est vraiment une protéolyse. L'étude des résidus

N-terminaux de la caséine modifiée par la présure (ou paracaséine) n'a, jusqu'ici, pas apporté de lumière sur cette question.

Au début de l'action de la présure sur la caséine il se produit une chute faible, mais brusque de la viscosité [29] [30]; SOHNGEN et coll. l'attribuent à une diminution de l'hydratation de la caséine [29] HANKINSON et PALMER [31] pensent que la première action de la présure consiste en une diminution de l'hydratation et une réduction des charges électrocinétiques, deux facteurs de stabilité; à ces modifications physiques est attribuée la sensibilité élevée de la paracaséine aux ions calcium. Une telle propriété peut découler de l'action enzymatique et apparaître comme la conséquence de la modification chimique du substrat.

La réaction primaire et la coagulation dans son ensemble, se produisent avec la pepsine comme avec la présure [19] [32]; mais l'activité de la pepsine est moins spécifique; elle libère des quantités notables de N.P.N. avec la caséine  $\beta$  [33], alors que la présure n'en donne que très peu dans les mêmes conditions. (La pepsine est peu utilisée en fromagerie; elle coagule mal le lait frais et elle donne des caillés et des fromages affinés ayant des propriétés différentes de ceux produits au moyen de la présure).

Pendant cette période, de nombreux travaux ont été accomplis sur la caséine à l'état natif, sur les relations des différents constituants de la caséine entre eux et avec les sels. Nous ne les mentionnons pas ici, car ils ne sont pas en rapport étroit avec notre sujet (1).

IV. — La dernière étape est celle de la conception d'un substrat spécifique de la présure, dans la réaction enzymatique; conception résultant de nouveaux travaux sur la composition de la caséine. Les fractions de MELLANDER [21] ne sont pas homogènes. La caséine a été fractionnée à son tour. Les constituants les plus intéressants, à notre point de vue, forment le groupe des caséines « insensibles au calcium »: caséine  $\chi$  de WAUGH et V. HIPPEL (36), caséines  $\alpha_2$  et  $\alpha_3$  de McMEEKIN et coll. [37] [38] et caséine  $\lambda$  de LONG et coll. [39]. La distinction entre ces fractions obtenues par différentes méthodes de précipitation, n'est pas nette. Ce type de constituants s'oppose à celui des constituants sensibles aux ions  $\text{Ca}^{++}$ , qui précipitent de leur suspension en présence de faibles quantités de calcium:  $\alpha_s$ ,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_r$  ...

WAUGH a montré que la caséine  $\chi$  a des propriétés stabilisantes pour les autres constituants, vis-à-vis du calcium [36]; elle empêche leur précipitation. Elle représente environ 15 p. 100 de la caséine entière. Cet auteur a émis l'hypothèse que la présure agirait spéci-

(1) Des revues d'ensemble se trouvent dans les références [3], [34], [35].

fiquement sur la caséine  $\kappa$  (qui se présenterait ainsi comme le colloïde protecteur de LINDERSTROM-LANG) et il a donné un schéma hypothétique des micelles de caséine [40]. GARNIER [41], WAKE [42] et TSUGO et YAMAUCHI [43] ont appuyé cette hypothèse en montrant que la caséine privée de la fraction  $\kappa$  ne donne pas de N.P.N. sous l'action de la présure.

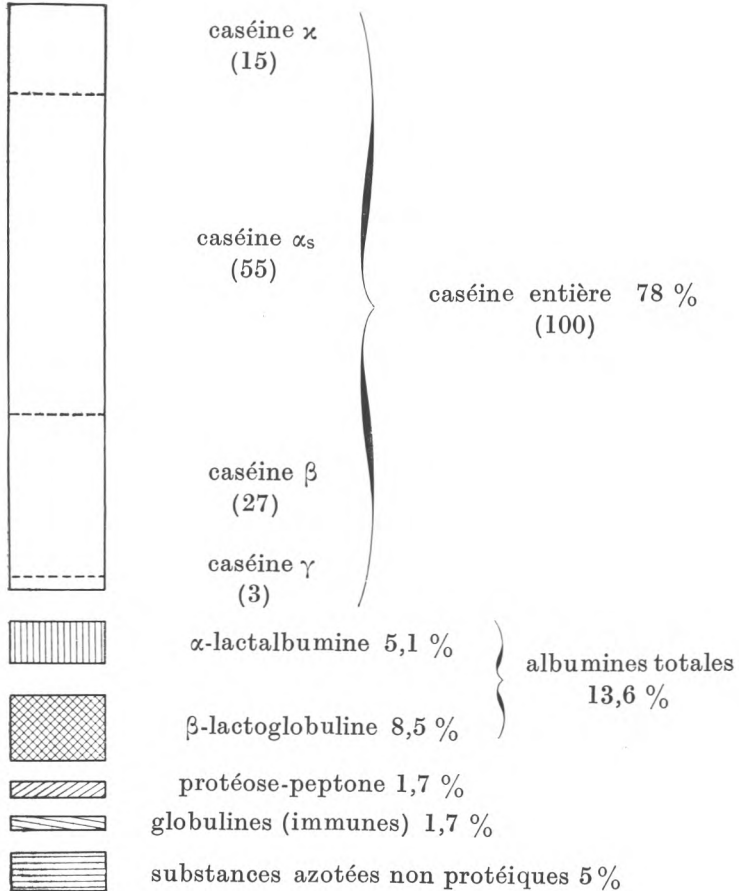


Fig. 1

### LA COMPOSITION AZOTÉE DU LAIT DE VACHE

Notre contribution à l'étude de l'action enzymatique de la présure sur la caséine a pour buts de vérifier si la caséine  $\kappa$  se comporte comme un substrat spécifique et de déterminer le mode

d'action de la présure par l'étude des produits de la réaction. Le rôle des composants glucidiques, en particulier l'acide sialique, sera mis en évidence.

Nous avons isolé et purifié le plus important produit soluble de la réaction et nous avons étudié sa composition et, en partie, sa structure. Nous l'avons dénommé : « caséino-glycopeptide » ; c'est la substance qui forme la presque totalité de la partie non-peptidique soluble dans l'acide trichloracétique à 12 p. 100 de concentration finale. C'est également le plus abondant des peptides que NITSCHMANN et HENZI [44] ont trouvé dans la partie soluble à pH 4,6 (point isoélectrique de la caséine), après action de la présure sur la caséine entière ou la caséine  $\alpha$ .

Nous avons également étudié la caséine  $\kappa$  et la paracaséine  $\kappa$ . Enfin nous avons fait des expériences comparatives avec la caséine provenant du lait d'autres espèces animales et avec la caséine humaine.

La composition azotée du lait est rappelée dans la figure 1 ; les nombres représentent des moyennes dans le lait de vache. Les proportions relatives de la caséine entière et des autres substances azotées varient peu dans les laits des différents ruminants : vache, chèvre, brebis... La proportion de la caséine  $\kappa$  dans la caséine entière n'a été déterminée (approximativement) que dans celle du lait de vache. Les valeurs indiquées pour les constituants de la caséine entière sont déduites des études par électrophorèse en phase liquide à pH 12, de WAUGH et V. HIPPEL [36]. Par chromatographie en présence d'urée, des valeurs un peu différentes ont été obtenues [45].

#### RÉSUMÉ

Dans la première partie de cette publication on a exposé les données essentielles, acquises jusqu'à ces dernières années, relatives à la constitution de la caséine et au processus de la coagulation. On a, d'autre part, indiqué les buts des recherches entreprises sur le mode d'action de la présure et sur les produits solubles formés aux dépens de la caséine.

#### SUMMARY

##### The action of rennin on casein

*Part I : The problem of the specific reaction and of the substrate*

The main data, known up to now, relative to casein and the processes concerned in its coagulation, are assembled in the first



part of this publication. The objects of research undertaken on the mode of action of rennin and the soluble products of its reaction on casein are indicated.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] G. MOCQUOT, C. ALAIS et R. CHEVALIER. — *Ann. Technologie Agricole*, 1954, **2**, 1.
- [2] C. OPPENHEIMER. « Die Fermente und Ihre Wirkungen », Leipzig, 1926.
- [3] G. T. PYNE. *Dairy Sci. Abstr.*, 1955, **17**, 531.
- [4] N. J. BERRIDGE. In *Advances in Enzymology*, **15**, 423-446 (F. Nord Edit.) Interscience Publisher, New-York, 1954.
- [5] N. J. BERRIDGE. In *Methods in Enzymology*, **2**, 69-77 (S. P. Colowick and N. O. Kaplan Edit.), Academic Press New York, 1955.
- [6] O. HAMMARSTEN. *Jahresber. Fortschr. Thierchem.*, 1872, **2**, 118.
- [7] O. HAMMARSTEN. *Upsala Läkareförhandl.*, 1876, **11**, 538.
- [8] O. HAMMARSTEN. *Jahresber. Fortschr. Thierchem.*, 1874, **4**, 135.
- [9] Ch. PORCHER, *Lait*, 1930, **10**, 417, 509, 667, 794, 900 et 1011.
- [10] O. HAMMARSTEN. *Z. Physiol. Chem.*, 1883, **7**, 227 et 1885 **9**, 273.
- [11] T. B. OSBORNE et A. WAKEMAN. *J. Biol. Chem.*, 1918, **33**, 7.
- [12] L. LINDERSTROM-LANG et S. KODAMA. *C. R. Trav. Lab. Carlsberg*, 1925 **16**, n° 1.
- [13] L. LINDERSTROM-LANG. *C. R. Trav. Lab. Carlsberg*, 1929, **17**, n° 9.
- [14] H. HOLTER. *Biochem. Z.*, 1932 **255**, 160.
- [15] J. ALEXANDER. *8th Int. Cong. Appl. Chem.*, 1912, **4**, 12.
- [16] Hs. NITSCHMANN et W. LEHMANN. *Helv. Chim. Acta*, 1947 **30**, 804.
- [17] a) E. CHERBULIEZ et M. C. SCHNEIDER. *Helv. Chim. Acta*, 1932, **15**, 597.  
b) E. CHERBULIEZ et F. MEYER. *Helv. Chim. Acta*, 1933, **16**, 600.
- [18] E. CHERBULIEZ et J. JANNERAT. — *Helv. Chim. Acta*, 1939, **22**, 959,
- [19] E. CHERBULIEZ et P. BAUDET. — *Helv. Chim. Acta*, 1950, **33**, 1 673.
- [20] T. SVEDBERG, L. M. CARPENTER et D. C. CARPENTER. *J. Am. Chem. Soc.* 1930, **52**, 241 et 701.
- [21] O. MELLANDER. *Biochem. Z.*, 1939, **300**, 240.
- [22] R. C. WARNER. *J. Am. Chem. Soc.*, 1944, **66**, 1 725.
- [23] N. J. HIPPI, M. L. GROVES, J. H. CUSTER et T. L. McMEEKIN. *J. Dairy Sci.*, 1952, **35**, 272.
- [24] N. J. BERRIDGE. *Nature*, 1942, **149**, 194.
- [25] N. J. BERRIDGE. *Biochem. J.* 1945, **39**, 179.
- [26] C. ALAIS, G. MOCQUOT, Hs. NITSCHMANN et P. ZÄHLER. *Helv. Chim. Acta*, 1953, **36**, 1955.
- [27] Hs. NITSCHMANN et H. U. BOHREN. *Helv. Chim. Acta*, 1955, **38**, 1953.
- [28] Hs. NITSCHMANN et W. KELLER. *Helv. Chim. Acta*, 1955, **38**, 942.
- [29] N. L. SÖHNGEN, K. T. WERINGA et A. PASVEER. *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas*, 1937, **56**, 280.
- [30] T. TSUGO et K. YAMAUCHI. — *XIV<sup>e</sup> Congrès Intern. Lait.*, 1956, vol. II, part II, 588.



- [31] C. L. HAKINSON et L. S. PALMER. *J. Dairy Sci.*, 1943, **26**, 1 043.
- [32] H. MATTENHEIMER et Hs. NITSCHMANN. *Helv. Chim. Acta*, 1955, **38**, 687.
- [33] C. A. ZITTLE et J. CERBULIS. *J. Dairy Sci.*, 1958, **41**, 241.
- [34] T. L. McMEEKIN. In *The Proteins*, (Edit. E. Neurath et K. Bailey) New-York, 1954, vol. II, part. A.
- [35] R. ASCHAFFENBURG. *J. Dairy Res.*, 1956, **23**, 135.
- [36] D. F. WAUGH et P. H. v. HIPPEL. *J. Am. Chem. Soc.*, 1956, **78**, 4 576.
- [37] T. L. McMEEKIN, M. L. GROVES et N. J. HIPPEL. 131<sup>st</sup>. *Meeting of the Am. Chem. Soc.*, 1957, 65 c.
- [38] N. J. HIPPEL, M. L. GROVES et T. L. McMEEKIN. 136<sup>st</sup> *Meeting of the Am. Chem. Soc.*, 1959, 56.
- [39] J. LONG, Q. WINCKEL et I. A. GOULD. *J. Dairy Sci.*, 1958, **41**, 317.
- [40] D. F. WAUGH. *Faraday Soc. Discussions*, 1958, **25**, 186.
- [41] J. GARNIER. *Proc. Intern. Symposium Enzyme Chem.*, Tokyo, 1957, 525.
- [42] R. G. WAKE. *Austr. J. Science*, 1957, **20**, 167.
- [43] T. TSUGO et K. YAMAUCHI. *Bull. Agric. Chem. Soc. Japon*, 1960, **24**, 96.
- [44] Hs. NITSCHMANN et R. HENZI. — *Helv. Chim. Acta*, 1959, **52**, 1 985.
- [45] T. A. J. PAYENS. *Biochim. Biophys. Acta*, 1961, **46**, 441.

## CONTRIBUTION

### A L'ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ ANTIBIOTIQUE DES SOUCHES DE CULTURE DU YOGHOURT (1)

par

J. RAŠIĆ et S. MITIĆ

Belgrade (Yougoslavie)

Le yoghourt et le lait caillé, en tant que produits, sont connus non seulement comme nutritifs et diététiques, mais aussi comme possédant des qualités de laits fermentés thérapeutiques. Déjà METCHNIKOFF [1] avançait que l'effet inhibiteur du yoghourt sur certaines bactéries putrides et pathogènes, reposait non seulement sur l'acide lactique présent, mais aussi sur des matières spécifiques créées par *Lb. bulgaricus*. C'est la raison pour laquelle ce chercheur recommandait que le yoghourt et le lait caillé soient utilisés dans l'alimentation en vue de la lutte contre les microorganismes putrides de l'intestin ou autres germes nuisibles.

(1) Ces recherches sont financées par les fonds pour les travaux scientifiques.