



PRÉPARATION DE PRÉSURE CRISTALLISÉE A PARTIR D'ESTOMACS DE VEAUX (CAILLETES)

C. Alais

► To cite this version:

C. Alais. PRÉPARATION DE PRÉSURE CRISTALLISÉE A PARTIR D'ESTOMACS DE VEAUX (CAILLETES).
Le Lait, 1956, 36 (351_352), pp.26-34. <hal-00928155>

HAL Id: hal-00928155

<https://hal.science/hal-00928155v1>

Submitted on 11 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization

fini se gardera plus longtemps qu'aujourd'hui. Il est généralement vrai que lorsqu'un procédé de traitement d'un aliment repose sur des bases de chimie, de physique et de mathématiques bien fondées et sur des principes de génie sains, qu'il sauvegarde les propriétés gustatives et nutritives du produit, il devient éventuellement économiquement possible et l'aliment qui en résulte prend sa place sur le marché au prix que le consommateur consent à payer. Nous possédons les appareils et les instruments nécessaires à la production de meilleurs produits laitiers actuels et nouveaux. Nous sommes à la veille de progrès plus considérables que jamais auparavant. De nouveaux horizons s'ouvrent pour l'industrie laitière.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été possible grâce à un généreux octroi de l'Institut National de la Santé, aux collègues de l'Université de l'Illinois comprenant les professeurs KAUFMANN, TOBIAS, TRACY, TUCKEY, WHITNEY et M^{lle} LALITHA KADABA et M. V. L. SWEARINGEN qui ont aidé au cours des différentes étapes de cette étude. Les compagnies Anchor Hocking et Illinois Owen Glass ont fourni les contenants. Les compagnies Crown Cap et White Cap ont pourvu aux besoins de capsules et le chauffeur Mallory utilisé était celui de l'Illinois Creamery Supply Co.

PRÉPARATION DE PRÉSURE CRISTALLISÉE A PARTIR D'ESTOMACS DE VEAUX (CAILLETES) (1)

par C. ALAIS

Station centrale de Microbiologie et Recherches laitières, Jouy-en-Josas.

Une méthode simple de préparation de présure cristallisée a été décrite par BERRIDGE et WOODWARD [1]. Ces auteurs ont employé comme matière première la présure commerciale de la maison anglaise Benger's Ltd. A la suite de l'échec de plusieurs tentatives de préparation, dans d'autres laboratoires à partir de produits différents, l'opinion a été émise que cette méthode ne pouvait réussir qu'avec la présure BENDER [2] et [3].

Nous avons été amenés à préparer la présure à l'état cristallisé afin de disposer d'une réserve d'enzyme pur, destiné aux recherches que nous poursuivons sur l'action de la présure sur la caséine. Dans la préparation décrite ci-dessous, nous sommes partis de caillettes du commerce, avec lesquelles nous avons obtenu une solution de présure, après un traitement simple et l'emploi de produits chimiques réduits au minimum pour avoir un liquide limpide et dont l'activité coagulante ou « force » soit à peu près celle de l'extrait

(1) *Annales de Technologie (Ann. Inst. Nat. Rec. Agr., série E)*, 1955, n° 1, 113.

de présure du commerce à 1/10.000^e. Sur cette solution nous avons appliqué la méthode simplifiée de BERRIDGE.

Mesure de l'activité coagulante (ou « Force » de la présure)

Nous avons adopté à la fois le terme « activité », la technique de mesure et l'expression en « unité-présure » selon BERRIDGE [4]. Il est utile de faire un effort de standardisation car il règne beaucoup d'imprécision en ce domaine.

Rappelons que l'unité-présure représente l'activité de la présure contenue dans 1 cm³ de dilution qui coagule 10 cm³ de substrat standard en 100 secondes à 30° C. Le substrat est une solution de 12 grammes de poudre de lait écrémé, obtenue par le procédé « Spray » dans 100 cm³ de solution 0,02 N de chlorure de calcium.

On peut établir une formule générale :

$$(1) \quad \text{U. P.} = \frac{10 V}{pt}$$

ou V = volume de substrat (10 cm³) ; p = quantité de présure ;
 t = temps de coagulation en sec.

Il est difficile de passer des unités-présure à l'expression française de « force » (volumes de lait « frais et normal » coagulés par un volume de présure en 40 minutes à 35°), parce qu'il est difficile de faire un rapport entre le temps de coagulation du lait artificiel de BERRIDGE — qui varie peu d'un essai à l'autre — et le temps de coagulation du lait « frais et normal » qui varie notablement comme cela est bien connu. Par contre il est plus facile de faire un rapport entre le temps à 30° et celui à 35°.

En faisant la moyenne de 20 essais comparatifs échelonnés sur 6 mois, en prenant le lait de mélange du troupeau laitier du Centre de Recherches Zootechniques de Jouy-en-Josas, nous avons trouvé :

$$\begin{aligned} T_{\text{lait}} &= t_{\text{substrat}} \times 1,964 \\ T_{30^\circ} &= T_{35^\circ} \times 1,39. \end{aligned}$$

Sur ces bases, le temps t à employer dans la formule (1) lorsqu'on a obtenu le temps T avec le lait à 35° selon la méthode habituelle est :

$$t = T \times 0,708$$

et 1 U. P. (unité-présure) représente une « force » de 170. (Une solution de présure de force 1.000 contient 5,88 U. P. par cm³).

Préparation de la solution de présure avec les caillettes de veaux

Deux douzaines de caillettes propres et sèches, raccourcies largement pour éliminer les deux extrémités, puis découpées en

lanières de 1 centimètre de large, fournissent 1.010 grammes de fragments (42 grammes pour une pièce).

Ces fragments sont mis à macérer brièvement dans 10 litres de saumure à 10% de chlorure de sodium, tiédie à 30°, sous agitation mécanique continue ; le pH est maintenu au voisinage de 5, par addition d'acide chlorhydrique N. Après 6 heures les peaux sont séparées par passage sur une toile métallique. Il s'écoule rapidement 8 l. 85 de liquide trouble mais peu chargé en matières mucilagineuses ; l'activité est 20 U. P. cm^3 et le pH 4,95. L'activation de l'enzyme est accélérée en abaissant le pH à 4,85, après 5 jours l'activité est à peu près stable : 61 U. P./ cm^3 .

La solution brute est traitée par 5% en volume d'une solution d'alun de potasse à 10%, le pH tombe à 3,41 et aussitôt après il est remonté à 5,9 avec une solution de phosphate disodique à 10%. La dilution due aux réactifs est de 18%. Après filtration on obtient une solution jaune limpide, dont l'activité est 54,5 U. P. par cm^3 et le pH 5,92.

Préparation des cristaux

Nous suivons la méthode indiquée par BERRIDGE [1], avec quelques modifications de détail que nous précisons.

La solution de présure précédente : 8 l. 6, 469.000 U. P. au total est saturée par addition progressive, sous agitation, de chlorure de sodium (250 grammes par litre). Après une nuit de repos à température ambiante le liquide surnageant le précipité jaune brun est filtré (filtration rapide et efficace sur des filtres en papier Schleicher-Schull n° 2040 b). Le filtrat est éliminé.

Les filtres sont désagregés avec un peu d'eau dans un broyeur, la pâte est passée sur un grand entonnoir en verre fritté n° 1 et épuisée à l'eau en s'aidant du vide. Le liquide obtenu est jeté sur le précipité de la première saturation, après agitation il reste un dépôt insoluble qui est éliminé par filtration. On obtient 2 litres de solution légèrement opalescente à pH 5,93.

On fait une deuxième saturation à pH 5,4 à travers une membrane de cellophane (Visking cellulose) de 38 millimètres de diamètre, tournant lentement dans une grande éprouvette contenant la solution, à la température ambiante. Après 48 heures, la densité se fixe à 1,19. On sépare par centrifugation ce que BERRIDGE appelle un « précipité granulaire » ; dans notre cas c'est un dépôt crémeux volumineux qui paraît hétérogène. Le surnageant reste trouble mais ne dépose plus. On vérifie que le liquide saturé qui gonfle le boyau de cellophane n'a pas d'activité appréciable.

Le précipité est repris dans 120 cm^3 d'eau, il ne donne pas une solution vraie. On obtient un liquide jaune sale trouble qui aban-

donne un léger dépôt mucilagineux mais qui ne cristallisera pas, même après avoir été maintenu plusieurs jours au réfrigérateur.

Cette solution non cristallisable est diluée et saturée une nouvelle fois de la même façon. Le liquide surnageant est plus clair et le précipité amorphe plus homogène, sa solution est cependant trouble et ne cristallisera pas au réfrigérateur.

On procède à une nouvelle saturation. Cette fois le précipité se forme en flocons presque blancs ; avec 80 cm³ d'eau la solution est encore trouble mais beaucoup moins que précédemment. Entre le troisième et le quatrième jour seulement, la cristallisation commence nettement sur les parois du verre. Par centrifugation on rassemble une couche blanche de cristaux avec quelques particules grises.

Les cristaux séparés sont repris avec 45 cm³ de tampon acétate 0,1 M à pH 5,4 ; ils ne restent pas en suspension mais se déposent rapidement dès que l'agitation cesse. Il n'a pas été fait de prélèvement pour mesurer l'activité à ce stade. Le traitement est poursuivi comme l'indique BERRIDGE. Nous obtenons le même rendement avec la solution des cristaux dialysée et centrifugée : 12,3% ; mais au stade de la deuxième cristallisation le rendement : 9,75% est plus élevé que celui indiqué par cet auteur. Au microscope on observe des cristaux de forme cubique, avec des fragments irréguliers.

Avant de procéder à l'analyse, une troisième cristallisation est faite de la façon suivante. Les cristaux sont dissous dans 100 cm³ de tampon phosphate 0,2 M à pH 6,8 ; la solution est filtrée, le pH ramené à 5,4 et l'on sature avec NaCl à travers un petit boyau de cellophane de 16 millimètres de diamètre. Le précipité blanc amorphe est dissous dans l'eau froide, 50 cm³. La dissolution est très lente et imparfaite, on élimine un petit dépôt blanc amorphe par centrifugation. Le lendemain la cristallisation commence, elle se poursuit longtemps, l'activité du surnageant diminue encore 15 jours après.

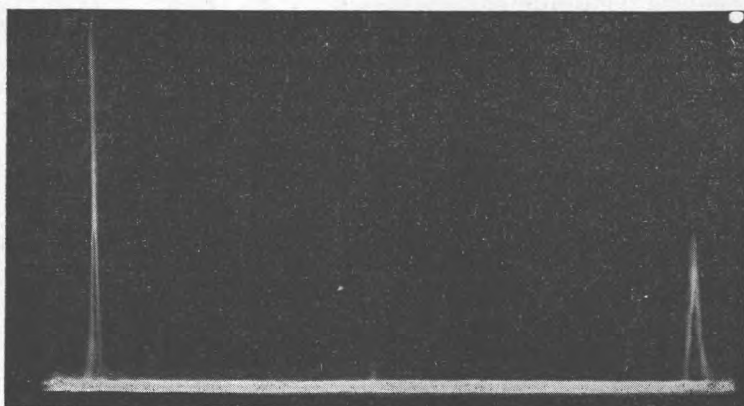
L'activité et le rendement aux stades successifs de la préparation sont donnés par le tableau suivant :

	Activité totale	% de l'activité première
Solution des caillettes (8, 6 litres)	469.000	100
1 ^{er} précipité	317.300	67,7
2 ^e précipité (granulaire)	193.500	41,2
3 ^e précipité (granulaire)	167.000	35,6
4 ^e précipité (granulaire)	117.000	25
Cristaux après dialyse et centrifugation ...	57.600	12,3
2 ^e cristallisation	45.760	9,75
3 ^e cristallisation	24.350	5,2

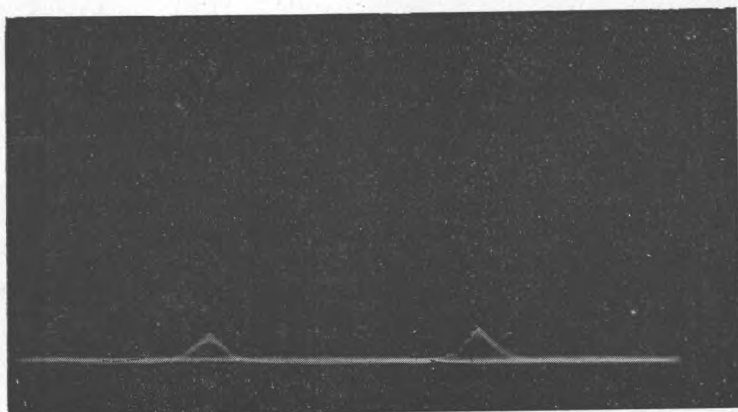
Caractéristiques des cristaux de présure

Activité par rapport à la teneur en azote et en extrait sec. — On prélève à la pipette une partie des cristaux suspendus dans un peu de surnageant, on amène à dissolution dans le tampon de phosphate de potassium 0,2 M, pH 6,8.

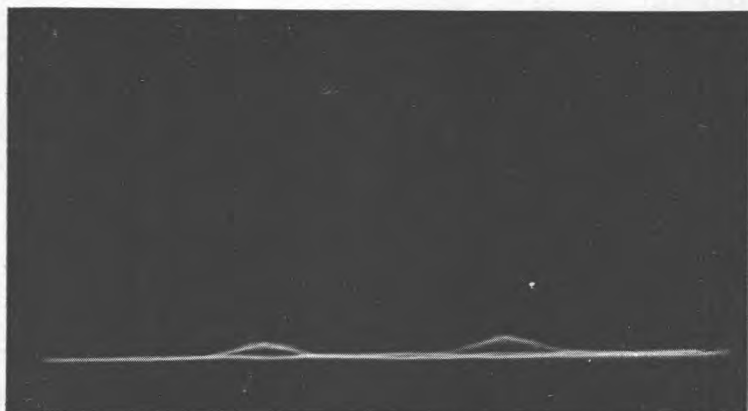
L'azote est dosé par la méthode micro-kjeldahl en prenant pour blanc d'analyse le tampon. L'extrait sec est obtenu sous vide à 99-100°, en tenant compte du résidu sec laissé par le tampon dans les mêmes conditions et des traces de NaCl restant dans le surnageant, déterminées par un dosage.



Temps : 0



Temps : 7.500 seconds



Temps : 15.000 secondes

Fig. 1

Examen électrophorétique

Tampon phosphate 0,1 M. $I = 20$ mA. $E = 240$ volts
 Conductibilité tampon = 0,00561 Gradient de potentiel = 4,75 V/cm
 Mobilité électrophorétique = 5,1 ($\text{cm}^2 \cdot \text{volt}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$) 10^{-5}

Pour 1 cm^2 de suspension :

N	3,98 mg
E. S.	26,45 mg
Activité	1,424 U. P.
U. P./mg N	357,7
U. P./mg E. S.	53,8
N % E. S.	15,05

La troisième récolte représente 450 milligrammes d'extrait sec de cristaux de présure.

Exprimé selon la définition française le pouvoir coagulant des cristaux secs correspond à une « force » de 1/9 millions.

Examen électrophorétique (1), selon TISELIUS, avec l'appareil Fokal-Strubin ; le diagramme représenté ici (fig. 1) montre que la préparation est homogène.

La micro-photographie des cristaux, en contraste de phase (fig. 2 et 3), montre les formes cubiques décrites par BERRIDGE.

Solubilité. — Comme l'indique BERRIDGE, les cristaux sont peu solubles. Dans l'eau la solution paraît saturée avec une activité

(1) Examen effectué par le service d'électrophorèse du C.N.R.S., que nous sommes heureux de remercier.

de 32 U. P. par cm^3 . Dans le tampon phosphate 0,2 M, pH 6,8, après un contact de 24 heures la solution a une activité de 270 U. P. par cm^3 .

La solution aqueuse des cristaux, conservée au réfrigérateur, sans addition d'antiseptique, présente une bonne stabilité. Après un mois l'activité demeure inchangée, après trois mois on constate une chute d'activité de 12%, après quatre mois de 17%.

Discussion

La méthode simplifiée de BERRIDGE permet d'obtenir des cristaux de présure en partant d'estomacs de veaux comme matière première à condition de prolonger les opérations de purification par précipitations successives de la présure sous la forme amorphe. Malgré cette complication le rendement est le même que celui indiqué par BERRIDGE en partant d'une présure commerciale.

Il faut noter que nous n'avons pas utilisé de faibles valeurs de pH pour faciliter l'élimination des mucines.

La teneur en azote dans la substance sèche, soit 15%, correspond à celle d'une protéine.

L'activité par rapport à l'azote est plus faible que celle indiquée par BERRIDGE [4] pour les cristaux obtenus selon sa première méthode de purification et de cristallisation.

On peut également signaler que VARIN et ZAHLER [5] et [6] opérant sur une préparation déjà ancienne de la présure cristallisée de BERRIDGE ont obtenu 250 et 226 U. P. par milligrammes N, (la détermination de BERRIDGE rapportée à l'azote donne 1.120 U. P. par milligramme N). Toutefois VARIN et ZAHLER ont opéré à 35° sur du lait écrémé frais et non à 30° sur le lait en poudre.

D'après les résultats que nous avons donnés au début de notre travail, le rapport entre le temps de coagulation à 30° avec le lait en poudre et le temps de coagulation à 35° avec le lait écrémé se situe vers 0,708. Si l'on adopte ce chiffre et que l'on exprime les unités-présure par milligramme d'azote les résultats des différents auteurs sont les suivants :

a) Présure cristallisée de BERRIDGE : BERRIDGE, 1945 : 1.120 ; VARIN, 1950 : 353 ; ZAHLER, 1952 : 319.

b) Notre présure cristallisée : 358.

Il se peut que les écarts entre ces différents résultats dépendent du mode de préparation de la présure ? Cependant, il est permis de penser qu'ils tiennent plutôt à des différences entre les laits utilisés pour la détermination de l'activité : BERRIDGE, en 1945, a utilisé un lait desséché d'excellente qualité, n'ayant pas subi le préchauffage. Nous n'avons pas pu obtenir un produit semblable pour nos

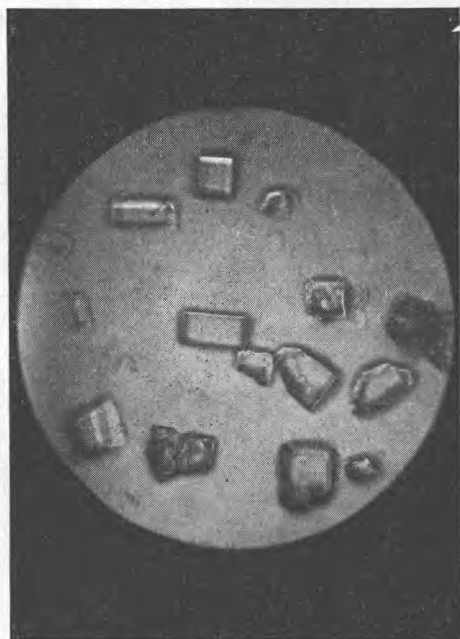


Fig. 2

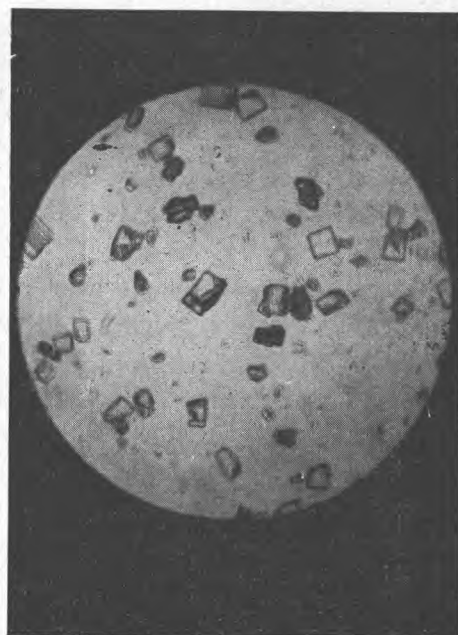


Fig. 3

essais et nous avons utilisé un lait desséché par le même procédé (Spray) mais ayant subi un préchauffage.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] N. J. BERRIDGE et C. WOODWARD. A simple method for preparing crystalline rennin. *Journal Dairy Res.*, **20**, 255-257, 1953.
- [2] N. J. BERRIDGE. Communication personnelle, 1954.
- [3] H. HOSTETTLER et J. STEIN. Beitrag zum Vorgang der Labgerinnung und zur Frage der Labstarkebestimmung. *Landw. Jb. Schweiz.*, **68**, 291-368, 1954.
- [4] N. J. BERRIDGE. The purification and crystallization of rennin. *Biochem. Journal*, **39**, 179-186, 1945.
- [5] R. VARIN. *Thèse*, Berne 1951.
- [6] P. ZÄHLER. *Thèse*, Berne 1953.

SUPPLEMENT TECHNIQUE

LA PURIFICATION DE L'ACIDE LACTIQUE PAR EXTRACTION

par G. GÉNIN

Ingénieur E.P.C.

D'après NEEDLE et ARIES [1], la consommation annuelle d'acide lactique pourrait s'élever à plusieurs centaines de milliers de tonnes par an, si le prix de l'acide pur pouvait être réduit de façon sensible. Cet acide trouverait en particulier d'importants débouchés dans la fabrication des résines alkydes, des résines acryliques et d'autres résines. La purification de l'acide brut a toujours représenté une part importante du prix de revient de ce produit et il n'est donc pas étonnant que d'importants travaux aient été entrepris sur ce point.

Nous avons mentionné, dans ces colonnes, différents procédés qui ont été proposés pour la purification de l'acide et nous rappellerons en particulier l'estérification de l'acide lactique brut en solution et la séparation de l'ester [2]. On a également proposé, comme procédé de purification possible, l'extraction liquide-liquide [3]. Dans un brevet, WAITE [4] a décrit l'extraction de l'acide par l'alcool amylique. On trouve enfin d'autres procédés dans diverses publications qui traitent de l'épuration de l'acide lactique et des propriétés physiques du produit obtenu [5].

Les principales impuretés que l'on trouve dans les solutions brutes d'acide lactique sont des sels de métaux alcalino-terreux, des sucres, et des impuretés volatiles telles que les acides acétique et butyrique [6]. La séparation de l'acide lactique de ces impuretés