



INFLUENCE DU CHAUFFAGE DU LAIT SUR LE DÉVELOPPEMENT DES BACTÉRIES. EFFET STIMULANT DU LAIT AUTOCLAVÉ SUR LA CROISSANCE DE LACTOBACILLUS LACTIS. ROLE DE L'ACIDE FORMIQUE

J. E. Auclair, A. Portmann

► To cite this version:

J. E. Auclair, A. Portmann. INFLUENCE DU CHAUFFAGE DU LAIT SUR LE DÉVELOPPEMENT DES BACTÉRIES. EFFET STIMULANT DU LAIT AUTOCLAVÉ SUR LA CROISSANCE DE LACTOBACILLUS LACTIS. ROLE DE L'ACIDE FORMIQUE. *Le Lait*, 1959, 39 (388), pp.496-519. <hal-00928249>

HAL Id: hal-00928249

<https://hal.science/hal-00928249v1>

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

**INFLUENCE DU CHAUFFAGE DU LAIT
SUR LE DÉVELOPPEMENT DES BACTÉRIES
EFFET STIMULANT DU LAIT AUTOCLAVÉ
SUR LA CROISSANCE DE LACTOBACILLUS LACTIS
ROLE DE L'ACIDE FORMIQUE (1)**

par

J. E. AUCLAIR et A. PORTMANN

Station Centrale de Recherches laitières et de
Technologie des Produits animaux, Jouy-en-Josas (S.-et-O.)

INTRODUCTION

Dans un article précédent [1] nous avons montré que la croissance des bactéries lactiques dans le lait chauffé dépend essentiellement des organismes utilisés et du degré de chauffage du lait. Le chauffage du lait à des températures supérieures à 100°C, en particulier, a un effet variable suivant les germes utilisés : tandis que le chauffage du lait à l'autoclave a pour effet de diminuer la croissance de certains germes tels que *Streptococcus agalactiae* 1 B, d'autres micro-organismes tels que *Str. thermophilus* TJ et *Lactobacillus lactis* O 37 se développent mieux dans le lait chauffé à 110-120° C que dans le lait chauffé seulement à 80-90°C.

Cet effet stimulant du lait autoclavé sur certaines bactéries lactiques a déjà été observé par de nombreux auteurs qui l'ont attribué soit à la destruction de substances bactéricides thermostables [2], soit à l'abaissement du potentiel d'oxydo-réduction du lait au cours du chauffage [3], soit à une augmentation de la teneur du lait en azote non protéique résultant d'une hydrolyse de la caséine [4].

PARKER et ELLIKER [5], étudiant la croissance des bactéries lactiques dans un milieu à base de phosphocaséinate de calcium, ont montré que la croissance des bactéries est fonction de la teneur du milieu en azote aminé libre, teneur qui augmente avec la durée de chauffage du milieu à l'autoclave. Ils constatent de plus que l'addition de lactose au milieu de culture avant le chauffage favorise la croissance des bactéries lactiques et spécialement de *Str. thermophilus*.

La plupart des auteurs ont observé d'autre part que, si le chauffage du lait à l'autoclave a en général pour effet d'améliorer la croissance des bactéries lactiques, ces mêmes bactéries se développent souvent plus difficilement lorsque le lait a subi un chauffage prolongé [2] [4] [5]. PARKER et ELLIKER attribuent cette

(1) Annales de Technologie, 1958, n° 2, 129.

réduction de l'activité des bactéries lactiques dans le lait chauffé à l'autoclave pendant 60 minutes à une diminution de l'azote aminé libre due à la présence du lactose.

Dans les expériences qui vont être décrites, nous avons étudié l'effet du chauffage du lait à l'autoclave sur la croissance de *L. lactis* O 37 en déterminant le rôle des différents constituants du lait dans les phénomènes de stimulation observés.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

I. — Mise en évidence d'une ou plusieurs substances stimulantes dans le lait autoclavé

La figure 1 rappelle les résultats que nous avons obtenus précédemment en cultivant *L. lactis* O 37 dans des laits chauffés à des températures variables [1]. La courbe représente les variations du pH des cultures après 18 heures d'incubation en fonction de la température de chauffage du lait.

La différence d'acidité que l'on peut observer entre les cultures faites dans le lait chauffé à 80-90°C et les cultures en lait autoclavé (110-120°C) correspond bien à une différence de croissance du lactobacille dans ces mêmes laits. En effet si l'on compare la croissance de cet organisme dans des laits chauffés à 90°C et à 120°C, croissance mesurée par numération sur gélose de BRIGGS [6], on constate que le taux de croissance du microorganisme est le même pour les deux sortes de lait mais la croissance totale est nettement supérieure dans le lait autoclavé (fig. 2).

Le fait que *L. lactis* O 37 se développe plus activement dans le lait chauffé à 110-120°C que dans le lait chauffé à 80-90°C (où les lacténines sont cependant détruites) peut être dû soit à la destruction par le chauffage à l'autoclave de substances inhibitrices existant dans le lait chauffé à 80-90°C, soit à l'apparition à la suite du chauffage de substances qui activent le développement du lactobacille. L'expérience suivante montre que seule la seconde hypothèse doit être retenue.

Méthode

Du lait prélevé aseptiquement sur trois vaches dont les mamelles ont été reconnues précédemment indemnes d'infection microbienne, est mélangé, puis écrémé dans une écrémeuse préalablement stérilisée à l'autoclave. Il est ensuite réparti en tubes de 18 × 180 mm. à raison de 10 millilitres par tube. Une partie de ces tubes est chauffée à 90°C pendant 20 minutes, tandis que les autres sont

chauffés 20 minutes à l'autoclave à 120°C. Des mélanges en proportions variables $\left(\frac{0}{10}, \frac{1}{9}, \frac{2}{8}, \frac{3}{7}, \text{etc...}\right)$ de lait autoclavé et de lait chauffé à 90°C sont ensuite préparés dans des tubes qui sontensemencés à 0,001 % avec une culture active du lactobacille sur lait tournesolé (culture obtenue à partir d'un fort inoculum (10 %), incubée 4 à 5 heures à 42°C et utilisée juste avant la coagulation

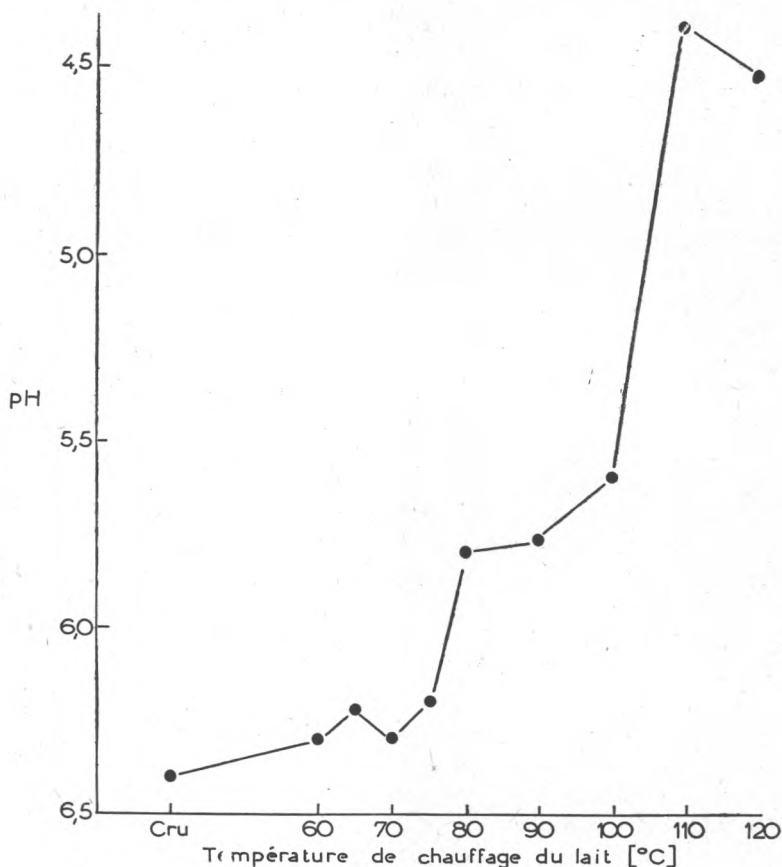


Fig. 1.— Production d'acide par *Lactobacillus lactis* O 37 dans du lait chauffé pendant 20 minutes à différentes températures.

Incubation : 18 heures à 42°.

du lait lorsque le pH atteint 4,9). Après 18 heures d'incubation à 42°C l'acidité est mesurée dans chacun des tubes de culture à l'aide d'un pH-mètre à électrode de verre.

Résultats

La figure 3 montre la courbe obtenue en portant en abscisse les proportions de chacun des laits dans les préparations et en ordonnée le pH atteint après incubation (courbe A), et par comparaison la courbe obtenue avec des mélanges, effectués dans les mêmes conditions, de lait cru et de lait chauffé à 90°C (courbe B).

Si l'on examine tout d'abord la courbe A, on constate que la croissance du lactobacille, relativement faible dans le lait chauffé à 90°C est considérablement améliorée dès que celui-ci est addi-

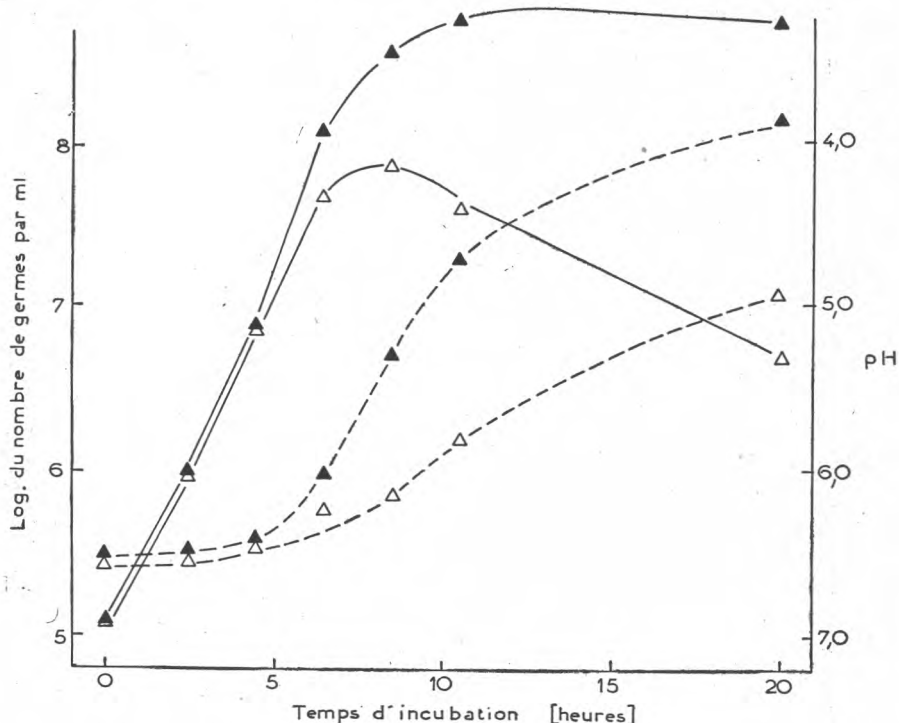


Fig. 2. — Croissance et production d'acide de *Lactobacillus lactis* O 37 dans du lait chauffé à 90° et dans le même lait autoclavé.

— Croissance mesurée par numération sur gélose de Briggs.

— Production d'acide mesurée par la détermination du pH.

Δ Lait chauffé 20 minutes à 90°.

▲ Lait autoclavé (20 minutes à 120°).

tionné d'une petite quantité de lait autoclavé. Cela s'explique vraisemblablement par l'existence dans le lait autoclavé d'une substance absente dans le lait chauffé à 90°C et qui, ajoutée à

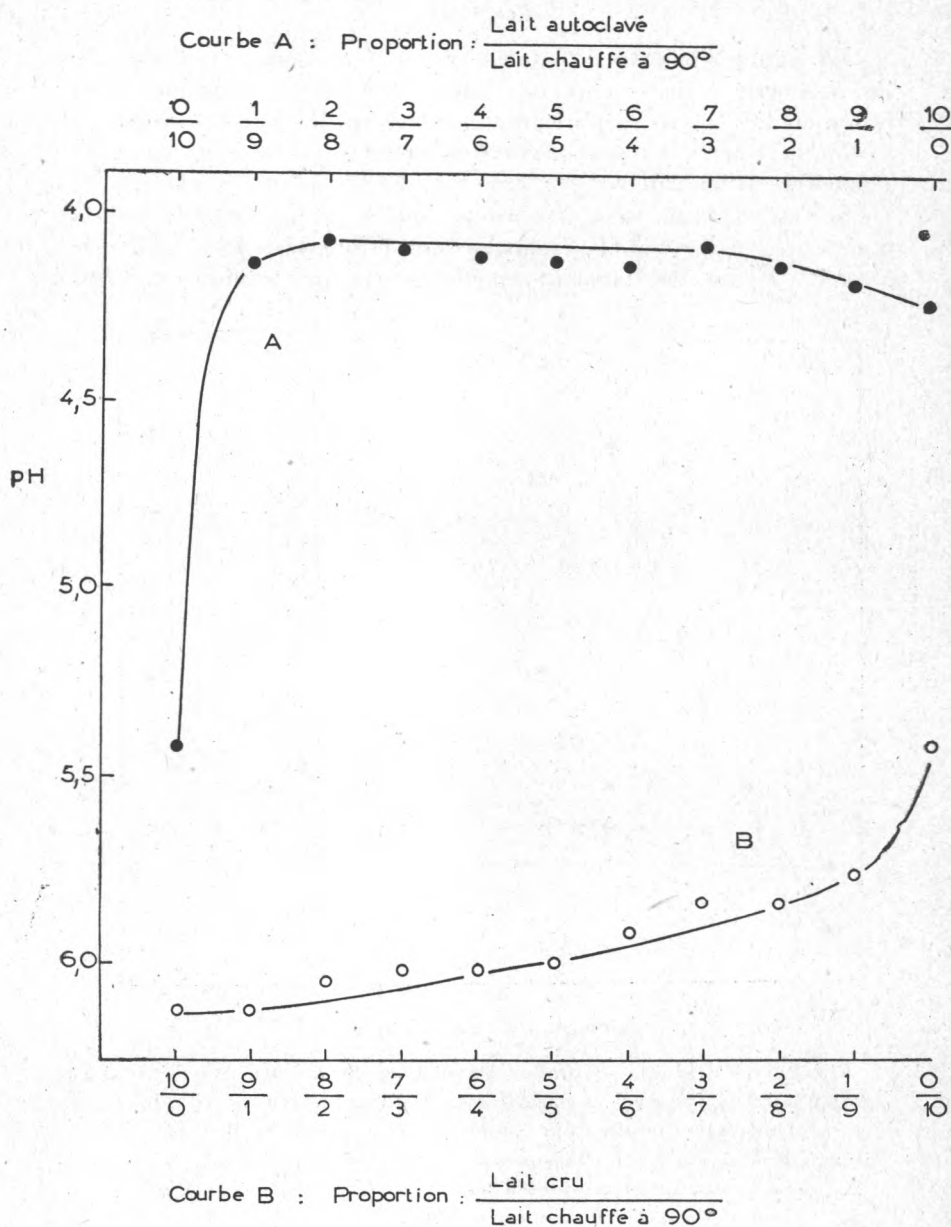


Fig. 3. — Production d'acide de *Lactobacillus lactis* O 37 dans les mélanges en proportions variables de lait autoclavé et de lait chauffé à 90° (courbe A : ●—●) ; de lait cru et de lait chauffé à 90° (courbe B : ○—○).

faible concentration à ce lait, stimule fortement la croissance de l'organisme-test.

On peut observer d'autre part sur la courbe A une croissance légèrement plus active du lactobacille dans les mélanges de lait chauffé à 90°C et de lait autoclavé que dans le lait autoclavé seul. Cela montre que le lait autoclavé est probablement déficient en un ou plusieurs facteurs de croissance que contient en plus grande proportion le lait chauffé à 90°C.

La courbe B montre, à titre de comparaison, l'effet d'une substance inhibitrice, la lacténine, sur la croissance du même organisme dans des mélanges de lait cru (contenant la lacténine) et de lait chauffé à 90°C (où la lacténine est détruite). On voit que cet effet inhibiteur se manifeste dans toutes les préparations contenant du lait cru et que l'inhibition est encore marquée dans le mélange contenant une partie de lait cru pour 9 parties de lait chauffé à 90°C.

II. — Méthode de dosage

Afin de mesurer quantitativement l'effet stimulant du lait autoclavé ou de toute autre préparation, la méthode suivante a été utilisée. Des dilutions de l'échantillon à étudier sont faites dans du lait chauffé à 90°C (par exemple 1/3, 1/9, 1/27, etc.) et réparties à raison de 5 millilitres dans des tubes de 18 × 180 mm. qui sont ensuite ensemencés à 0,001 % avec une culture sur lait, fraîche et non coagulée, de *L. lactis* O 37. Après 18 heures d'incubation à 42°C, l'acidité est mesurée comme précédemment dans chacun des tubes de culture à l'aide d'un pH-mètre à électrode de verre. On obtient ainsi une réponse graduée (pH en fonction de la dilution).

La figure 4 montre, à titre d'exemple, les courbes obtenues avec trois échantillons de lait ayant subi les traitements suivants : A : 120°, 20 minutes ; B : 120°, 40 minutes ; C : 135°, 20 minutes. On voit que ces courbes présentent des portions linéaires et parallèles. Ce fait laisse à penser que les trois échantillons contiennent, en proportions variables, la même et unique substance stimulante.

Il est alors possible, en choisissant une préparation étalon, de mesurer la quantité de substance stimulante contenue dans les différents échantillons de lait ou dans n'importe quelle préparation donnant une courbe parallèle à celle de la préparation étalon.

Si l'on prend comme étalon l'échantillon de lait chauffé à 120°C pendant 20 minutes, cet échantillon contenant par définition 100 unités de substance par millilitre, il est facile de calculer graphiquement à partir des courbes obtenues, les concentrations de substance active présentes dans les autres préparations. D'après la

figure 4 l'échantillon B contiendra 175 unités et l'échantillon C 600 unités.

Si la quantité de substance stimulante formée au cours du chauffage du lait augmente quand on accroît la température ou le temps

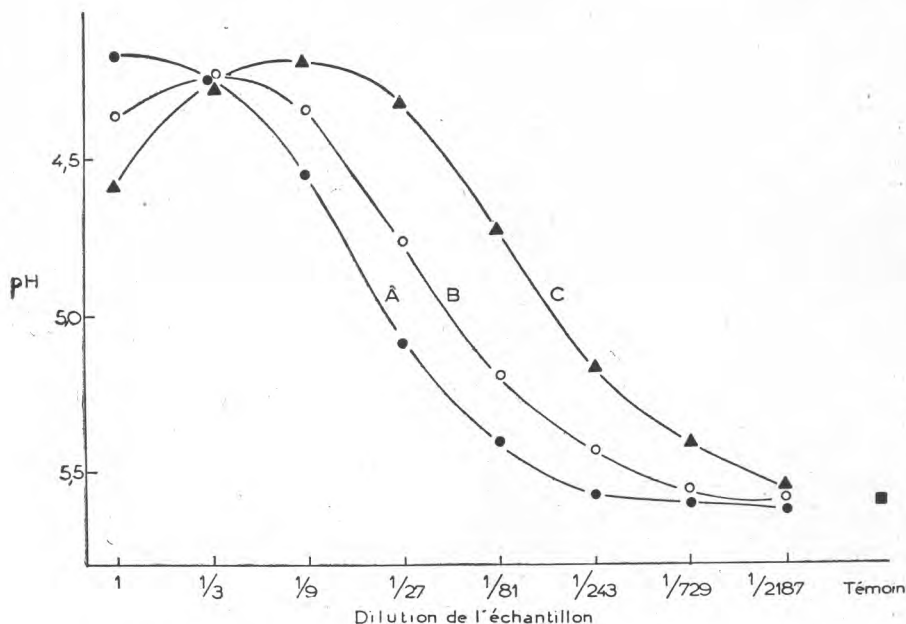


Fig. 4. — Effet stimulant de trois échantillons de lait chauffés à l'autoclave sur la production d'acide de *Lactobacillus lactis* O 37.

A : Lait chauffé 20 minutes à 120° ; B : Lait chauffé 40 minutes à 120° ; C : Lait chauffé 20 minutes à 135°. Incubation : 18 heures à 42°.

de chauffage, il faut remarquer que la croissance du lactobacille n'est cependant pas meilleure dans les échantillons de lait chauffés le plus fortement. On voit au contraire sur la figure 4 que l'acidité produite dans les échantillons de lait non dilués (dilution 1) est d'autant plus faible que le chauffage a été plus sévère.

III. — Expériences de dialyse

Du lait autoclavé (120°, 20 minutes) est dialysé contre de l'eau distillée au moyen d'un tube de cellulose « Visking » de 17 millimètres de diamètre. L'opération est faite en chambre froide à 3°C, pendant 3 jours, l'eau distillée étant renouvelée deux fois par jour. On constate que le lait autoclavé perd ainsi toute activité stimulante (tableau I).

Si l'on reprend l'eau qui a servi à la dialyse et qu'on la concentre sous vide à 40°C jusqu'au volume initial du lait autoclavé, on retrouve la totalité de l'activité dans le « dialysat » ainsi obtenu

TABLEAU I
QUANTITÉ DE SUBSTANCE STIMULANT LA CROISSANCE
DE LACTOBACILLUS LACTIS O 37 CONTENUE DANS DIFFÉRENTES PRÉPARATIONS
UN ÉCHANTILLON DE LAIT CHAUFFÉ A 120° PENDANT 20 MINUTES
CONTIENT PAR DÉFINITION 100 UNITÉS DE SUBSTANCE STIMULANTE
PAR MILLILITRE

Lait autoclavé (120°, 20 minutes)	100 unités
Lait autoclavé dialysé	0
Dialysat du lait autoclavé	80 à 100 unités
Dialysat du lait cru, chauffé à l'autoclave (120°, 20 minutes)	80 à 140 unités
Lait dialysé, puis autoclavé	0

(tableau I). La substance stimulant l'activité du lactobacille est donc dialysable.

Si, au lieu de lait autoclavé, on dialyse contre de l'eau distillée du lait cru ou chauffé à 90°C et que l'on concentre sous vide le « dialysat » ce dernier ne présente aucune activité. Mais si l'on chauffe ce dialysat à l'autoclave (120°, 20 minutes) il acquiert une activité comparable à celle du lait normal autoclavé (tableau I). Quant au lait dialysé (celui qui reste à l'intérieur du dialyseur), il ne possède aucune activité stimulante, ni avant, ni après chauffage à l'autoclave.

Ces expériences montrent que la substance stimulante du lait autoclavé est dialysable et provient vraisemblablement de l'action du chauffage sur la fraction dialysable du lait.

IV. — Action de diverses substances sur l'activité de *L. lactis* O 37

Les principaux constituants dialysables du lait sont les sels minéraux, le lactose, et divers composés azotés de faible poids moléculaire (urée, acide urique, acides aminés, etc.) [7]. Nous avons donc recherché si certains de ces corps seraient susceptibles, après chauffage, seuls ou en association, d'activer la croissance du lactobacille en les ajoutant au milieu de culture constitué par du lait chauffé à 90°C.

a) *Acides aminés*

Bien que le lait contienne peu d'acides aminés à l'état libre [7], certains pourraient se former par dégradation par la chaleur de substances azotées plus complexes (protéose-peptones).

Des solutions M/100 des acides aminés suivants ont été préparées : L. alanine, acide L. aspartique, acide L. glutamique, L. arginine, L. asparagine, L. cystéine, L. glutamine, L. histidine, L. isoleucine, L. lysine (dichlorhydrate), D. L. méthionine, L. phénylalanine, D. L. proline, D. L. sérine, D. L. thréonine, L. tryptophane, L. valine. La L. cystine et la L. tyrosine peu solubles ont été utilisées aux concentrations respectives de 0,01 % et de 0,05 %. Après ajustement à pH neutre ces solutions étaient stérilisées à l'autoclave (120°C, 20 minutes). Des dilutions de ces solutions étaient ajoutées à du lait chauffé à 90°C pour la détermination de leur activité éventuelle sur *L. lactis* O 37 ainsi qu'il a été décrit précédemment.

Nous avons ainsi constaté que certains acides aminés favorisent légèrement la croissance du lactobacille dans le lait chauffé à 90°C (proline, tyrosine, leucine, tryptophane) ; aucun cependant ne montre une activité stimulante comparable à celle du lait autoclavé. Certains acides aminés (sérine, alanine) présentent par contre un effet inhibiteur très net pour les concentrations les plus élevées utilisées.

Différentes combinaisons de ces acides aminés se révélèrent également sans activité.

b) *Urée. Acide urique*

Ces composés constituent la plus grande partie de la fraction azotée non protéique du lait [7]. Nous avons constaté qu'aucun de ces composés chauffés à l'autoclave ne présente d'activité.

c) *Lactose*

Une solution de lactose à 5 % dans de l'eau distillée, chauffée à l'autoclave ou stérilisée par filtration, ne montre aucune activité sur la croissance de *L. lactis* O 37. Au contraire une solution de lactose à 5 % en tampon phosphate de Sørensen à pH 6,6 présente, après chauffage, une activité stimulante comparable à celle du lait autoclavé (fig. 5). Un effet inhibiteur est toutefois observé dans la première dilution de la solution de lactose (1/3 de solution de lactose pour 2/3 de lait chauffé à 90°). Le pH de la solution tamponnée de lactose au moment du chauffage à l'autoclave a un rôle déterminant : tandis que la solution de lactose chauffée à pH 5,3 ne présente qu'une très faible activité, la solution chauffée à pH 7,5 est environ 10 fois plus active que la solution chauffée à pH 6,6 (fig. 5). Une augmentation de pH favorise donc la formation de la substance stimulante mais elle augmente aussi l'effet inhibiteur qui est alors visible jusqu'à la dilution 1/9.

d) *Acides aminés + lactose*

Des solutions aqueuses d'acides aminés (les mêmes que précédemment) et de lactose (5 %) sont chauffées à l'autoclave (120°C,

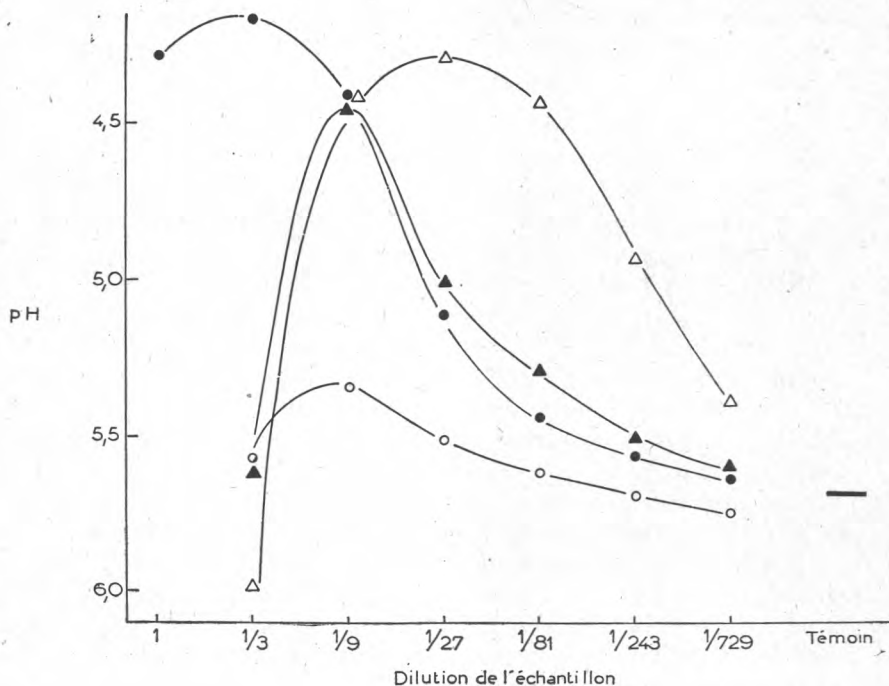


Fig. 5. — Effets stimulants et inhibiteurs du lait autoclavé et de solutions tamponnées de lactose chauffées à l'autoclave (30 min. à 120°) sur la production d'acide de *Lactobacillus lactis* O 37.

- Lait autoclavé.
- Solution de lactose (5 p. 100) tamponnée à pH 5,3.
- Δ—Δ Solution de lactose (5 p. 100) tamponnée à pH 7,5.
- ▲—▲ Solution de lactose (5 p. 100) tamponnée à pH 6,6.

20 minutes) et ajustées à pH 6,6 avec de la soude. Aucune de ces préparations ne montre d'activité stimulante importante.

Par contre les mêmes solutions d'acides aminés et de lactose préparées en tampon phosphate (pH 6,6) et chauffées à l'autoclave présentent une activité semblable à celle de la solution tamponnée de lactose chauffée et du lait autoclavé.

e) *Urée + lactose*

Si l'on chauffe à l'autoclave une solution d'urée (300 mgr./100 ml.) et de lactose (5%) dans l'eau distillée, la préparation ainsi obtenue active la croissance du lactobacille de la même façon que les solutions tamponnées de lactose chauffées à l'autoclave.

Une solution d'acide urique et de lactose ne présente par contre aucune activité après chauffage.

f) *Protéines + lactose*

Bien que, comme nous l'avons montré, l'activité du lait autoclavé provienne essentiellement du chauffage de la fraction dialysable du lait, il est intéressant de savoir si les protéines du lait ne jouent pas un certain rôle au cours du chauffage dans la formation de la substance stimulante que nous étudions.

Nous avons donc préparé les solutions suivantes :

- lait chauffé à 90°C dialysé contre de l'eau distillée,
- solution à 3% de caséinate de sodium préparée à partir de caséine isoélectrique (Difco), dialysée contre de l'eau distillée,
- solution de phosphocaséinate de calcium obtenu par ultracentrifugation de lait à 30.000 tours par minute dans une centrifugeuse « Sharples », dialysée contre de l'eau distillée.

Ces différentes solutions, chauffées à l'autoclave ne montrèrent qu'une activité faible ou nulle sur la croissance du lactobacille.

Les mêmes solutions, additionnées de 5% de lactose et autoclavées montrèrent par contre une activité tout à fait comparable à celle d'une solution tamponnée de lactose chauffée à pH 6,6. Il en était de même des solutions effectuées en tampon phosphate à pH 6,6 et chauffées à l'autoclave.

g) *Produits de dégradation du lactose*

Les résultats précédents montrent que la substance stimulante qui se forme au cours du chauffage du lait à l'autoclave est vraisemblablement un produit de dégradation du lactose, puisque du lactose chauffé en milieu neutre ou alcalin, en présence de phosphates, de caséine ou d'urée, est capable d'activer la croissance de *L. lactis* O 37 de la même façon que le lait autoclavé.

Nous avons pu constater que le glucose et le galactose, qui n'ont par eux-mêmes aucun effet stimulant sur le lactobacille, acquièrent après chauffage en tampon phosphate à pH 6,6 une activité semblable à celle que donne le lactose chauffé dans les mêmes conditions. Le saccharose, par contre, ne montre aucune activité, ni avant ni après chauffage.

Un grand nombre de produits de décomposition du lactose ont été identifiés dans le lait autoclavé : acides organiques (formique, acétique, lactique, pyruvique, butyrique, propionique) [8] [9] [10] [11], alcool furfurylique, hydroxyméthylfurfuraldéhyde, maltol [12]. Parmi les acides organiques formés, certains ont un effet stimulant sur la croissance des microorganismes, en particulier l'acide acétique [13] et l'acide pyruvique [14]. L'acétaldéhyde peut également activer le développement de certains germes [14].

Parmi les produits de dégradation des sucres formés par chauffage en milieu neutre ou alcalin, certains possèdent des propriétés réductrices et ont de ce fait une action favorable sur la croissance des microorganismes. La réductone est le plus connu. Cependant une étude récente [15] a montré que le lait autoclavé ne contient pas de réductone en quantité décelable par chromatographie sur papier, alors qu'il contient une forte proportion d'un autre corps réducteur : la dihydroxyacétone.

Nous avons donc recherché si certains de ces corps avaient une activité sur la croissance de *L. lactis* O 37. Les solutions suivantes ont été essayées : Formiate de calcium, acétate de calcium, lactate de calcium, pyruvate de calcium, butyrate de sodium, propionate de sodium : solutions à 0,1 %.

Acides caproïque, caprylique, valérianique : solutions à 0,1 %, neutralisées par la soude.

Furfurol, alcool furfurylique, acétaldéhyde, dihydroxyacétone : solutions à 0,1 %.

Des dilutions de ces solutions étaient préparées dans du lait chauffé à 90°C et ensemencées avec *L. lactis* O 37 (inoculum 0,001 %) et le pH des cultures mesuré après incubation de 16 heures à 42°C.

Parmi tous ces corps seul le formiate se montra doué de propriétés stimulantes pour *L. lactis* O 37. La solution de formiate de calcium à 0,1 % est environ 6 fois plus active que le lait autoclavé.

h) Facteurs de croissance et substances diverses

Le lait contient dans sa fraction dialysable un grand nombre de facteurs de croissance. On peut se demander si le chauffage du lait à l'autoclave n'augmente pas la concentration de certains d'entre eux. On sait par exemple que le chauffage à l'autoclave du lait de truie libère la vitamine B₁₂ qui existe dans ce lait liée à une protéine, sous une forme non assimilable pour les micro-organismes [16].

Les facteurs de croissance suivants ont donc été essayés aux concentrations indiquées :

Pantothénate de calcium, biotine, amide de l'acide nicotinique, riboflavine, acide paraminobenzoïque, pyridoxine, thiamine, acide folique, vitamine B₁₂ : solutions à 1 milligramme pour 100 millilitres.

Mesoinositol, choline : solutions à 2 mgr. 5 pour 100 millilitres.

Glutamine, adénine, guanine, xanthine, uracile, thymine : solutions à 100 milligrammes pour 100 millilitres.

Plusieurs substances réductrices : cystéine et glutathion à 1%, acide ascorbique à 2,5% ainsi qu'une solution de peptone « Evans » à 1% ont également été essayées.

Parmi les facteurs de croissance employés, seuls les composés puriques se sont montrés actifs. Une solution d'adénine à 10 milligrammes pour 100 millilitres présentait en effet une activité comparable à celle du lait autoclavé. L'acide ascorbique par ailleurs était actif à haute concentration, la solution contenant 2 gr. 5 pour 100 millilitres étant environ 2 fois plus active que le lait autoclavé.

La solution de peptone montrait également une forte activité stimulante. A la concentration de 1% la peptone est deux fois plus active que le lait chauffé pendant 20 minutes à 120°C.

V. — Identification de la substance stimulante du lait autoclavé

L'ensemble des résultats précédents montre que la substance du lait autoclavé qui active la croissance de *L. lactis* O 37 est vraisemblablement un produit de dégradation du lactose. Nous avons vu d'autre part que, parmi les corps provenant de la dégradation du lactose dont la présence a été décelée dans le lait autoclavé, seul le formiate s'est montré actif.

D'après GOULD, l'acide formique, qui représente 80% des acides volatils formés au cours du chauffage à l'autoclave, se trouverait dans le lait autoclavé (116°C, 1 heure) à la dose d'environ 10 milligrammes pour 100 millilitres [9], [10]. Or les essais que nous avons décrits ont démontré que le lait autoclavé (120°C, 20 minutes) avait sensiblement la même activité que le lait chauffé à 90°C additionné de 15 milligrammes de formiate de calcium. On a donc tout lieu de penser que la substance stimulante que nous cherchons à identifier est précisément l'acide formique. Les essais suivants ont pour but de confirmer cette identité.

Dans ces essais, nous avons utilisé, pour mesurer l'activité de nos préparations, la méthode de dosage décrite précédemment, en employant comme solution étalon non plus du lait autoclavé, mais une solution de formiate de calcium à 14 mgr. 1 pour 100 millilitres (cette solution contient 10 milligrammes d'acide formique pour 100 millilitres). Son activité fixée arbitrairement à 100 unités par millilitre (1.000 unités = 1 milligramme d'acide formique), correspond sensiblement à celle du lait autoclavé à 125°C pendant 30 minutes.

a) Séparation par échange d'ions

Un « dialysat » de lait autoclavé, est préparé en plongeant un tube de cellulose « Visking » rempli d'eau distillée (100 millilitres) dans une éprouvette contenant 2 litres de lait autoclavé (115°C, 30 minutes). Après 24 heures de dialyse à 3°C le liquide restant à l'intérieur du tube de cellulose est retiré. Il possède une activité stimulante sensiblement égale à celle du lait autoclavé. En répétant cette opération plusieurs fois, on obtient ainsi facilement une quantité importante de « dialysat » actif.

Le liquide ainsi obtenu est passé successivement sur une colonne de résine échangeuse de cations : « Permutite 50 », préparée par la méthode de MOORE et STEIN [17], puis sur une colonne de résine échangeuse d'anions : « Amberlite IRA 410 », préparée par la méthode de BRYANT et OVERELL [18].

Après passage du dialysat et lavage des colonnes à l'eau, la permutite est éluée par une solution normale d'ammoniaque tandis que l'amberlite est éluée par une solution normale de carbonate d'ammonium.

Par cette technique de séparation les corps neutres et en particulier le lactose du dialysat passent dans l'effluent, les cations et les acides aminés se retrouvent dans l'éluat de la permutite, les anions et les acides organiques dans l'éluat de l'amberlite.

Les trois solutions obtenues sont ensuite concentrées sous vide à 45°C, ce qui permet d'éliminer en même temps l'ammoniaque des éluats. Ces préparations concentrées sont stérilisées par filtration sur filtre Seitz et leur activité stimulante est déterminée.

On constate alors que seul l'éluat de l'amberlite présente une activité. On retrouve en effet dans cette fraction 50% de la substance stimulante du dialysat, les deux autres fractions étant complètement inactives. La substance stimulante que nous recherchons se comporte donc bien comme un acide organique.

b) Distillation

La solution active obtenue ainsi qu'il vient d'être décrit par élution de l'amberlite au moyen du carbonate d'ammonium est distillée suivant une méthode semblable à celle décrite par GOULD [9]: 250 millilitres de solution sont acidifiés par $\text{SO}_4\text{H}_2\text{-N}$ jusqu'à pH 2. On entraîne par la vapeur en maintenant la solution dans un bain d'eau salée à 103-104° afin de conserver un volume constant. Quelques gouttes d'un antimousse aux silicones (Rhodorsil) (1) permettent d'éviter le moussage. La distillation est conduite de façon à recueillir 900 millilitres de distillat, par portions de 100 millilitres, en 1 h. 30.

(1) Anti-mousse 426 fabriqué par Rhône-Poulenc.

De la même façon on a procédé à la distillation directe de lait autoclavé (125°C, 30 minutes), de lait chauffé à 90°C, de lait chauffé à 90°C additionné de 15 milligrammes de formiate pour 100 millilitres, et enfin d'une solution tamponnée de lactose (pH 6,6) chauffée à l'autoclave (125°C, 30 minutes).

Le tableau II donne les résultats ainsi obtenus. On voit tout d'abord que le lait chauffé à 90°C contient des acides volatils sans activité. D'autre part on retrouve pour les différentes préparations actives soumises à la distillation 60 à 68 % de l'activité présente initialement dans ces préparations. C'est en particulier le cas du lait chauffé à 90°C additionné de formiate et pour lequel on retrouve dans le distillat 60 % de l'activité initiale.

TABLEAU II

Préparations soumises à la distillation (250 ml).	Activité des préparations avant distillation (nombre d'unités)*	Quantité de soude N/20 nécessaire pour neutraliser les distillats (ml.)	Activité des distillats (nombre d'unités)*	Pourcentage d'activité retrouvée après distillation	Activité par ml. de soude N/20 ajoutée au distillat (nombre d'unités)*
Lait chauffé à 90°C :					
a)	0	3,90	0		
b)	0	4,80	0		
c)	0	5,35	0		
Lait chauffé à 90°C (b) + 15 mgr. formiate pour 100 ml..	26.500	12,05	15.900	60	1.320
Lait autoclavé (125°C (30 minutes)					
a)	25.000	11,40	16.100	64	1.400
b)	26.900	14,10	17.500	65,5	1.240
Solution tamponnée de lactose chauffée.	556.000	187,00	342.000	61,5	1.830
Eluat de l'amberlite (20 ml. dilués dans 250 ml.)	44.500	18,60	30.500	68	1.640

a : lait d'une seule vache : « Vinette », b : lait d'une seule vache : « Unité 12 », c : lait de mélange de plusieurs vaches.

*1 unité = quantité de substance possédant la même activité stimulante sur *L. lactis* O 37 que 1γ d'acide formique.

La dernière colonne du tableau II donne le rapport entre l'activité des distillats et les quantités de soude nécessaires pour neutraliser ces distillats. Si toute l'acidité des distillats était due à l'acide formique, on trouverait dans ces distillats une activité de 2.300 uni-

tés par millilitre de soude ajoutée (1 ml. de soude N/20 correspond à 2 mgr. 3 d'acide formique soit à 2.300 unités de substance stimulante). Le fait que, pour les différentes préparations étudiées, on trouve des activités variant de 1.240 à 1.830 unités par millilitre de soude ajoutée indique que ces préparations contiennent, en plus de l'acide formique, d'autres acides volatils sans activité : ce sont les acides que l'on trouve dans le lait chauffé à 90°C et qui sont responsables de l'acidité du distillat correspond.

c) *Chromatographie*

Les distillats obtenus, ainsi qu'il vient d'être décrit, à partir de lait chauffé à 90°C, de lait autoclavé (125°C, 30 minutes) et d'une solution tamponnée de lactose chauffée à l'autoclave ont été étudiés par chromatographie sur papier suivant la méthode de GUILLAUME et OSTEUX [19] qui permet de séparer les acides gras à faible poids moléculaire.

Méthode

Pour le lait chauffé à 90°C et le lait autoclavé, la distillation est conduite en quatre opérations, de façon à obtenir, à partir d'un litre de lait, 3.600 millilitres de distillat. Ce distillat est neutralisé par NaOH N/20 et concentré à 1 millilitre par évaporation sous vide. La préparation est ensuite traitée par la « Permutite 50 » afin d'éliminer les ions Na^+ , puis neutralisée par la morpholine. On obtient ainsi 13 millilitres de préparation qui est soumise à l'analyse chromatographique. Des spots de 0 ml. 02 sont déposés sur le papier (Whatman 3). Chaque spot correspond environ à 1 ml. 5 de lait.

La solution tamponnée de lactose (lactose : 5%, pH 6,6, chauffée à 125°C pendant 30 minutes) est distillée en deux opérations permettant d'obtenir à partir de 500 millilitres de solution 1.800 millilitres de distillat. Comme précédemment, ce distillat est neutralisé par NaOH, concentré sous vide, traité par la permutite et neutralisé par la morpholine. Les spots de 0 ml. 02 de cette préparation correspondent à 0 ml. 07 de la solution initiale.

Une solution témoin constituée par un mélange des acides formique, acétique, propionique, butyrique (1 gr. pour 100 ml.) et caproïque (0 gr. 4 pour 100 ml.) est analysée simultanément. Les spots de 0 ml. 01 de cette solution déposés sur le papier correspondent à 100 γ de chacun des acides formique, acétique, propionique et butyrique et à 40 γ d'acide caproïque.

Le solvant utilisé est le suivant (proportions en volumes) :

Butanol	30
Cyclohexane	30
Propylène glycol	10
Ammoniaque	0,7
Morpholine	0,07
Eau	3,5

Après une chromatographie descendante de 24 heures, les chromatogrammes sont révélés par pulvérisation d'un indicateur à base d'orthocrésol-sulfone-phtaléine et de véronal sodique, suivant une technique décrite par GUILLAUME et al. [20].

Résultats

La figure 6 montre le chromatogramme obtenu.

Dans le distillat de lait chauffé à 90°C (échantillon n° 4) on n'observe aucune trace d'acide. Cette méthode de chromatographie ne permet donc pas de déceler les petites quantités d'acide trouvées dans le distillat.

Le distillat de lait autoclavé (échantillon n° 3) donne une tache très nette d'acide formique. Cette tache présente sensiblement la même surface que la tache correspondant à 100 γ d'acide formique du mélange témoin. Cela correspond à une concentration de 6 mgr. 6 d'acide formique pour 100 millilitres de lait. Si l'on tient compte d'une perte d'environ 40 % d'acide formique au cours de la distillation, on peut évaluer la quantité d'acide formique contenu dans le lait autoclavé à environ 11 milligrammes pour 100 millilitres. On peut d'autre part observer pour l'échantillon de lait autoclavé (n° 3) une tache nette d'acide acétique. Cet acide acétique s'est formé en même temps que l'acide formique au cours du traitement du lait à l'autoclave, puisque l'échantillon de lait chauffé à 90°C ne montre aucune trace d'acide.

La solution tamponnée de lactose donne également une tache très marquée d'acide formique. Les autres acides présents dans le distillat ne sont pas décelables sur le chromatogramme.

VI. — Action de l'acide formique et de l'adénine sur la croissance des lactobacilles dans le lait

Nous avons vu dans les essais précédents que l'effet stimulant du lait autoclavé sur la croissance de *L. lactis* O 37 était dû à la présence dans ce lait d'acide formique, formé au cours du chauffage. Un effet stimulant semblable est obtenu par addition de formiate de calcium à du lait chauffé à 90°C ainsi que par addition d'adénine

à ce même lait. Dans les expériences qui suivent nous avons comparé d'une part les courbes de croissance obtenues avec *L. lactis* 0 37 dans du lait chauffé à 90°C seul ou additionné de formiate ou d'adé-

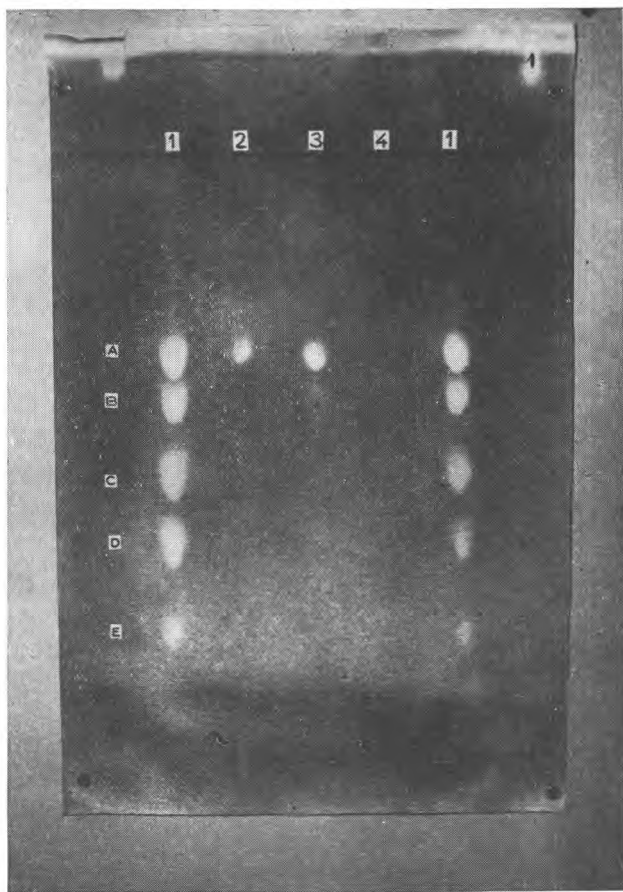


Fig. 6. — Chromatogramme obtenu par la méthode de Guillaume et Osteux. Echantillon 1 : Mélange des acides formique, acétique, propionique, butyrique et caproïque. — Echantillon 2 : Distillat d'une solution tamponnée (pH 6,6) de lactose (5 p. 100) chauffée à l'autoclave. — Echantillon 3 : Distillat de lait autoclavé. — Echantillon 4 : Distillat de lait chauffé à 90°. — A : acide formique, B : acide acétique, C : acide propionique, D : acide butyrique, E : acide caproïque,

nine, d'autre part l'effet de ces mêmes substances sur le développement de différentes souches de lactobacilles appartenant aux espèces *L. lactis* et *L. bulgaricus*.

a) Croissance de *L. lactis* O 37 dans le lait additionné de formiate ou d'adénine

Du lait prélevé et écrémé stérilement est réparti en tubes à raison de 4 millilitres de lait par tube et chauffé à 90°C pendant 30 minutes. Ces tubes sont additionnés soit de 0 ml. 5 d'une solution de formiate de calcium à 140 milligrammes pour 100 millilitres, soit de 0 ml. 5 de solution d'adénine à 40 milligrammes pour

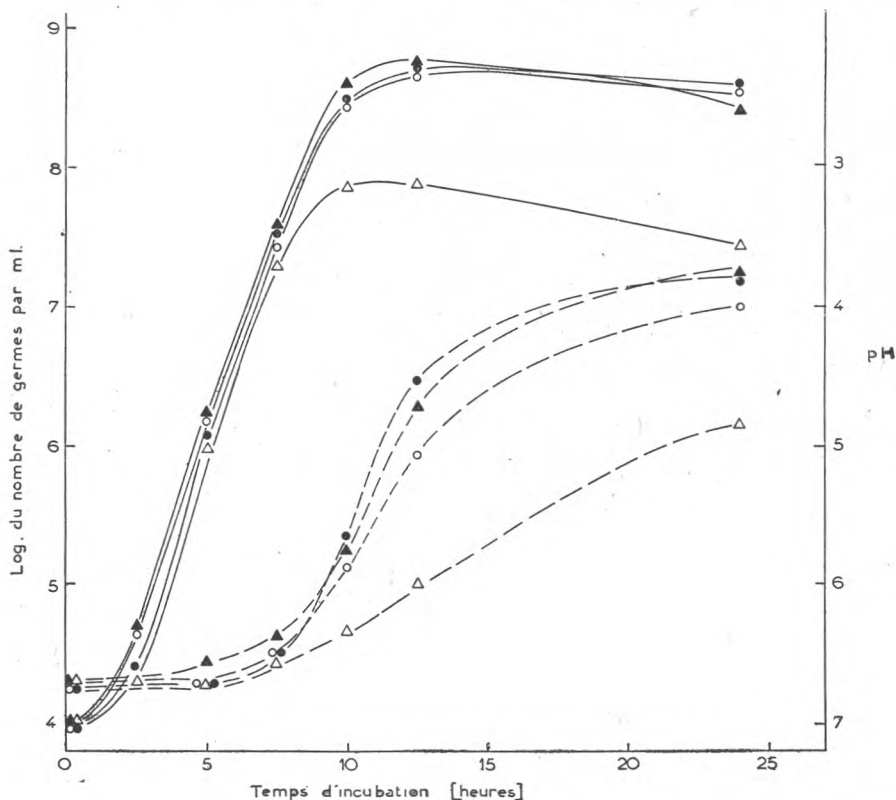


Fig. 7. — Croissance et production d'acide de *Lactobacillus lactis* O 37 : Δ : dans du lait chauffé à 90°. — \circ : dans du lait chauffé à 90° additionné de formiate de calcium (14 mgr. p. 100 ml. de lait). — \bullet : dans du lait chauffé à 90° additionné d'adénine (4 mgr. p. 100 ml. de lait). — \blacktriangle : dans du lait autoclavé.

100 millilitres, soit de 0 ml. 5 d'eau. Des tubes de lait autoclavé (120°, 25 minutes) sont préparés de la même façon en ajoutant 0 ml. 5 d'eau à 4 millilitres de lait autoclavé.

Ces tubes sont ensemencés avec 0 ml. 5 d'une dilution au 1/10.000 d'une culture fraîche et non coagulée de *L. lactis* O 37, puis ils sont placés dans un bain-marie réglé à $42^{\circ}\text{C} \pm 0^{\circ}2$. Après 0 heure, 2 h. 30, 5 heures, 7 h. 30, 10 heures, 12 h. 30, 24 heures, deux tubes de chaque catégorie de ces laits sont retirés du bain-marie et l'on effectue sur chacun de ces tubes une numération sur gélose de BRIGGS et une mesure du pH.

La figure 7 montre les résultats ainsi obtenus. On constate que la croissance du lactobacille est sensiblement la même dans le lait chauffé à 90°C additionné de formiate, dans le lait additionné d'adénine et dans le lait autoclavé. Les courbes d'acidification correspondantes sont semblables. La croissance de *L. lactis* O 37 de même que sa production d'acide est en tout cas beaucoup plus élevée dans ces trois préparations que dans le lait simplement chauffé à 90°C .

b) *Action de l'acide formique et de l'adénine sur la croissance de plusieurs souches de L. lactis et L. bulgaricus*

Sept souches de lactobacilles identifiées d'après la méthode de classification de BRIGGS [21] et WHEATER [22] ont été utilisées pour ces essais. Ce sont :

L. lactis : O 37 - L₃ - L₄,

L. bulgaricus : LB - LY₁ - LY₂ - LJ₃.

Des tubes préparés comme il vient d'être décrit dans le paragraphe précédent (lait chauffé à 90°C seul et additionné de formiate, d'adénine ou de lait autoclavé), sont ensemencés à l'aide de cultures fraîches des lactobacilles (inoculum 0,001 %) et incubés à 42°C pendant 18 heures. Le pH des cultures est alors déterminé au pH-mètre à électrode de verre.

Nous avons pu ainsi constater que, pour tous les organismes essayés, la production d'acide dans le lait chauffé à 90°C est nettement améliorée par l'addition à ce lait d'adénine et surtout de formiate. Ce dernier permet d'obtenir en général une acidification tout à fait comparable à celle que l'on observe dans le lait chauffé à 90°C additionné de lait autoclavé (1/5) dans lequel la croissance des lactobacilles est la meilleure.

Discussion

L'ensemble des résultats précédents montre que l'effet stimulant du lait autoclavé sur la croissance des lactobacilles est dû principalement à la présence dans ce lait d'acide formique formé à partir du lactose au cours du chauffage à l'autoclave.

Les produits de dégradation des protéines formés au cours du chauffage qui sont par ailleurs très actifs sur certaines espèces de streptocoques lactiques, particulièrement *Str. thermophilus* [4], [5], [23], ne semblent pas avoir de rôle important dans l'activation des lactobacilles.

Le phénomène de stimulation des bactéries lactiques par des substances provenant de la décomposition des sucres par chauffage a déjà été observé par de nombreux auteurs lors de la culture de différentes espèces bactériennes dans des milieux contenant des sucres réducteurs, stérilisés à l'autoclave [14], [24], [25], [26], [27], [28], [29]. L'effet stimulant ainsi observé a été attribué soit à des substances réductrices formées au cours du chauffage du milieu de culture [25], soit à des substances jouant le rôle d'accepteurs d'hydrogène dans le métabolisme initial des hydrates de carbone, tels que l'acide pyruvique ou l'acétaldéhyde [14], soit encore à des produits d'interaction du glucose et des composés azotés tels que la N-glucosyl-glycine [28]. Il faut remarquer cependant que le phénomène de stimulation observé par les différents auteurs cités porte sur l'« initiation » de la croissance des microorganismes, c'est-à-dire leur développement rapide à partir d'un faible inoculum, tandis que, nous l'avons montré, l'acide formique favorise avant tout la croissance totale des lactobacilles.

Parmi les différents facteurs de croissance stimulant le développement de *L. lactis* O 37 dans le lait chauffé à 90°C, seuls les composés puriques et l'acide ascorbique se sont montrés actifs. Mais tandis que l'acide ascorbique n'agissait qu'à très forte concentration, l'adénine avait une action à faible dose comparable à celle de l'acide formique. Il est difficile de dire si les phénomènes de stimulation par l'adénine et par l'acide formique sont liés ; cependant, étant donné le rôle fondamental de l'acide formique dans la synthèse biologique des purines chez l'animal [30], [31], [32], chez la levure [33] et chez *Escherichia coli* [34], on peut supposer que l'acide formique intervient également comme métabolite intermédiaire dans la synthèse de l'adénine par *L. Lactis*, et que, dans un milieu déficient en adénine tel que le lait autoclavé, l'acide formique se comporte comme un facteur de croissance pour cet organisme.

Nous avons enfin montré que, malgré l'influence stimulante considérable du lait autoclavé sur le développement de *L. lactis* O 37 la croissance maximum de cet organisme n'est atteinte cependant que dans les mélanges de lait autoclavé et de lait chauffé à 90°C (fig. 3 et 4). Nous avons attribué cet effet inhibiteur du lait autoclavé à une déficience de ce lait en une ou plusieurs substances de croissance, présentes en plus grande quantité dans le lait chauffé à 90°C.

Ce phénomène d'inhibition, particulièrement marqué dans le lait ayant subi un chauffage prolongé à l'autoclave, a déjà été observé, nous l'avons dit, par plusieurs auteurs [2], [4], [5]. Il était attribué par certains à une diminution de l'azote aminé libre due à la présence du lactose.

Ces observations sont à rapprocher des résultats obtenus par de nombreux auteurs sur l'influence défavorable de la stérilisation à l'autoclave des milieux de culture contenant des sucres réducteurs : un tel chauffage provoque en effet la disparition de substances de croissance variées et particulièrement des acides aminés soufrés [35], [36], [37], [38] et aussi la formation de substances inhibant le développement des bactéries [23], [39].

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. E. AUCLAIR et A. PORTMANN. Influence du chauffage du lait sur le développement des bactéries. I. Croissance des bactéries lactiques dans des laits chauffés à des températures variables. *Ann. I. N. R. A., Série E, Techn.*, **4**, 121-131, 1955 ; *Le Lait*, 1956, **36**, 145.
- [2] S. ORLA-JENSEN et J. JACOBSEN. Neue Untersuchungen über die bakteriziden Eigenschaften der Milch. *Zlb. Bakt. Parasitenk*, II Abt. **80**, 321-341, 1930.
- [3] M. E. TYLER et H. H. WEISER. Factors affecting Swiss cheese starter activity. Effect of heat treatment and source of milk. *J. Dairy Sci.*, **25**, 939-948, 1942.
- [4] E. M. FOSTER. The effect of heat on milk as a culture medium for lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.*, **35**, 988-997, 1952.
- [5] R. B. PARKER et P. R. ELLIKER. Effect of heat treatment of milk on subsequent activity of starter culture. *Proc. W. Div. Amer. Sci. Ass.*, 361-365, 1954.
- [6] M. BRIGGS. An improved medium for lactobacilli. *J. Dairy Res.*, **20**, 36-40, 1953.
- [7] K. M. SHAHANI et H. H. SOMMER. The protein and non-protein nitrogen fractions in milk. II. Their content in fresh raw milk. *J. Dairy Sci.*, **34**, 1010-1013, 1951.
- [8] I. A. GOULD. The formation of volatile acids in milk by high-temperature heat treatment. *J. Dairy Sci.*, **28**, 379-386, 1945.
- [9] I. A. GOULD et R. S. FRANTZ. Formic acid content of milk heated to high temperatures as determined by the distillation procedure. *J. Dairy Sci.*, **29**, 27-31, 1946.
- [10] J. KERN, H. H. WEISER, W. J. HARPER et I. A. GOULD. Observations on organic acids formed during the heat sterilization of milk. *J. Dairy Sci.*, **37**, 904, 1954.
- [11] C. V. MORR, W. J. HARPER et I. A. GOULD. Some organic acids in raw and heated skimmilk. *J. Dairy Sci.*, **40**, 964-972, 1957.
- [12] S. PATTON. Lactose degradation in heated milk. *J. Dairy Sci.*, **33**, 410, 1950.

- [13] E. E. SNELL. The nutrition of the lactic acid bacteria. *Bact. revs.*, **16**, 235-241, 1952.
- [14] K. L. SMILEY, C. F. NIVEN, J. R. SHERMAN et J. M. The nutrition of *Str. salivarius*. *J. Bact.*, **45**, 445-454, 1943.
- [15] B. KRAUSS. Zur Kenntnis der Veränderungen des Milchzuckers beim Erhitzen von neutralen, wässrigen Lösungen und Milch. *Kieler Milchw. Forschungsberichte*, **7**, 289-322, 1955.
- [16] M. E. GREFFORY, J. E. FORD et S. K. KON. A vitamin B₁₂ binding factor in sow's milk. *Biochem. J.*, **51**, XXIX, 1952.
- [17] S. MOORE et W. H. STEIN. Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins. *J. Biol. Chem.*, **192**, 663-681, 1951.
- [18] K. BRYANT et B. T. OVERELL. Quantitative chromatographic analysis of organic acids in plant tissues extracts. *Biochem. Biophys. Acta*, **10**, 471-476, 1953.
- [19] J. GUILLAUME et R. OSTEUX. Détermination des acides aliphatiques volatils de C₁ à C₆ dans les liquides biologiques par chromatographie sur papier. *C. R. Acad. Sci.*, **241**, 501-502, 1955.
- [20] J. GUILLAUME, H. BEERENS et R. OSTEUX. La chromatographie sur papier des acides aliphatiques volatils de C₁ à C₆. Son application à la détermination des bactéries anaérobies. *Ann. Inst. Pasteur Lille*, **8**, 13-52, 1956.
- [21] M. BRIGGS. The classification of lactobacilli by means of physiological tests. *J. Gen. Microbiol.*, **9**, 234-248, 1953.
- [22] D. WHEATER. The characteristics of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Gen. Microbiol.*, **12**, 123-132, 1955.
- [23] J. E. AUCLAIR et A. PORTMANN. Influence du chauffage du lait aux températures de pasteurisation et de stérilisation sur la croissance des bactéries lactiques. 14^e Congrès intern. Laiterie, Rome, 1956, vol. I, partie 2, p. 17-30.
- [24] A. D. ORLA-JENSEN. Hitherto unknown activators for the growth of lactic acid bacteria. *J. Soc. Chem. Ind.*, **52**, T, 374-379, 1933.
- [25] J. C. RABINOWITZ et E. E. SNELL. The vitamin B₆ group. XI. An improved method for assay of vitamin B₆ with *Str. faecalis*. *J. Biol. Chem.*, **169**, 631-642, 1947.
- [26] E. E. SNELL, E. KITAY et E. HOFF-JORGENSEN. Carbohydrate utilization by a strain of *Lactobacillus bulgaricus*. *Arch. Biochem.*, **18**, 495-510, 1948.
- [27] C. E. HOFFMANN, E. L. R. STOKSTAD, B. L. HUTCHINGS, A. C. DORN-BUSH et T. H., JUKES. The microbiological assay of vitamin B₁₂ with *Lactobacillus leichmanii*. *J. Biol. Chem.*, **181**, 635-644, 1949.
- [28] D. ROGERS, T. E. KING et V. H. CHELDELIN. Growth stimulation of *Lactobacillus gayoni* by N-D-glucosylglycine. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **82**, 140-144, 1953.
- [29] H. H. RAMSEY et C. E. LANKFORD. Stimulation of growth initiation by heat degradation products of glucose. *J. Bact.*, **72**, 511-518, 1956.
- [30] J. R. TOTTER, E. VOLKIN et C. E. CARTER. Incorporation of isotopic formate into the nucleotides of ribo and desoxyribonucleic acids. *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 1521-1522, 1951.

- [31] R. M. S. SMELLIE, W. M. Mc INDIE et J. N. DAVIDSON. The incorporation of ^{15}N , ^{35}S and ^{14}C into nucleic acids and proteins of rat liver. *Biochem. Biophys. Acta*, **11**, 559-565, 1953.
- [32] G. A. HAYDAR, F. CHERNIGOY, A. KHATCHADOURIAN et S. E. KERR. Incorporation of C^{14} labeled glycine and formate by the acid-soluble guanine and adenine nucleotides of rat liver. *J. Biol. chem.*, **221**, 707-712, 1957.
- [33] S. E. KERR et F. CHERNIGOY. On the biosynthesis of ribonucleic acid purines and their interconversion in yeast. *J. Biol. Chem.*, **200**, 887-894, 1953.
- [34] A. J. TOMISEK, H. J. KELLY et H. E. SKIPPER. Chromatographic studies of purine metabolism. I. The effect of azaserine on purine biosynthesis in *E. coli* using various C^{14} labeled precursors. *Arch. Biochem. Biophys.*, **64**, 437-455, 1956.
- [35] A. R. PATTON et E. G. HILL. Inactivation of nutrients by heating with glucose. *Science*, **107**, 68-69, 1948.
- [36] R. A. Mc ALLISTER. The inactivation of certain nutrients in culture media by heating with glucose and its relation to the growth of certain lactobacilli. *J. med. lab. Tech.*, **12**, 74-79, 1954.
- [37] C. E. LANKFORD, J. M. RAVEL et H. H. RAMSEY. The effect of glucose and heat sterilization on bacterial assimilation of cystine. *Appl. Microbiol.*, **5**, 65-69, 1957.
- [38] J. E. AUCLAIR. Studies on the antibacterial properties of cow's milk. Ph. D. Thesis, University of Reading, 1953.
- [39] R. A. FINKELSTEIN et C. E. LANKFORD. A bacteriotoxic substance in autoclaved culture media containing glucose and phosphate. *Appl. Microbiol.*, **5**, 74-79, 1957.

LA PRODUCTION LAITIÈRE FRANÇAISE DANS LE MARCHÉ COMMUN

par

A. des COURTILS

Au moment où nous vivons les premiers mois d'application du Traité de Rome, il paraît très difficile de situer exactement comment se présentera le marché laitier français dans le Marché Commun et quelle sera l'évolution économique de ce secteur sous l'influence des conditions nouvelles créées au travers des différentes étapes de sa mise en fonctionnement.

Le problème est complexe. C'est pourquoi je me limiterai aujourd'hui à l'examen rapide de ses principaux éléments.