

N^o 810

ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE LYON

Année scolaire 1928-1929 — N^o 170

Emploi de l'acétone en analyse

dans la

chimie biologique

Essais sur le lait



THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

et soutenue publiquement le 23 Mars 1929

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

PAR

Louis COMBY

Né le 16 Juillet 1905 à TOUL (Meurthe-et-Moselle)



LYON

Imprimerie BOSC Frères & RIOU

42, Quai Gailleton, 42

1929

EMPLOI de l'ACÉTONE en ANALYSE dans la CHIMIE BIOLOGIQUE
ESSAIS sur le LAIT

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE LYON

Année scolaire 1928-1929 — N° 170

Emploi de l'acétone en analyse

dans la

chimie biologique

Essais sur le lait

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

et soutenue publiquement le 23 Mars 1929

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

PAR

Louis COMBY

Né le 16 Juillet 1905 à TOUL (Meurthe-et-Moselle)



LYON

Imprimerie BOSC Frères & RIOU

42, Quai Gailleton, 42

1929

PERSONNEL ENSEIGNANT DE L'ÉCOLE VÉTÉRINAIRE DE LYON

Directeur..... M. CH. PORCHER.
Directeur honoraire. M. F.-X. LESBRE.
Professeur honoraire M. ALFRED FAURE, ancien Directeur.

PROFESSEURS

Physique et chimie médicale, Pharmacie, Toxicologie..	MM. PORCHER
Botanique médicale et fourragère, Zoologie médicale, Parasitologie et Maladies parasitaires.....	MAROTEL
Anatomie descriptive des animaux domestiques, Téra- tologie, Extérieur.....	TAGAND. JUNG
Physiologie, Thérapeutique générale, Matière médicale Histologie et Embryologie, Anatomie pathologique, Inspection des denrées alimentaires et des établis- sements classés soumis au contrôle vétérinaire...	BALL
Pathologie médicale des Equidés et des Carnassiers, Clinique, Sémiologie et Propédeutique, Jurispru- dence vétérinaire	CADEAC
Pathologie chirurgicale des Equidés et des Carnas- siers, Clinique, Anatomie chirurgicale, Médecine opératoire	DOUVILLE
Pathologie bovine, ovine, caprine, porcine et aviaire. Clinique, Médecine opératoire, Obstétrique.....	CUNY
Pathologie générale et Microbiologie, Maladies micro- biennes et police sanitaire, Clinique.....	BASSET LETARD
Hygiène et Agronomie, Zootechnie et Economie rurale.	

CHEFS DE TRAVAUX

MM. AUGER. M. TAPERNOUX, Chef de Travaux, agrégé.
LOMBARD.

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

Président : M. le Dr Albert MOREL, Professeur à la Faculté de Médecine
chevalier de la Légion d'honneur.

Assesseurs : M. le Professeur Ch. PORCHER, Directeur à l'Ecole Vétéri-
naire de Lyon, Officier de la Légion d'honneur.

M. L. JUNG, Professeur à l'Ecole Vétérinaire.

La Faculté de Médecine et l'Ecole Vétérinaire déclarent que les
opinions émises dans les dissertations qui leur sont présentées doivent
être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elles n'entendent
leur donner ni approbation ni improbation.

A MON PÈRE ET A MA MÈRE

En témoignage de notre recon-
naissance et de notre profonde
affection.

A MONSIEUR LE VÉTÉRINAIRE-COLONEL SCHELAMEUR

En témoignage de notre profonde reconnaissance pour l'intérêt qu'il n'a cessé de nous porter et pour les précieux conseils qu'il nous a prodigués.

A MON PRÉSIDENT DE THÈSE

MONSIEUR LE PROFESSEUR ALBERT MOREL
de la Faculté de Médecine de Lyon

A MES JUGES :

MONSIEUR LE PROFESSEUR CH. PORCHER

MONSIEUR LE PROFESSEUR L. JUNG

A TOUS MES MAÎTRES
de l'École vétérinaire de Lyon

A MES PROFESSEURS
de l'École de cavalerie de Saumur

Avant-Propos

Le Vétérinaire n'est plus seulement aujourd'hui un médecin et un hygiéniste, mais un zootechnicien. Et si son rôle d' « ingénieur des machines animées » s'affirme chaque jour davantage, c'est que ses études, sa formation intellectuelle font qu'il est particulièrement compétent. « Je puis dire hautement, proclame le Professeur Ch. Porcher, que si, depuis tant d'années déjà, j'ai fait quelques recherches heureuses dans la question du lait, c'est surtout parce que je n'ai jamais oublié que j'étais vétérinaire ».

Néanmoins, le vétérinaire n'occupe peut-être pas encore dans ce nouveau domaine toute la place à laquelle il peut légitimement prétendre, mais ce sera à lui de la conquérir et, à cet égard, la parole d'un Maître aussi éminent que le Professeur Ch. Porcher est un encouragement puissant. C'est pourquoi il nous a paru à la fois intéressant et utile de consacrer nos études vétérinaires par un travail touchant à un point de l'analyse du lait. Ce ne sont que des essais, mais nous croyons néanmoins utile de les exposer.

La caséine est, après la matière grasse du lait, l'élément susceptible des variations les plus sensibles. Aussi avons-nous été frappés du peu d'importance que l'on semble généralement attacher aux variations de cette protéine, tant dans les concours que dans le contrôle laitier. Et cependant, si l'on veut bien se souvenir un instant de l'importance capitale des matières protéiques dans l'alimentation, il ne serait certainement pas sans intérêt de pouvoir doser cette richesse du lait en principes azotés. Par ailleurs, dans les régions d'industrie fromagère, on aurait avantage à déterminer, de façon simple, mais précise, la matière sèche du lait et en particulier la caséine. Jusqu'ici il n'existait que deux méthodes pour la recherche de la caséine: celle de Denigès, un peu compliquée, et celle de Steinegger-Graaf, plus simple mais peu exacte. Cela suffit à expliquer pourquoi ni l'une ni l'autre de ces méthodes n'est passée dans le domaine de la pratique.

C'est pourquoi, nous appuyant sur la propriété encore assez peu connue de l'acétone de précipiter la caséine, nous avons cru faire œuvre utile en nous essayant à mettre au point un procédé de dosage de la caséine qui fut en quelque sorte l'équivalent de la méthode Gerber pour le dosage de la matière grasse, c'est-à-dire un procédé qui fut d'une exécution à la fois simple et rapide.

Qu'il nous soit permis d'exprimer ici notre vive gratitude à Monsieur le Professeur Ch. Porcher, qui a été en quelque sorte l'animateur de cette thèse et qui a grandement facilité notre tâche en mettant son laboratoire à notre disposition et en guidant sans cesse nos recherches. Nous le remercions de l'extrême bienveillance

qu'il a toujours manifestée à notre égard et nous sommes heureux de profiter de cette occasion qui s'offre à nous, pour lui témoigner notre profonde et sincère admiration.

Nos remerciements iront également à Monsieur le Professeur A. Morel, de la Faculté de Médecine de Lyon, qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de cette thèse, ainsi qu'à Monsieur le Professeur L. Jung, qui a bien voulu faire partie de notre Jury.

EMPLOI de l'ACÉTONE en ANALYSE dans la CHIMIE BIOLOGIQUE
ESSAIS sur le LAIT

CHAPITRE PREMIER

Généralités

L'analyse en chimie générale, et plus particulièrement en chimie biologique, emploie très couramment l'alcool à des titres divers, pour provoquer des précipités dans les liqueurs en expériences. Tantôt, c'est ce précipité qui intéresse le chercheur, tantôt, au contraire, c'est le liquide surnageant.

Comme les liqueurs sont toujours aqueuses, plus ou moins fortement, l'alcool introduit se trouve par conséquent dilué, et il en faut parfois de grandes quantités, de façon que le titre alcoolique que l'on doit atteindre pour obtenir une séparation satisfaisante soit élevé.

Pour cette raison, on n'a rarement recours à l'alcool absolu qui se trouverait, lui aussi, dilué, et comme il

coûte cher, mieux vaut employer des alcools forts à 95° dont on aura la ressource d'employer une plus grande quantité.

Le reproche que l'on peut adresser à l'alcool, d'une façon générale, c'est, en effet, de coûter cher. Son inconvénient, c'est d'avoir un point d'ébullition relativement élevé: 78°3, et de former avec l'eau des hydrates, si bien que la distillation fractionnée, dans le but de se débarrasser de l'alcool précédemment utilisé, demande du temps, et n'aboutit pas toujours à une parfaite séparation.

Si l'on employait l'alcool méthylique dont le point d'ébullition est plus bas: 66°, on aurait, par ailleurs, les mêmes inconvénients.

Pour les raisons qui viennent d'être exposées, plusieurs auteurs, depuis longtemps ont eu l'idée de recourir à l'acétone. C'est un liquide miscible à l'eau, mais ne donnant pas avec celle-ci des hydrates, pouvant être séparé de l'eau par addition de sels.

L'acétone est miscible également avec l'alcool et l'éther. Son point d'ébullition est bas: 56°. La distillation fractionnée sépare aisément l'acétone de l'eau, et complètement, et pour peu que dans certains cas, on veuille recourir à l'emploi du vide, cela ne peut que faciliter le départ de l'acétone.

Le commerce livre de l'acétone à l'état anhydre, à 100 %. Dans les récupérations d'acétone que l'on effectue au laboratoire et qui permettent de la rectifier facilement, aboutirait-on à une acétone légèrement hydratée, qu'on peut la dessécher complètement, d'abord sur du chlorure de calcium fondu, ensuite, s'il est nécessaire sur le sodium.

Il devient donc commode d'avoir à sa disposition un liquide miscible à l'eau, de point d'ébullition bas, très facile à séparer de ses solutions aqueuses et pur. Il en résulte que la substitution de l'acétone à l'alcool, dans maintes opérations de la chimie biologique, peut se réaliser, d'autant plus que l'acétone, mieux que l'alcool, est un excellent dissolvant des graisses.

Parmi les auteurs qui ont eu recours à l'acétone dans l'analyse immédiate, en chimie biologique, il faut citer: A. Fournier, Terroine, M. Piettre et A. Vila, A. Ionescu-Matiu et C. V. Bordeiano, et Ch. Porcher.

Notre maître, le Professeur Ch. Porcher, étudiant le sucre du lait de bufflesse (1) montre les heureux résultats qu'il a obtenus par l'acétone pour la séparation de ce lactose.

Le lait est additionné de son volume d'eau distillée, puis de 5 cm³ d'acide acétique par litre. La caséine précipite rapidement; quand elle est bien rassemblée, on filtre et le sérum est exactement neutralisé par la soude. On filtre de nouveau, et on évapore au B. M. à consistance sirupeuse. La liqueur jaune-brunâtre est agitée dans un entonnoir à robinet avec de l'acétone ajouté peu à peu. Il se sépare à un moment donné une masse épaisse brune qui entraîne avec elle la matière colorante. On sépare le liquide hydro-acétonique d'une jaune très pâle et on y ajoute un excès d'acétone qui détermine la précipitation du sucre sous forme de masses bien cristallisées, craquant sous le doigt et sous la dent. Purifié par deux cristallisations dans l'eau, ce produit a été caractérisé comme lactose par des réactions dont Ch. Porcher parle dans son travail.

Retenons la simplicité de la technique qui ne visait, il est vrai, ici, qu'une séparation massive d'un corps qu'il fallait ensuite caractériser. Aucune recherche quantitative n'a été faite et la matière première était abondante. Si l'acétone ne devait être utilisé que dans des circonstances analogues, ses emplois seraient en somme restreints. Nous noterons qu'il a été procédé ici à la précipitation en deux étapes. D'abord la séparation d'une masse brunâtre qui a entraîné le pigment qui s'était développé lors de la concentration de la liqueur; ensuite, un excès d'acétone a précipité le lactose de la première liqueur hydro-acétonique.

Il est intéressant et remarquable, tout à la fois, de constater que du premier jet, on a obtenu des cristaux de lactose qu'il n'y a plus eu qu'à purifier par deux redissolutions. L'acétone, en effet, dissout très peu de corps, ne dissout pas les sucres, très peu de sels. Tout dépend du taux de sa concentration dans l'eau. Il est donc possible, tout cela n'est qu'une question de quantité d'acétone à employer, d'obtenir des précipitations successives qui sont sous la dépendance de la richesse de la liqueur en acétone. On peut donc aller depuis des solutions peu acétoniques jusqu'à pour ainsi dire de l'acétone pur.

Fournier (2), dans ses recherches sur l'extraction des lipides du sang, substitue l'acétone à l'alcool à la suite des considérations suivantes:

« Dès 1902, ayant à préparer de fortes quantités de lécithine du jaune d'œuf de poule, nous avons appliqué l'acétone à l'extraction des matières grasses dont les jaunes desséchés contiennent environ 50 %. Un traite-

ment consécutif à l'alcool à 95° nous fournissait la majorité de la lécithine.

« Ayant voulu opérer directement sur le jaune d'œuf frais, nous avons constaté une précipitation complète des protéines quand on fait écouler le jaune dans un excès d'acétone. En même temps, celui-ci s'emparait des graisses en se colorant vivement, les protéines se trouvant, d'autre part, décolorées, surtout si elles étaient ultérieurement épuisées par de nouvelles quantités d'acétone. Mais elles conservaient la plus grande partie de la lécithine dont l'alcool pouvait consécutivement s'emparer.

« Nous ne savons si cette propriété précipitante de l'acétone avait été signalée à cette époque, mais nous avons reconnu qu'elle se manifestait à l'égard de tous les liquides albumineux: blanc d'œuf, lait, sang et ses divers constituants. Nous ne pouvions, au reste, en être surpris. Les solvants des graisses (chloroforme, éther), sont aussi des coagulants des matières protéiques. L'alcool possède cette propriété à un plus haut degré, vraisemblablement à cause de sa miscibilité à l'eau et de son affinité pour elle. Or, comme l'alcool, l'acétone est miscible à l'eau en toutes proportions et si son affinité chimique pour l'eau est contestable; en revanche, c'est un solvant des graisses très supérieur à l'alcool, du moins à température égale.

« Nous avons pensé alors que l'acétone pourrait être appliqué avec certains avantages à l'analyse des substances organisées et de leurs dérivés, en utilisant sa double propriété coagulante des protéines et solvante des graisses. De plus, nous pouvions espérer qu'il per-

mettait la séparation des lécithines de ces dernières. »

A. Fournier a utilisé l'acétone dans l'examen des protéines du blanc d'œuf et il trouve que ce solvant, comparé à la chaleur aidée des acides, précipite mieux les protéines.

Il essaye successivement l'acétone sur une solution de peptones sur le lait écrémé déjà digéré, sur le lait naturel, et voici les résultats qu'il obtient :

« *Action précipitante de l'acétone sur les peptones.* — Une peptone en poudre (marque Poulenc) dissoute dans l'eau, est précipitée par l'acétone avec facilité, même sous une assez grande dilution. La précipitation paraît s'effectuer mieux qu'avec l'alcool.

Action précipitante de l'acétone sur du lait écrémé soumis à la digestion sous l'influence d'un microbe protéolytique actif. — Ce lait, filtré, est d'un jaune clair. La chaleur + acide acétique ne donne rien. Le ferrocyanure acétique détermine un léger louche, au moins avec le temps. La liqueur de Tanret donne un précipité abondant, soluble par la chaleur, se reformant avec le froid. L'alcool et l'acétone employés à volumes égaux, on constate que l'acétone donne un précipité beaucoup plus abondant.

Action précipitante de l'acétone sur le lait naturel. — De même avec le lait naturel non écrémé. Le précipité acétonique est immédiat, mais reste en suspension quelque temps. L'acétone filtré et évaporé laisse une matière grasse abondante (beurre).

« Le précipité acétonique, repris par l'alcool, donne à son tour, mais en très petite quantité, un résidu gras (lécithine?) »

Comme ne manque pas de le faire remarquer A. Fournier, ces expériences de début constituent, à vrai dire, un encouragement à examiner l'action de l'acétone sur d'autres milieux riches en matières protéiques. En ce qui concerne le jaune d'œuf, sa supériorité sur l'alcool ne paraît absolument pas douteuse : séparation intégrale des protéines à l'instar de l'alcool, mais pouvoir dissolvant des graisses très supérieur, les dites graisses étant médiocrement miscibles à l'alcool, surtout à froid, où leur précipitation est presque complète : enfin isolement très satisfaisant des lécithines, entraînées par l'alcool après l'action de l'acétone, d'avec les autres lipides.

Les avantages et les inconvénients de l'alcool et de l'acétone, mis en balance, ont engagé A. Fournier à accorder la préférence à l'acétone dans les cas où l'on fait habituellement agir l'alcool à froid aux fins d'analyses sur les tissus et les matières en dérivant.

CHAPITRE II

Séparation des protéines du sang par l'acétone

M. Piettre, soit seul, soit en collaboration avec A. Vila, a utilisé l'acétone pour la séparation des protéines du sang et du lait. Il ne s'agit plus cette fois d'une précipitation massive, mais bien d'une précipitation fractionnée.

Dans une suite de publications (3 et 4), ils donnent les principes de leur technique dont on trouvera ci-dessous le détail ainsi qu'il résulte des recherches faites dans le laboratoire même de M. Piettre par Mlle J. Brigando, préparatrice à l'Institut des recherches agronomiques.

Le Professeur Ch. Porcher et Mlle J. Brigando, dans leurs recherches sur le lait de femme dont les premiers résultats ont été donnés par Ch. Porcher dans une conférence faite à la clinique Tarnier dans le service du

Professeur Brindeau ⁽⁵⁾, ont été mis dans l'obligation de préparer de la globuline et de la sérine pures. Cela leur a permis de montrer que le pouvoir protecteur de la sérine est faible, alors que celui de la globuline est très élevé, et contribue pour une grande part à donner au lait de femme son inertie vis-à-vis des acides et de la présure.

La technique de M. Piettre et A. Villa comprend plusieurs temps :

1° *Déminéralisation et extraction des lipides ;*

2° *Séparation des protéines.*

Le sérum sanguin, — ici il s'agissait de sérum de vache, — est refroidi à 0°. On lui ajoute, en agitant, deux fois et demie son volume d'acétone, lui-même préalablement refroidi à 0°, car si l'on n'opérait pas à cette température, la séparation des protéines deviendrait par la suite très difficile, sinon impossible. Onessore au vide sur Büchner, en décantant d'abord la partie claire. Il faut opérer très vite pour éviter que la masse s'échauffe. Le gâteau de protéine recueilli sur le filtre est malaxé à l'aide d'une spatule sur le filtre même à deux reprises avec de l'acétone froid à 0°, de façon à enlever le reste de l'eau et des sels minéraux solubles dans l'acétone, ainsi que les matières grasses. On fait ensuite deux ou trois lavages à l'éther sec pour enlever les éthers de la cholestérine et l'acétone restant. L'éther a été desséché sur du carbonate de soude sec ou du sulfate de soude anhydre, et on filtre.

Finalement, on a sur le filtre une poudre blanche constituée par un mélange de sérine, de globuline, et un autre produit intermédiaire que M. Piettre désigne sous le nom de myxo.

Séparation des protéines

S'agit-il d'un produit répondant à une protéine vraiment définie, ou comme l'indique plutôt le nom donné par M. Piettre, d'un mélange dont les proportions d'albumine et de globuline dépendent des conditions dans lesquelles on opère. La question n'est pas encore résolue, mais ce qu'il importe, c'est que l'on obtienne, en laissant de côté cette myxo-protéine, une séparation très nette de l'albumine et de la globuline.

1° *Précipitation de la globuline.* — La poudre blanche obtenue comme ci-dessus est dissoute dans un volume et demi d'eau distillée, l'unité de volume étant le volume du sérum employé. Si donc, on a travaillé sur 100 cm³ de sérum, on dissoudra dans 150 cm³ d'eau distillée. On mouille avec un peu d'éther, car on a constaté que les albumines se dissolvent ainsi mieux. La globuline passe en solution à la faveur du carbonate de sodium retenu dans le gâteau. En somme, la solution obtenue est un mélange de sérine et de globuline. Le caractère acide de la globuline est bien connu, et il y aura donc maintenant à précipiter cette globuline de son sel par un acide étendu. Il faut opérer avec beaucoup de précautions, sinon la globuline se redissoudrait dans un excès d'acide. Si on n'apportait pas assez d'acide, il resterait de la globuline en solution. La précipitation doit s'effectuer au point isoélectrique, qui, pour la globuline, est aux environs de 5,2-5,3.

Au laboratoire, on peut déterminer la précipitation maximum de la globuline en repérant la floculation la plus marquée. Dans des tubes à essais, on prend des prises de la solution de sérine et de globuline variant de 0,5 cm³ à 1 cm³, et on verse, soit de l'acide sulfurique, soit de l'acide chlorhydrique N/100 pour précipiter la globuline qui se rassemble sous la forme de flocons, lesquels se déposent rapidement pour laisser un liquide surnageant limpide. La quantité d'acide étant ainsi définie, on verse dans la liqueur le volume d'acide N/10 ou N/100 qui est nécessaire. En employant de l'acide plus concentré que pour les essais, on évite des dilutions trop considérables. L'acide provoque dans la masse de la liqueur un volumineux précipité qu'on laisse se déposer 12 heures. On décante la liqueur claire, et on centrifuge le dépôt. Il faut au moins 10 minutes pour cette première centrifugation. Le culot est lavé ensuite avec de l'eau distillée saturée d'éther pour éliminer la sérine mélangée à la globuline, et on centrifuge encore. Le temps nécessaire pour cette deuxième centrifugation est de 15 à 20 minutes. Les eaux de lavage de ces deux opérations doivent représenter environ la moitié du volume initial.

Toutes ces opérations: précipitations de la globuline et centrifugations peuvent s'effectuer à la température ordinaire.

2° Concentration et purification de la sérum-albumine. — On ajoute à la liqueur claire qui comprend la liqueur décantée au sein de laquelle la globuline avait été précipitée et les deux liqueurs correspondant aux

deux centrifugations, son volume d'acétone. On opère à 0° comme pour la précipitation massive des protéines. La liqueur est refroidie dans la glace fondante ainsi que l'acétone. Le précipité obtenu est constitué par la sérum-albumine dans sa plus grande partie, et par la myxoprotéine. On centrifuge. Il est recommandé d'opérer très rapidement afin d'éviter le plus possible l'échauffement du milieu. Le culot de centrifugation est malaxé avec une petite quantité d'eau distillée ajoutée peu à peu. Il faut bien délayer de façon à n'avoir aucun grumeau en suspension. La quantité d'eau distillée qu'on doit ajouter pour dissoudre la sérum-albumine égale tout au plus le volume originel du sérum. On centrifuge à nouveau; on a une liqueur claire contenant la sérum-albumine, et au fond du tube un produit gélatineux transparent, légèrement teinté en jaune qui est la myxoprotéine.

La liqueur surnageant, claire comme il vient d'être dit, qui contient la sérum-albumine, est concentrée sous le vide sulfurique à la température ordinaire. Avant cependant, il est recommandé de la purifier pour en éliminer le plus possible les cendres; pour cela, la sérum-albumine est dissoute dans un volume minimum d'eau représentant environ la moitié du volume initial, refroidi à 0°, et précipité par un égal volume d'acétone, refroidi également à 0°. On centrifuge rapidement. Cinq minutes sont nécessaires. Le culot de centrifugation est repris par de l'eau distillée, et on recommence une précipitation par l'acétone. On peut ainsi faire plusieurs redissolutions et reprécipitations successives. M. Piettre et A. Vila en ont effectué jusqu'à 10.

La globuline obtenue précédemment était desséchée également sous le vide sulfurique, mais sans qu'il soit nécessaire de passer par les redissolutions aqueuses et les reprecipitations acétoniques, comme il vient d'être dit pour la sérum-albumine.

*Différence et caractérisation de la globuline
et de la myxo-protéine*

La globuline est soluble dans la soude et dans les acides; elle est insoluble dans les solutions de chlorure de sodium. La myxo-protéine est soluble dans les solutions de chlorure de sodium (sérum physiologique).

Purification de la myxo-protéine

La myxo-protéine dissoute dans le sérum physiologique peut être reprecipitée par un égal volume d'acétone. Il faut toujours opérer à 0°. On centrifuge et on lave ensuite.

Purification de la globuline

Cette purification ne se fait pas comme nous venons de le dire au moyen de redissolutions aqueuses et de reprecipitations acétoniques. On utilise ici la propriété de la globuline de se dissoudre dans les alcalis. On peut donc, avant de la dessécher sous le vide sulfurique, la dissoudre dans la soude 5/10, juste la quantité nécessaire. On malaxe bien, en solution concentrée, et on ajoute ensuite l'eau distillée pour faire une solution plus diluée. On précipite à nouveau par une quantité de HCl N/10 correspondant à la soude utilisée.

CHAPITRE III

Séparation des protéines du lacto-sérum

M. Piettre a également utilisé, comme nous le faisons remarquer plus haut, l'acétone pour séparer les protéines du lacto-sérum (6).

Nous donnons ici la technique de cet auteur:

« La séparation des protéines du lait: caséine, lactoglobuline, lactalbumine, est basée sur la méthode classique des précipitations salines massives, légèrement modifiée suivant que l'on veut obtenir plus spécialement l'une d'elles.

« Nous proposons d'appliquer à la séparation des protéines solubles au lacto-sérum la méthode à l'acétone instituée par A. Vila et nous-même pour le traitement analytique du sérum ou du plasma sanguin.

« I. Pour cela il convient tout d'abord de se débarrasser de la caséine en la précipitant en fins grumeaux, ce qui facilite l'obtention rapide du lacto-sérum et même le lavage de la caséine précipitée.

« Au lieu de laisser le lait se coaguler lentement, comme il est d'usage, on effectue la coagulation en agitant très vivement le liquide maintenu aux environs de 35° pendant qu'on ajoute goutte à goutte une solution assez concentrée de présure commerciale. En quelques minutes, suivant la force de la diastase, le lait se trouble; on voit apparaître de fins grumeaux de caséine et se séparer le lacto-sérum. On filtre sur trompe, en écrasant, à la fin de l'opération, les grumeaux de caséine qui tendent à s'agglomérer. Un litre de lait donne en moyenne 925 cm³ de sérum, contenant une protéine susceptible de s'insolubiliser dans l'eau et la lactalbumine qu'il s'agit de séparer.

« II. Pour réaliser la séparation, on commence par neutraliser la très faible alcalinité que possède la lacto-sérum vis-à-vis du tournesol sensible, marque Gallois. Il faut environ 0 cm³ 45 de HCl N/100 par centimètre cube, mais l'expérience montre qu'on doit atteindre une légère acidité en vue des opérations ultérieures. On ajoute donc au sérum, en HCl N/10 ou N/1, la quantité d'acide correspondant à 0 cm³ de HCl N/100 par centimètre cube (dans nos essais, 706 cm³ permettaient la séparation presque parfaite des deux protéides) et l'on épulse avec soin à l'éther, en évitant une trop forte émulsion.

« Le liquide décanté parfaitement clair, est alors précipité aux environs de 0° à l'aide d'acétone également refroidi (1 vol. à 1 vol. 35 d'acétone), et, après quelques instants de repos, filtré sur trompe avec les précautions d'usage pour retenir les gros flocons peu consistants des protéides. Bien égoutté, le filtrat est seulement lavé

à l'éther sec à une ou deux reprises. On le détache à l'aide d'un scalpel en mouillant le filtre, puis on le met dans une capsule en présence d'un volume d'eau distillée correspondant environ au 1/10 du volume du sérum engagé. Après 12 heures de contact, on écrase avec soin les grumeaux qui persistent, rend le mélange bien homogène, fait un volume exact et détermine sur de petits essais (0 cm³ 5 étendu à 1 cm³ avec de l'eau distillée) la très petite quantité de HCl N/100 provoquant la meilleure précipitation de la protéine soluble. Avant d'ajouter à l'ensemble de la liqueur trouble l'acide N/10 ainsi calculé, on la sature à froid d'éther. On laisse reposer au froid et centrifuge.

« Si, comme il a été dit plus haut, on a ajouté du premier coup 0 cm³ de HCl N/100 par centimètre cube de lacto-sérum, cette dernière manipulation un peu longue se trouve évitée. Il suffit de rendre homogène le mélange bien refroidi en l'agitant vigoureusement avec de l'éther. L'emploi de l'éther est extrêmement précieux, comme nous l'avons déjà indiqué; dans la manipulation des liquides contenant des substances minérales ou organiques à grosse molécule, en solution ou dispersées sous la forme micellaire. En milieu renfermant des ions hydrogène, il représente le meilleur moyen (bien plus rapide notamment que la dialyse) de rompre certains équilibres instables et de précipiter les matières en suspension que la centrifugation achèvera de séparer.

« La centrifugation sépare un très beau liquide, parfaitement limpide, de teinte blonde (albumine en solution) et un culot blanchâtre (protéine insoluble) qui

peut être lavé, une ou deux fois, avec de l'eau saturée à froid d'éther, par centrifugation.

« III. La matière floconneuse blanche se rapproche des globulines par ses caractères physiques et ses réactions chimiques; cependant, comme la caséine, elle contient toujours des substances minérales (pour 100 de cendre, nous avons eu 66,68 de CaO et 29,70 de P²O⁵).

« Son faible pouvoir rotatoire $\alpha_D = -31^{\circ} 12'$ en solution aqueuse sodique semble la différencier de la caséine $\alpha_D = -116$ degrés (Lindet et L. Ammann).

« La teneur du lait en cette protéine oscille autour de 2 gr. 3 par litre.

« La lactalbumine est purifiée par précipitation globale ou fractionnée à l'aide d'alcool. Dans le premier cas, on ajoute 1/3 ou 1/2, suivant la concentration, de son volume d'alcool à 96 degrés, laisse déposer au froid, reprend par l'eau distillée et filtre. Dans le second, on ajoute la même proportion d'alcool, mais en quatre à cinq fois et en refroidissant énergiquement dans un mélange de glace et sel avant chaque centrifugation? Les trois premiers précipités isolent en général la lactalbumine à l'état d'une belle matière sirupeuse blonde très semblable à la sérumalbumine purifiée.

La coagulation se produit très nettement entre 67 et 70 degrés, mais se prolonge jusqu'à 76 et 78 degrés.

« Pouvoir rotatoire : $\alpha_D = -41^{\circ} 23'$.

« Rendement par litre de lait : 3,20 en moyenne.

« Les eaux mères alcooliques abandonnées à elles-mêmes laissent lentement déposer des croûtes mame-lonnées, blanches, cristallisées de citrate de chaux contenant 26,6 % de calcium.

« Comme dans le traitement du sérum sanguin, la liqueur acétonique peut être traitée, après récupération de l'acétone, pour le dosage ou la séparation des autres constituants du lait: lactose, acides-aminés, sels, etc.

Nous avons seulement cherché à isoler les lipoides restés en suspension dans le lacto-sérum; par épuisement étheré, sur légère acidité, on en isole environ 0,086 % du lait, contenant 0,980 % de P.

« Conclusion. — De même que pour le sérum sanguin et le blanc d'œuf, la méthode à l'acétone permet, sans sacrifier aucun des éléments du lait, de séparer analytiquement les protéides du lacto-sérum.

« La lactalbumine, troisième exemple d'albumine obtenue pure par une technique sûre, est caractérisée par les propriétés physiques de ses solutions et à l'état solide par son aspect si particulier de matière sirupeuse blonde, se prenant brusquement au froid en une masse solide blanche, pour se ramollir de nouveau à la seule chaleur de la main. »

La critique que l'on peut adresser au travail de M. Piettre est d'avoir utilisé la présure pour précipiter la caséine. Le lacto-sérum obtenu dans ces conditions n'est point comparable au lacto-sérum qui résulterait de la précipitation de la caséine par les acides au point iso-électrique. En effet, dans le premier cas, le lacto-sérum, en dehors de l'albumine et de la globuline normales, contient la protéose soluble séparée de la caséine par son clivage sous l'action du ferment-lab. Au contraire, le lacto-sérum acide ne renferme que de l'albumine et

de la globuline à condition bien entendu que la précipitation acide ait été effectuée exactement au point isoélectrique. Sinon, si l'on dépasse ce point en s'enfonçant dans la zone acide des pH, on redissout globuline et albumine. Si, au contraire, on n'arrive pas à ce point, en restant en-deçà, on ne précipite pas entièrement la caséine.

Comme le taux de la globuline dans le lait de vache normal est extrêmement faible, et qu'en fait, on n'a à opposer à la caséine que l'albumine, la méthode de séparation par l'acétone ne nous permettra guère de séparer nettement l'albumine et la globuline. Mais il n'en est plus de même pour les laits pathologiques, pour les laits de rétention, pour les colostrums dans lesquels les proportions d'albumine et de globuline sont grandes par rapport à celles de la caséine. Il est plus que vraisemblable que l'emploi de la méthode de M. Piettre, avec quelques variantes que l'expérience saurait indiquer, nous donnerait de bons résultats.

CHAPITRE IV

Quelques considérations sur la méthode officielle de l'analyse du lait

La méthode officielle de l'analyse du lait a recours à la précipitation de la caséine par l'alcool en milieu acide. En voici d'ailleurs le libellé emprunté à l'ouvrage de F. Bordas et F. Touplain (7) :

Procédé de centrifugation

« *Lactose*. Réactifs nécessaires. — Alcool à 65° acidifié au 1/1000 par de l'acide acétique. Alcool à 50-55°. Liqueur de Fehling (10 cm³ de liqueur correspondant à 0,050 de glucose ou à 0,06925 de lactose hydraté).

« 1° Placer 25 cm³ d'alcool acidifié dans le tube taré du centrifugeur, mesurer exactement 10 cm³ de lait et

les verser goutte à goutte dans le réactif précédent, en évitant, autant que possible, de remuer le mélange.

« 2° Centrifuger pendant une minute environ: une fois l'appareil arrêté, boucher avec le pouce le tube de verre du centrifugeur et le retourner quatre ou cinq fois sans agitation brusque de manière à rendre le liquide (*lacto-sérum*) homogène); abandonner le tout au repos pendant un quart d'heure environ).

« 3° Centrifuger à nouveau et décanter de suite le liquide clair dans une fiole jaugée de 100 cm³.

« 4° Laver le coagulum attaché au fond du tube *en le délayant avec l'agitateur* dans 25 cm³ d'alcool à 50-55° qu'on ajoute dans le tube.

« 5° Centrifuger, décanter le liquide, comme précédemment, dans la fiole jaugée de 100 cm³ et faire l'affleurement avec de l'eau distillée. (*Si la solution est d'une teinte jaune trop accentuée, par suite de la présence du bichromate, on ajoute 5 à 6 gouttes d'une solution de sous-acétate de plomb, avant de compléter le volume à 100 cm³; on agite et l'on filtre.*)

« 6° Doser le lactose par réduction de la liqueur de Fehling, pour cela, placer 10 cm³ de cette liqueur dans une fiole de 125 cm³ environ, y ajouter 20 cm³ d'eau distillée.

« La solution de lactose étant contenue dans une burette à robinet, en verser à peu près 10 cm³ dans le réactif dilué précédent, porter le mélange à l'ébullition pendant 3 minutes.

« Compléter la réduction de la liqueur de Fehling en ajoutant, par petites portions, la solution sucrée jusqu'à décoloration complète du liquide de la fiole.

« *Beurre et caséine.* Réactifs. — Alcool à 95°. Ether à 65°.

« 1° Délayer à l'aide de l'agitateur le coagulum contenu dans le tube du centrifugeur, dans un mélange de 10 cm³ d'alcool à 95° et de 20 cm³ d'éther.

« 2° Centrifuger et décanter le liquide éthéro-alcoolique dans un petit ballon taré à large goulot.

« 3° Laver l'insoluble contenu dans le tube avec 20 cm³ d'éther, en remuant le mélange avec l'agitateur.

« 4° Centrifuger et décanter de nouveau l'éther dans le ballon qui contient déjà le liquide éthéro-alcoolique précédent.

« 5° Chasser par distillation, l'éther et l'alcool du ballon (le beurre qui reste est desséché à 100°): peser le ballon. La différence de son poids actuel et de son poids primitif donne la quantité de beurre pour 10 cm³ de lait: calculer la proportion par litre.

« 6° Diviser, au moyen de l'agitateur, la masse de caséine contenue dans le tube de verre du centrifugeur et faire la dessiccation d'abord à basse température, puis à 100°. Peser le tube qui contient la caséine et l'agitateur, soustraire du chiffre obtenu la tare du verre, la différence donnera le poids de la caséine et des matières minérales insolubles. La quantité de caséine pure est égale au poids du précédent, diminué du poids des cendres de la caséine obtenue.

« *Remarques.* — Au cours des manipulations précédentes, on se sert d'un agitateur qui a été taré avec le tube de verre du centrifugeur. Il n'est donc pas nécessaire, après chaque opération, d'enlever les précipités

qui y sont adhérents, il suffit qu'il n'y reste pas de liquide attaché après l'opération.

Toutes les décantations doivent être faites rapidement.

« Le centrifugeur, du diamètre de 25 centimètres, mesurés entre les fonds de deux tubes opposés en position de fonctionnement, doit tourner à 2.000 tours au minimum.

« On peut employer des centrifugeurs à vitesse un peu inférieure, mais la durée de centrifugation doit alors être augmentée. »

L'alcool utilisé dans la méthode officielle est un alcool faible, mais qui est en même temps acidifié de façon qu'on obtienne une précipitation complète de la caséine. En fait, ce n'est pas la caséine pure que l'on précipite, mais une caséine chargée de matières protéiques, puisque la méthode officielle indique qu'il faut multiplier le poids trouvé en caséine brut par 0,925, coefficient qui résulte de nombreuses déterminations.

Il serait possible de critiquer la méthode officielle sur de nombreux points, mais nous devons reconnaître que tant qu'elle s'appliquera à des laits de grands mélanges, c'est-à-dire à des laits types dont les variations à l'état normal sont peu étendues, elle donnera toujours des résultats comparables, et permettra de déceler la fraude. Mais il n'en est plus de même si l'on a la prétention d'utiliser cette méthode officielle pour l'analyse des laits individuels, normaux, anormaux ou pathologiques.

Il s'agit là d'espèces vraiment différentes pour l'analyse desquelles les méthodes générales doivent être em-

ployées, et non pas la méthode officielle, de triage rapide, nous le reconnaissons, mais qui n'est pas susceptible de nous conduire à des résultats comparables pour des laits dont les richesses en caséine, en albumine et en globuline peuvent être très différentes.

Dans la recherche de la fraude, on n'a pas toujours affaire à des laits de grands mélanges, et lorsqu'il s'agit de prélèvements faits sur des laits individuels ou de tout petits mélanges, de laits qui peuvent être chargés de tares pathologiques, la méthode officielle peut nous conduire à des résultats contestables.

Les notions nouvelles que nous avons sur le pH nous laissent entrevoir qu'on pourrait en modifier légèrement la technique, en s'inspirant de ces notions pour les précipitations de la caséine, afin de s'assurer aussi exactement que possible de la position du point iso-électrique.

Nous n'entrerons pas dans plus de détails sur cette question sur laquelle des recherches en cours au laboratoire du Professeur Ch. Porcher et qui seront publiées plus tard apporteront quelques précisions intéressantes.

Nous retenons de la méthode officielle, c'est qu'elle précipite non pas la caséine pure, mais une caséine riche en matières salines, peut-être même un caséinate faiblement calcié, malgré l'acidité du milieu. Le facteur 0,925 employé tout à l'heure pour traduire la caséine brute en caséine pure nous montre que la quantité de matières salines représente environ 7,5 %, ce qui est considérable.

Il y aurait lieu de voir si on ne pourrait pas substituer l'acétone à l'alcool, après avoir toutefois séparé au

point iso-électrique sur le lait lui-même la caséine par un acide, acétique ou autre. Dans ce cas, l'acétone ne serait ajouté à la liqueur qu'après la précipitation alors que les flocons de caséine sont encore très épais, et par suite perméables à l'acétone qui s'emparerait facilement ici de la matière grasse.

CHAPITRE V

Recherches personnelles

Sur la précipitation de la caséine dans le lait par l'acétone

Le succès de la méthode de Gerber dans le dosage de la matière grasse dans le lait et des méthodes analogues a suggéré l'idée à plusieurs chercheurs d'obtenir une méthode semblable pour le dosage de la caséine.

La détermination de la graisse dans le lait est d'importance pour les beurreries, mais non moins importantes pour les fromageries est la détermination du taux de la caséine. Et si l'on parvenait à trouver une méthode volumétrique exacte de dosage de la caséine dans le lait, rapide comme l'est la méthode Gerber pour la graisse, et d'une égale sensibilité, ce serait là un grand progrès pour l'industrie laitière. Cependant, nous ferons remarquer que si les variations de la graisse

sont grandes, bien moindres sont celles de la caséine. Néanmoins, la méthode pourrait avoir une grande application pratique.

Au Congrès de Chimie appliquée de 1927, A.-L. Ionescu-Matiu et C.-V. Bordeiano, ont indiqué une méthode de dosage volumétrique des substances protéiques du lait. Voici, d'après les comptes rendus de ce congrès, l'essentiel du travail de ces auteurs :

1° On a trouvé un réactif, le réactif acétono-mercurique — qu'on prépare en dissolvant 5 gr. de HgCl_2 dans 100 cm^3 d'acétone — qui permet la précipitation intégrale des protéines du lait. Le réactif est avantageux parce que les graisses restent en solution dans l'acétone qui surnage le précipité.

2° On a construit une éprouvette spéciale qui permet la mesure exacte du volume du précipité protéo-mercurique, c'est-à-dire de la quantité de protéine pour cent.

3° Des nombreuses déterminations nous ont montré que les résultats obtenus par cette méthode, dans le lait normal, concordent, dans les limites exigées dans la technique, avec ceux obtenus par la méthode Kjeldahl.

4° On a établi que le volume du précipité protéo-mercurique dans le lait dilué varie dans un rapport directement proportionnel avec la dilution, quand celle-ci ne dépasse 40 %, ce qui permet de conclure si un lait est dilué ou non.

5° Si l'on détermine la densité, les graisses et la protéine — par cette méthode — on est en mesure de décider si un lait a souffert la fraude d'écémage ou celle d'écémage et de mouillage en même temps.

Il est évident que ces recherches, si elles se confir-

maient, sont pleines d'un grand intérêt. L'ennui, c'est d'utiliser un réactif comme le chlorure mercurique très toxique, et qui n'est pas propre à être mis dans les mains de personnes inexpérimentées.

La critique que l'on peut adresser à la méthode dont le principe vient d'être donné, ainsi qu'à celles d'ailleurs qui prétendraient doser la caséine par le volume d'un précipité, c'est que justement, il s'agit là d'un précipité, c'est-à-dire d'un ensemble de petits flocons non homogènes, ne se présentant pas toujours dans les mêmes conditions, pouvant se tasser plus ou moins, et donner par conséquent un volume égal pour des quantités pondérales de caséine différentes. Il est certain que les laits, surtout les laits dits paresseux, laits qui coagulent mal par la présure, laits de mammites, laits colostraux, vu leur richesse en globuline, colloïde protecteur, nous donneraient souvent des précipitations caséiniques, sinon incomplètes, du moins très irrégulières, volumétriquement parlant.

Bouin, dans le premier numéro de la Revue « *Le Contrôle Laitier* », a employé la méthode de Denigès pour le dosage volumétrique de la caséine. A lire son travail, on constate cependant qu'il y a des amplitudes assez grandes et que somme toute la méthode n'est pas encore au point.

Nous avons pensé que l'acétone pourrait nous donner des résultats intéressants. En ajoutant au lait des quantités données d'acétone, dans des conditions bien précisées de température et d'agitation, peut-être arriverait-on à provoquer un précipité protéinique dont les flocons fussent toujours semblables à eux-mêmes, ce

qui nous permettrait, pour un même volume, du précipité, de conclure à une même richesse en caséine. Il faut, évidemment, opérer en milieu acide, car si nous n'acidifions pas, le précipité que l'on obtient est fait de caséinate calcique, et même du complexe : caséinate de calcium + phosphates de calcium. Il entraînerait avec lui d'autres matières salines. Il serait donc irrégulier, chimiquement parlant, et en conséquence, on peut dire que les résultats n'en seraient nullement comparables. Mais l'acétone que l'on ajoute au lait peut précipiter aussi l'albumine; nous laissons de côté la globuline, dont le quantum est très faible dans le lait de vache normal.

Nous avons fait quelques expériences que nous exposons maintenant.

Le lait a un pH = 6,74 et une acidité Dornic de 17,5.

50 cm³ de ce lait commencent à précipiter, c'est-à-dire perdent leur homogénéité par l'addition de 14 cm³ d'acétone. Avec 15 cm³, la précipitation s'amorce nettement, mais pour qu'elle soit complète, il faut 35 cm³.

Le pH du sérum acétonique = 6,22.

Des recherches faites d'autre part, dans le laboratoire du Professeur Ch. Porcher, ont montré que pour précipiter complètement la caséine au point isoélectrique d'un lait de grand mélange, il fallait, pour 20 cm³ de lait, 2,4 cm³ de HCl N/2.

Nous allons combiner ces deux données, la première relative à la quantité d'acétone nécessaire pour précipiter les protéines en milieu neutre, la seconde qui con-

cerne nettement la quantité d'acide qu'il faut pour précipiter en l'absence d'acétone la caséine au point isoélectrique.

1° *Centrifugation d'un lait précipité seulement par HCl N/2*: 10 cm³ de lait et 1 cm³ de HCl N/2. On centrifuge dans un tube gradué après précipitation. La caséine se rassemble mal; une partie va au fond mais l'autre va à la surface. Deux essais effectués de la même manière ne présentent pas les mêmes hauteurs de précipité de caséine;

2° *Centrifugation d'un lait précipité seulement par l'acétone*: 10 cm³ de lait sont précipités par 7 cm³ d'acétone. C'est bien la quantité qu'il faut d'après ce qui a été dit un peu plus haut. On centrifuge; la caséine se rassemble mieux que dans l'essai précédent. Toutefois, une petite pellicule reste à la surface du tube de centrifugation;

3° On combine maintenant l'acétone et l'acide chlorhydrique, et on fait les mélanges suivants :

1°	— 0,2 cm ³ de HCl N/2 + 6	cm ³ d'acétone + 10	cm ³ de lait
2°	— 0,4 cm ³	id. 5 cm ³	id. 10 cm ³ id.
3°	— 0,5 cm ³	id. 4 cm ³	id. 10 cm ³ id.
4°	— 0,6 cm ³	id. 3,5 cm ³	id. 10 cm ³ id.
5°	— 0,7 cm ³	id. 3 cm ³	id. 10 cm ³ id.
6°	— 0,8 cm ³	id. 2,5 cm ³	id. 10 cm ³ id.
7°	— 0,9 cm ³	id. 2 cm ³	id. 10 cm ³ id.
8°	— 1,0 cm ³	id. 1,5 cm ³	id. 10 cm ³ id.

Les précipitations les meilleures sont assurées dans les essais 1, 2 et 3.

Etant donné qu'on a affaire à des quantités différentes d'acide, et également d'acétone, la quantité d'acétone diminuant lorsque la quantité d'acide augmente, il est certain *a priori* que les précipités obtenus n'ont pas la même composition chimique.

Deuxième expérience

Sur un lait un peu plus acide de pH = 6,56 et d'acidité Dornic de 18°, on précipite complètement la caséine en ajoutant 7 cm³ d'acétone à 10 cm³ de lait.

Le pH de la liqueur acétonique = 6,06.

On opère les mélanges suivants :

Tableau II

1°	— 10 cm ³ de lait + 7 cm ³ d'acétone	;
2°	— 10 cm ³ id. 7 cm ³ id. + 0,1 cm ³ de HCl N/2	
3°	— 10 cm ³ id. 6 cm ³ id. 0,2 cm ³ id.	
4°	— 10 cm ³ id. 5 cm ³ id. 0,4 cm ³ id.	
5°	— 10 cm ³ id. 4 cm ³ id. 0,5 cm ³ id.	
6°	— 10 cm ³ id. 3 cm ³ id. 0,6 cm ³ id.	
7°	— 10 cm ³ id. 2,5 cm ³ id. 0,8 cm ³ id.	
8°	— 10 cm ³ id. 1,5 cm ³ id. 1,0 cm ³ id.	

Dans des tubes gradués, on centrifuge.

C'est la centrifugation des échantillons 5 et 6 qui donnent les meilleurs résultats, mais il y a toujours un peu de caséine surnageant à la surface du liquide, qui lui, est très clair.

Voici les pH des liquides acétoniques :

Tableau III

1°	6,06
2°	5,93
3°	5,63
4°	5,40
5°	5,20
6°	4,95
7°	4,90
8°	4,85

On renouvelé l'essai 6° en ajoutant de l'ammoniaque dans le lait : 10 cm³ de lait, V gouttes d'ammoniaque, 4,8 cm³ de HCl N/2, et on centrifuge.

La précipitation n'est pas complète. On recommence l'essai et on examine la partie surnageante, car il reste toujours par centrifugation une pellicule à la surface du liquide, faite de caséine et de matière grasse.

Après des tâtonnements, il semble que la précipitation et la centrifugation les meilleures sont obtenues pour 10 cm³ de lait avec 5 cm³ d'acétone et 0,65 cm³ de HCl N/2.

En somme, ces essais ne sont pas encourageants parce qu'ils sont essentiellement irréguliers.

Jusqu'ici, il n'a pas été question de séparer l'albumine et la globuline, et on peut se demander si l'acétone, en l'absence de tout acide, précipite totalement ou non toutes les protéines du lait, c'est-à-dire l'albumine en même temps que la globuline.

Des dosages d'azote sont, ici, nécessaires.

Nous avons donc repris les essais précédents dans lesquels nous avons combiné l'emploi de l'acétone et de l'acide en dosant cette fois l'azote dans le sérum de centrifugation.

Nous avons d'abord comparé les résultats des deux essais extrêmes : le premier dans lequel on n'emploie que l'acide, c'est-à-dire celui où l'on précipite la caséine au point isoélectrique, le second dans lequel on n'emploie que l'acétone sans acide, et nous avons comparé les résultats obtenus avec ceux que nous donne la combinaison de l'emploi de l'acétone et de l'acide.

20 cm³ de lait sont additionnés de 2,4 cm³ d'acide chlorhydrique N/2. pH = 4,7; on est donc au point isoélectrique.

2°. — 20 cm³ de lait sont additionnés de 14 cm³ d'acétone.

3°. — A 20 cm³ de lait, on ajoute 10 cm³ d'acétone et 1,2 cm³ de HCl N/2.

Le lait employé dans ces trois essais avait un pH = 6,92 et une acidité Dornic de 18°.

On centrifuge pendant un quart d'heure, après quoi les trois tubes sont examinés.

Les essais 2 et 3 présentent des sérums très clairs, et le précipité est bien tassé au fond du tube. L'essai 1 présente des particules de caséine en suspension et le sérum est un peu trouble. On le filtre sur papier pour le clarifier.

Un dosage d'azote est effectué sur chacun des sérums, 1, 2 et 3. Après décantation, nous les évaporons au B. M., et sur le résidu, nous faisons un Kjeldhal.

Un dosage d'azote est effectué également sur le lait témoin.

Résultats :

Lait témoin : 4,60 grammes pour 1.000 d'azote, ce qui fait avec le facteur 6,39 : 29,40 de caséine.

Azote des sérums :

1°. — Précipitation par HCl seul : 31,3 milligrammes d'azote pour 1.000, ce qui fait 0,20 grammes de protéine chiffre faible.

2°. — Précipitation par l'acétone seul : 19,26 milligrammes pour 1.000 d'azote, soit 0 gr. 123 de protéine au litre.

3°. — Précipitation mixte par l'acétone et l'acide : 19 milligrammes pour 1.000 d'azote, soit 0.121 grammes de protéine au litre.

D'après ces premiers résultats, il semble que la précipitation par l'acétone seul ou l'acétone et l'acide combinés donne un sérum dont la richesse en azote est la même dans les deux cas.

Nous avons comparé maintenant le dosage officiel de la caséine tel qu'il a été donné plus haut par l'acide acétique, et celui avec lequel on recourt à l'acétone acétique.

1°. — Alcool acétique : A 25 cm³ de réactif, on verse goutte à goutte le lait mesuré, puis on centrifuge.

2°. — Acétone acétique : On prend l'acétone ordinaire renfermant 1 pour 1.000 d'acide acétique. 10 cm³ sont placés dans un tube à centrifugation, et on ajoute goutte à goutte 10 cm³ de lait. On centrifuge.

Sur chacun des sérums surnageant après la centrifugation, nous prenons le pH et les degrés Dornic, puis nous dosons l'azote, ainsi que sur le coagulum restant.

Voici les résultats obtenus :

Lait témoin	6,92	18°
Sérum du lait traité par l'acétone acétique	5,80	21°
Sérum du lait traité à l'alcool acétique	5,39	22°

Les dosages d'azote nous donnent :

Lait témoin	4,515 grammes
Alcool acétique :	
a) Sérum	0,70 grammes
b) Coagulum	3,80 grammes
	<hr/>
	4,50 grammes
Acétone acétique :	
a) Sérum	0,03 grammes
b) Coagulum	4,55 grammes
	<hr/>
	4,50 grammes

Nous voyons que l'acétone acétique précipite presque en totalité des matières protéiques.

Il serait intéressant de reprendre ces essais et de les multiplier avant de conclure.

Conclusions

I. — L'acétone est un solvant qui mérite d'être utilisé dans l'analyse biologique du lait.

II. — Une méthode qui viserait à doser volumétriquement la caséine dans le lait par précipitation de celle-ci avec l'acétone seul ou l'acétone acide ne nous paraît pas recommandable jusqu'ici.

III. — Alors que l'alcool acétique ne précipite que la caséine dans le lait et laisse dans le sérum l'albumine, l'acétone acétique précipite presque la totalité des protéines du lait.

Vu : Le Directeur
de l'Ecole Vétérinaire de Lyon
Ch. PORCHER.

Le Professeur
de l'Ecole Vétérinaire,
Ch. PORCHER.

Vu : *Le Doyen*,
J. LÉPINE.

Le Président de la Thèse,
Dr Albert MOREL.

Vu et permis d'imprimer :
Lyon, le 21 Février 1929.

Le Recteur, Président du Conseil de l'Université.
J. GHEUSI.

Bibliographie

- (1) Ch. PORCHER. — Sur le sucre du lait de bufflesse. *Bull. Soc. Chim. de Paris*, 1903, (3), 29, 828.
 - (2) A. FOURNIER. — Les matières grasses du sang. Méthodes de dosage. *Thèse Doct. Méd.*, Paris, 1914.
 - (3) M. PIETTRE et A. VILA. — *C. R. Ac. Sc.*, 1920, 170, 1466.
 - (4) M. PIETTRE et A. VILA. — *C. R. Ac. Sc.*, 1924, 178, 91.
 - (5) Pourquoi le lait de femme ne coagule pas par la pression. Publié dans les *Leçons du jeudi*, 1927-1928.
 - (6) M. PIETTRE. — Sur les protéides du lacto-sérum. Leur séparation par la méthode à l'acétone. *C. R. Ac. Sc.*, 1924, 178, 333.
 - (7) F. BORDAS et F. TOUPLAIN. — Laiterie, dans la collection des *Manuels pratiques d'analyses chimiques* publiés sous la direction de M. F. Bordas et M. E. Roux, à l'usage des laboratoires officiels et des experts.
-

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS	9
CHAPITRE PREMIER. — Généralités	13
CHAPITRE II. — Séparation des protéines du sang par l'acétone	21
CHAPITRE III. — Séparation des protéines du lacto-sérum	27
CHAPITRE IV. — Quelques considérations sur la méthode officielle de l'analyse du lait	33
CHAPITRE V. — Recherches personnelles	39
CONCLUSIONS	49
BIBLIOGRAPHIE	51