

L'EMPLOI DE L'EAU OXYGÉNÉE DANS LE LAIT ET LES PRODUITS LAITIERS

H. LÜCK, D.Sc. *

Introduction

Depuis quelques années, de nombreux pays tropicaux et subtropicaux s'efforcent de développer leur industrie laitière. Or, dans ces régions, la manipulation du lait frais est particulièrement délicate en raison de la faible durée de stabilité du produit aux températures ambiantes. En outre, il faut souvent transporter sur de longues distances un lait dont la numération bactérienne initiale est généralement très élevée, par suite du manque d'hygiène dans la production. Des efforts ont donc été déployés pour améliorer non seulement l'hygiène de la production laitière, mais aussi les qualités de conservation du lait grâce au refroidissement artificiel à la ferme et pendant le transport, à la pasteurisation double ou multiple et à l'adjonction d'agents de préservation. Sans aucun doute, le refroidissement à la ferme et pendant le transport est la méthode idéale, mais son coût en interdit actuellement l'emploi dans de nombreux pays tropicaux en voie de développement; quant à la pasteurisation double ou multiple, elle n'est praticable que si l'on dispose d'un réseau de dépôts. C'est pourquoi certains pays ont essayé de recourir à l'emploi de préservateurs.

Considérations générales sur l'adjonction au lait de préservateurs

On peut définir le préservateur laitier comme un composé chimique (ou un traitement) qui, appliqué au lait, retarde les altérations dues à la croissance des micro-organismes, ou met les propriétés physiques, la composition chimique et la valeur nutritive initiale à l'abri de la détérioration microbienne. Il semble que les produits tels que les stabilisants, ajoutés au lait pour éviter des modifications physiques, ne doivent pas être compris dans cette définition.

L'emploi de préservateurs dans le lait et les produits laitiers a été abondamment débattu. L'attitude générale adoptée dans la plupart des pays lui est défavorable pour deux raisons: en premier lieu parce que la conservation

* Institut allemand de Recherches en Chimie alimentaire, Munich, Allemagne.

du lait et des produits laitiers doit être obtenue par l'amélioration de la production et des méthodes de traitement plutôt que par l'adjonction de préservateurs; en second lieu, parce que le lait et les produits laitiers sont des denrées alimentaires de base et, à ce titre, doivent être exempts de tels agents. Par ailleurs, certains estiment que sous diverses réserves, l'utilisation de ces produits doit être autorisée dans les pays dont l'industrie laitière n'est ni développée ni bien organisée, notamment dans les pays chauds. Tout pays qui adopte cette méthode doit s'assurer qu'elle ne risque pas de nuire à la production de lait propre; les progrès réels et permanents d'une industrie laitière ne sont en effet possibles que grâce à une production et à des procédés de fabrication hygiéniques. Il convient de limiter l'emploi des préservateurs aux cas d'urgence et de ne le considérer que comme un moyen temporaire propre à venir en aide aux fermiers et à l'industrie laitière des pays chauds en attendant que soient réalisées économiquement les améliorations nécessaires des conditions de production (par exemple refroidissement à la ferme et pendant le transport). Tout emploi de préservateurs doit être contrôlé pour prévenir les abus. Diverses méthodes de traitement du lait, faisant appel à différents produits ou procédés de conservation, ont été mis en application non seulement dans les pays où l'industrie laitière est relativement peu développée, mais aussi par certaines entreprises commerciales, dans certains pays très avancés.

Pour être satisfaisant, un préservateur laitier doit satisfaire aux conditions suivantes: 1) ne réagir avec aucun des constituants du lait; 2) être facile à éliminer à la laiterie centrale avant la livraison du lait à la consommation ou à l'industrie (par exemple à une fromagerie); 3) ne laisser dans le lait, après élimination, que des substances inoffensives, inodores et insipides; 4) n'exiger qu'un traitement simple et peu coûteux.

Aucun des préservateurs connus ne satisfait à toutes ces conditions. Différents produits chimiques ont été à un moment ou un autre utilisés ou recommandés officiellement ou officieusement dans divers pays: antibiotiques (pénicilline, auréomycine, streptomycine), composés d'ammonium quaternaire, chloropicrine (microlysine), ménadione, bromure d'acétyle, acide mercaptopropionique et ses composés, formaldéhyde, extraits végétaux, peroxydes et oxygène sous pression. Très peu ont donné des résultats satisfaisants. La plupart impliquent un risque pour la santé du consommateur, et les services de santé publique réprouvent leur emploi comme additifs. Le problème que posent les antibiotiques tient au fait qu'une seule substance — par exemple la pénicilline, qui est détruite par la pénicillase — n'est pas assez efficace, et que si l'on emploie une association de plusieurs antibiotiques, l'élimination finale des résidus devient très difficile. La conservation de grandes quantités de lait par l'oxygène sous pression est coûteuse et très difficile à l'échelon commercial.

Les principes généraux de la conservation alimentaire, qui sont valables pour le lait et les produits laitiers, ont été résumés dans les rapports du Comité

mixte FAO/OMS d'experts des Additifs alimentaires (Organisation Mondiale de la Santé, 1957, 1962).

Considérations générales sur l'emploi de l'eau oxygénée

En industrie laitière, les objections à l'emploi de l'eau oxygénée ou peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) sont celles que soulèvent tous les agents de préservation décrits (voir ci-dessus). Mais c'est, à l'heure actuelle, le plus acceptable des produits disponibles. Il est facile à détruire, rapidement et complètement, par la catalase; après ce traitement enzymatique, les produits de décomposition (eau et oxygène) sont normalement indécélabes et inoffensifs.

C'est un agent oxydant fort, décolorant et germicide, dont l'effet est dû à sa décomposition en eau et oxygène. Dans les solutions diluées, l'effet oxydant est atténué. Aux concentrations utilisées dans l'industrie laitière, l'influence du produit sur les constituants du lait, surtout sur les protéines naturelles est très faible. Généralement, l'effet exercé sur le lait croît avec la température et la durée de contact. Les solutions concentrées doivent être diluées avant d'être ajoutées au lait.

Les propriétés germicides de H₂O₂ sont connues depuis la découverte de ce composé par le Français Thénard, en 1818. Les premiers essais de conservation du lait par l'eau oxygénée remontent à la fin du XIX^e siècle et au début du XX^e (Schrodt, 1883; Heidenheim, 1890; Low, 1900; Jablin-Gonnet, 1901; Renard, 1904; Nicolle & Duclaux, 1904; Budde, 1904; Much & Römer, 1906). La quantité d'eau oxygénée nécessaire pour inhiber sensiblement la prolifération bactérienne est faible et n'entraîne pas de dilution appréciable du lait. La majeure partie de l'eau oxygénée est décomposée par la catalase des micro-organismes et des leucocytes du lait; le traitement thermique peut également en détruire une certaine quantité.

L'un des inconvénients de l'eau oxygénée dans les pays tropicaux est son instabilité qu'accélère la contamination. On sait aujourd'hui fabriquer de l'eau oxygénée très pure, mais la présence de 1 p.p.m. de fer ou de 0,05 p.p.m. de cuivre provoque une décomposition rapide du produit. La stabilité diminue quand le pH augmente (la décomposition devient rapide à pH 10). On peut l'augmenter en ajoutant de faibles quantités de stabilisants organiques ou minéraux. Les solutions d'eau oxygénée utilisées en laiterie doivent être de qualité pour analyse et exemptes d'impuretés métalliques ou autres.

Le peroxyde d'hydrogène trouve en industrie laitière un emploi intéressant dans deux cas: en premier lieu, pour un *traitement de courte durée* remplaçant la pasteurisation et destiné à réduire la numération bactérienne totale; en second lieu, comme agent de préservation pour améliorer la conservabilité du lait. Dans le premier cas, H₂O₂ ne subsiste dans le lait qu'un temps assez bref (jusqu'à 1 heure); dans le second, le contact est beaucoup plus long (plusieurs heures ou jours), d'où une intensification des réactions avec les constituants du lait. Dans les cas où H₂O₂ est utilisée simultanément à ces deux fins,

il faut s'efforcer de remplacer au plus tôt le traitement au peroxyde par des méthodes améliorées de production laitière, de transport et de traitement.

L'eau oxygénée a déjà été utilisée en association avec d'autres produits, par exemple en solution à 0,2 % avec 0,025 % de *p*-hydroxybenzoate de propyle ou 0,05 % d'ester éthylique (Ferrara et al., 1957). Ces deux esters utilisés séparément ou mélangés, prolongent l'effet conservateur de l'eau oxygénée, mais leur élimination ultérieure est pratiquement impossible.

De vastes recherches ont été poursuivies sur tous ces aspects dans plusieurs pays. Lück (1956a), a passé en revue la littérature à ce sujet. La question de l'addition d'eau oxygénée au lait a également été discutée lors d'une réunion internationale d'experts convoquée à Interlaken en 1957 par l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture. Dans le rapport de cette réunion¹ sont soulignés les points suivants concernant les aspects pratiques de l'emploi de l'eau oxygénée comme agent de préservation du lait:

«a) L'emploi de H₂O₂ ne doit être autorisé que: 1) si les organismes officiels sont en mesure d'assurer un contrôle efficace de cet emploi; 2) si l'on peut se procurer de l'eau oxygénée de qualité approuvée et contrôlée, et assurer sa distribution exclusivement par des organismes agréés; 3) si l'on peut vérifier, avant sa distribution, que le lait destiné à être consommé liquide ne renferme aucun résidu d'agent de préservation.

«b) Sous réserve que les contrôles indispensables puissent être institués, les conditions locales dans lesquelles l'emploi de l'eau oxygénée pourrait être autorisé sont les suivantes: 1) en cas d'urgence (par exemple, par suite de la panne d'une installation de réfrigération); 2) dans un pays peu développé où la production et le ramassage du lait ne sont pas encore bien organisés; 3) dans un pays chaud où le lait provient d'exploitations dispersées, dont la production unitaire est généralement faible, et doit être groupé et transporté sur de grandes distances avant de parvenir à un centre de pasteurisation ou de refroidissement; 4) dans un pays chaud où les routes et les conditions de transport ne permettent pas de faire parvenir rapidement le lait dans les centres de consommation (dans certains pays chauds ce délai-limite peut être inférieur à 4 heures); 5) dans un pays chaud dépourvu d'installations de réfrigération, et où la température est si élevée à certaines saisons, qu'elle provoque une multiplication intense des bactéries et l'altération très rapide du lait.»

Des essais de distribution de lait par H₂O₂ ont été effectués dans certains pays — notamment en Italie, en France, en Espagne et au Nigéria — et dans certaines zones du sud-ouest africain et de l'Amérique du Sud.

¹ Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (1957). Rapport de la Réunion d'experts sur l'emploi de l'eau oxygénée et autres agents de préservation du lait. *Interlaken, Suisse, 23-27 septembre 1957*, Rome (document ronéographié non publié FAO/58/5/3510).

Emploi d'autres peroxydes

Outre l'eau oxygénée, d'autres peroxydes — en particulier des produits solides — ont été essayés pour la préservation du lait. Ceux-ci sont en effet plus faciles à manipuler que les préservateurs liquides, notamment que les solutions concentrées de H₂O₂. Les peroxydes de calcium et de magnésium (CaO₂, MgO₂) qui n'ont qu'un intérêt historique (procédés «Kalkodat» et «Magnodat», Mayerhofer & Přibram, 1910) ne semblent pas convenir au traitement du lait, même dans des circonstances exceptionnelles, car ils donnent un goût désagréable, accroissent la durée du test de réduction et diminuent l'acidité (Csiszar, 1944).

Plusieurs sels inorganiques formant des peroxydrates ont semblé dignes d'intérêt, mais pour des raisons analogues à celles qui ont été avancées contre CaO₂, l'emploi courant du peroxydrate de carbonate de sodium ne peut pas être préconisé (Csiszar, Tomka & Bittera, 1949). Rudy (1944) a utilisé des peroxydrates de phosphates alcalins pour prévenir les contaminations microbiennes du fromage fondu.

L'eau oxygénée forme aussi avec les amines organiques et leurs dérivés des composés solides qui ont très dissociés en solution aqueuse. Comme agent de préservation du lait, l'urée-eau oxygénée [CO(NH₂)₂.H₂O₂], qui contient 64 % d'urée et 36 % de H₂O₂, est très efficace (Dahlen & Crossley, 1945; Banerjee, 1947). Mais l'addition d'urée au lait peut soulever des objections du point de vue de l'hygiène. En effet, si par exemple on fabrique de la poudre de lait écrémé à partir de lait préservé au moyen d'eau oxygénée et d'urée, la teneur en urée de 100 g de poudre est d'environ 0,2-1,4 g. L'urée n'est pas très toxique, mais son emploi comme additif alimentaire à une telle concentration serait fâcheux.

Aucun emploi de peroxyde autre que celui d'hydrogène (et uniquement dans les limites indiquées ci-dessus) ne doit donc être envisagé pour le traitement préservateur du lait destiné à la consommation humaine.

Effets de l'eau oxygénée sur les constituants du lait*Goût*

Le lait traité par l'eau oxygénée aux concentrations habituelles ne garde aucun goût indésirable lorsque la décomposition de ce préservateur a été totale. Mais tant que la présence de H₂O₂ est décelable par réaction chimique, le lait conserve un goût désagréable. L'utilisation de 0,05 % p/p, ou plus, de H₂O₂ pour conserver un lait de population bactérienne excessive peut donner à ce produit un goût defectueux. Le lait qui contient une quantité appréciable de peroxyde non décomposé peut aussi, selon le matériau de conditionnement, prendre un goût oxydé après stockage prolongé (Nambudripad, Laxminarayana & Iya, 1952).

En revanche, le traitement du lait par l'eau oxygénée peut empêcher l'apparition de l'odeur typique induite par activation solaire dans les échan-

tillons de lait homogénéisé (Weinstein & Trout, 1951) et retarder celle du goût «oxydé» (Bell & Mucha, 1949; Morris, 1950) et celle du goût de suif (Krukovsky & Guthrie, 1946) pendant le stockage à froid, probablement par réaction chimique. Après traitement par l'eau oxygénée, le lait qui est traité par la chaleur n'a pas de goût indésirable même à la suite d'un stockage prolongé.

Vitamines

Les vitamines du lait sont très peu altérées par un traitement normal à l'eau oxygénée. Seul l'acide ascorbique est sérieusement touché, ce qui n'est pas grave, car le lait n'est pas une source importante de cette vitamine. Après addition de 0,04 % p/p de H_2O_2 , les pertes en acide ascorbique d'un lait conservé 20 heures à 15°, 22°, 26° et 32°C se sont élevées à 54 %, 78 %, 85 % et 92,5 % respectivement, contre 84 % dans les échantillons témoins (Satta et al., 1943). A des concentrations de H_2O_2 supérieures et à une température plus élevée, la destruction augmente. D'autres auteurs ont confirmé l'instabilité de la vitamine C dans le lait additionné de peroxyde (Bisogni & Calendoli, 1943; Banerjee, 1947; Krukovsky, 1949).

Nambudripad et al. (1952) n'ont observé aucune altération des vitamines du complexe B dans le lait traité par des peroxydes. La teneur en thiamine, riboflavine, nicotinamide et cobalamine était sensiblement la même dans un lait traité par H_2O_2 et pasteurisé (0,03 % p/p de H_2O_2 puis pasteurisation à 63°C pendant 1-2 heures) que dans un lait témoin uniquement pasteurisé. Lück & Schillinger (1958a) ont constaté que la vitamine B_1 est partiellement détruite alors que la B_2 est tout à fait stable, même dans des conditions très sévères (voir tableau 1).

TABLEAU 1
EFFETS DU TRAITEMENT PAR H_2O_2 SUR LA TENEUR DU LAIT
EN VITAMINES B_1 ET B_2 *

Traitement	Vitamine B_1 ($\mu g/100$ ml)	Vitamine B_2 ($\mu g/100$ ml)
Lait non traité	49	158
Lait + 0,075% p/p de H_2O_2 , 21 heures à 20°C	47	158
Lait + 0,30% p/p de H_2O_2 , 23 heures à 20°C	22	160

* D'après Lück & Schillinger (1958a).

Janiček & Pokorny (1958) ont montré qu'une concentration de 0,25 % en peroxyde détruit 20 % à 25 % de la riboflavine. Une destruction analogue de thiamine a été constatée après chauffage du lait à 60°-65°C pendant 5 minutes.

Après avoir additionné le lait de 0,04 % p/p de H_2O_2 , la teneur en vitamine A a diminué de 22-42 % (Giolitti, 1949). Satta et al. (1943) ont montré

que l'adjonction de 0,12 % p/p de H₂O₂ et le maintien du lait à 20°C ou à 32°C pendant 36 heures réduisait la teneur en vitamine A de 158 à 125 unités internationales (U.I.) par 100 g. Les valeurs correspondantes pour les échantillons témoins conservés sans H₂O₂ étaient de 130 à 135 U.I. La teneur en thiamine est tombée de 25-30 U.I. à 12-15 U.I. dans le même échantillon traité et dans les témoins à 15-18 U.I. par 100 g. Dans des études biologiques de la vitamine D sur des rats, aucune modification appréciable n'a été observée en expérimentant avec du lait additionné de H₂O₂ jusqu'à 0,16 % p/p et maintenu à 22°C pendant 36 heures.

D'autres essais ont montré (voir tableaux 2 et 3) que les vitamines liposolubles sont très stables, sans doute parce qu'elles sont protégées par les globules gras. Même à la concentration de 0,3 % p/p, H₂O₂ ne détruit pas le β -carotène, ni les vitamines A et E (Lück & Schillinger, 1958a). Mais les vitamines liposolubles ajoutées au lait sont plus sensibles à ce traitement.

TABLEAU 2
EFFETS DU TRAITEMENT PAR H₂O₂ SUR LA TENEUR DU LAIT
EN CERTAINES VITAMINES LIPOSOLUBLES *

Traitement	β -Carotène (μ g/100 ml)	Vitamine A (μ g/100 ml)	Vitamine E (μ g/100 ml)
Lait non traité	22,8	37	110 **
Lait + 0,075% p/p de H ₂ O ₂ , 30 minutes à 51°C	22,1	38	—
Lait + 0,30 p/p de H ₂ O ₂ , 24 heures à 30°C	22,5	37	112 **
Lait vitaminisé, non traité	42,0	302	404 ***
Lait vitaminisé + 0,30% p/p de H ₂ O ₂ , 24 heures à 30°C	40,2	285	200 ***

* D'après Lück & Schillinger.

** Tocophérols totaux.

*** Tocophérols totaux + DL- α -tocophérol.

TABLEAU 3
EFFETS D'UN COURT TRAITEMENT PAR H₂O₂* SUR LA TENEUR DU LAIT
EN CERTAINES VITAMINES HYDROSOLUBLES **

Vitamine	mg/100 ml		Pertes (%)
	Avant traitement	Après traitement	
B ₁	0,055	0,054	0
B ₂ : déterminée chimiquement	0,220	0,224	0
déterminée microbiologiquement	0,197	0,181	8
B ₆	0,023	0,023	0
C: acide ascorbique	1,57	0,10	94
acide ascorbique + acide déhydroascorbique	1,73	0,14	92

* 0,07% p/p de H₂O₂, 30 minutes à 51°C.

** D'après Lück & Schillinger (1958b).

Sucre de lait et matières grasses du lait

Giolitti (1949) n'a observé aucune modification de la teneur en lactose, en matières grasses et en azote total, ni du pH, après addition de 0,04 % p/p de H_2O_2 au lait. D'après d'autres chercheurs, la teneur en lactose du lait traité serait un peu plus faible que celle des échantillons témoins (Banerjee, 1947). Ces résultats ont été confirmés par Arnaudi & Treccani (1953). La teneur en sucre du lait non traité était de 5,01 %, mais après traitement par 0,01 %, 0,02 %, 0,04 % et 0,08 % p/p de H_2O_2 à 30°C pendant 16 heures, elle était respectivement de 5,01 %, 4,95 %, 4,95 % et 4,60 %.

Les acides gras insaturés supérieurs ne réagissent pas, en pratique, avec l'eau oxygénée. Même dans des conditions relativement sévères de traitement (0,3 % de p/p de H_2O_2 , 51°C pendant 24 heures), le spectre d'absorption des matières grasses dans l'u.v. n'est pas sensiblement modifié (Lück & Schillinger, 1958a). La qualité d'un beurre fabriqué avec du lait préservé par 0,03 % p/p de H_2O_2 ne diffère pas de façon appréciable de celle d'un beurre de lait frais (Nambudripad et al., 1952; Negretti, 1952).

Caséine

L'eau oxygénée à concentration élevée oxyde les protéines et les aldéhydes en cétones et en acides. Les solutions diluées n'ont pas cet effet. Les résultats expérimentaux de la fabrication de fromage à partir de lait traité par H_2O_2 , laissent prévoir des modifications de la molécule de caséine. Généralement, l'eau oxygénée ramollit le caillé. Arnaudi, Cartasegna & Passani (1949), qui ont étudié l'influence du traitement par H_2O_2 sur la coagulation du lait par la présure, ont trouvé que l'addition de H_2O_2 dans des proportions allant jusqu'à 0,04 % p/p améliore le caillé; mais que l'addition de 0,08 % p/p ou plus en diminue la fermeté. Le temps de coagulation en présence de présure est augmenté (Lück & Joubert, 1955b).

Par comparaison avec des échantillons témoins, la taille des particules de caséine du lait ne présente, au microscope électronique, aucune altération significative. Le titre alcoolique est légèrement plus faible; c'est donc que la stabilité est réduite et que la concentration en alcool nécessaire à la coagulation du lait traité est un peu moindre que pour le même lait non traité (Lück & Joubert, 1955b). Le traitement par l'eau oxygénée (à 0,1 %-0,4 % p/p) de solutions pures de caséine accroît la proportion de l'azote non précipité par l'acide trichloracétique et réduit la viscosité des solutions (Lück, 1956b). Cela explique peut-être pourquoi le traitement du lait par H_2O_2 (à 0,04 % p/p) accroît la teneur en albumine et diminue la teneur en caséine (Giolitti, 1949). Des essais par ultracentrifugation ont montré qu'une partie de la caséine est dissociée après 5 à 6 jours de préservation par 0,1 % ou 0,4 % p/p de H_2O_2 , à 4°C. La constante de sédimentation de celui des composants qui sédimente le plus vite est diminuée; mais l'électrophorèse ne révèle pas de différence entre la caséine du lait traité et celle du lait témoin (Lück & Joubert, 1955a, b).

La réaction décrite ci-dessus pourrait expliquer pourquoi la coagulation par la présure est retardée dans le lait traité (comme dans une solution pure de caséinate de sodium après addition de CaCl₂). Les effets de H₂O₂ sur la caséine ne sont pas aussi importants qu'ils peuvent le paraître puisque le lait non traité, lorsqu'il est conservé longtemps à faible température, subit des altérations analogues.

Protéines du lactosérum

La β -lactoglobuline du lait accuse des altérations analogues à celles de la caséine. La conservation pendant sept jours à 4°C du lait écrémé additionné de 0,4 % p/p de H₂O₂ dissocie complètement la β -lactoglobuline en un composé de poids moléculaire moindre. A concentration inférieure, l'effet est moins net. Les solutions de β -lactoglobuline pure cristallisée semblent plus résistantes à l'eau oxygénée diluée que la β -lactoglobuline naturelle du lait (Lück & Joubert, 1955c). Les immunoglobulines sont beaucoup moins sensibles que la β -lactoglobuline.

Acides aminés

Certains amino-acides sont très sensibles à H₂O₂, en particulier la cystéine, la cystine et la méthionine. La tyrosine et le tryptophane sont eux aussi facilement oxydés. Heureusement, les groupes -SH des protéines du lait non dénaturées résistent assez bien aux agents oxydants. L'addition de H₂O₂ à 0,03 % p/p, seule ou avec 8×10^{-5} % de Cu, n'a aucun effet sur les groupes -SH dans le lait écrémé conservé pendant 20 heures à la température du laboratoire (Zweig & Block, 1953). Même l'addition de 0,1 % p/p de H₂O₂ et la conservation à 30°C pendant un jour ou à 55°C pendant 30 minutes ne réduisent pas d'une façon appréciable la teneur en -SH (Lück & Joubert, 1955a; Lück & Schillinger, 1958b); il faut pour y parvenir un traitement par une concentration en peroxyde supérieure ou à une température plus élevée, pendant plus longtemps. En présence d'ions métalliques (Cu) ou de peroxydases, l'effet de l'oxydation est accéléré par catalyse. Heureusement, la peroxydase du lait est rapidement détruite par H₂O₂.

Enzymes

La conservation du lait par H₂O₂ influe dans une certaine mesure sur les enzymes de ce produit. L'épreuve de la phosphatase qui permet de distinguer le lait frais du lait thermo-traité est applicable au lait additionné de peroxyde. On a trouvé que l'addition de 0,08 % à 0,12 % p/p d'eau oxygénée à la température de congélation et à 20°-30°C, n'affecte pas l'amylase, la lipase, la tryptase ni la phosphatase, mais détruit presque complètement la peroxydase, la catalase et la réductase (Cimino, 1945). La phosphatase est sérieusement inhibée lorsqu'on conserve longtemps (10 à 20 jours) du lait traité par l'eau oxygénée (Sanders & Sager, 1949).

L'eau oxygénée à 0,06% p/p peut détruire toute la peroxydase du lait, alors qu'à dose plus faible le peroxyde disparaît et laisse subsister une certaine quantité de peroxydase (Banerjee, 1947). La destruction de la catalase, accélérée par une élévation de la température, s'accompagne d'une décomposition de l'eau oxygénée (Lück & Schillinger, 1958b). Heureusement, la catalase et la peroxydase sont détruites. Si la peroxydase subsistait, le danger d'oxydation des acides aminés et des protéines serait beaucoup plus grand; en revanche, s'il restait de la catalase, tout le préservateur serait rapidement décomposé et l'effet protecteur considérablement réduit.

Valeur nutritive

L'évaluation biologique des protéines, l'analyse approximative et l'étude des vitamines ne révèlent guère de changements de la composition ou de la valeur nutritive soit du lait traité par 0,1, 0,2 ou 0,5% de H₂O₂, soit du sérum ou des fromages qu'on en tire (Teply, Derse & Price, 1958). Il faut reconnaître que H₂O₂ détruit une proportion importante de la vitamine C, mais les incidences de cette destruction sont faibles car le lait n'est pas une source importante d'acide ascorbique pour l'homme. La digestion tryptique de la caséine prétraitée par l'eau oxygénée est accrue (Muset, Calvet & Valls, 1954; Lück, 1956b).

Effets du traitement par H₂O₂ sur les bactéries

Cultures pures

Il est notoire que l'eau oxygénée est un bactéricide et un bactériostatique efficace, bien que le mécanisme de son action n'ait pas encore été parfaitement élucidé. On attribuait autrefois son efficacité à l'oxygène naissant, mais on a reconnu depuis lors que c'est H₂O₂ non décomposée qui agit. Le pouvoir bactéricide varie selon les micro-organismes, la numération bactérienne, la concentration en H₂O₂, la durée d'action et la température du traitement. Le taux de réduction bactérienne par H₂O₂ dépend donc de la qualité primitive du lait, c'est-à-dire de la numération bactérienne initiale (Nambudripad et al., 1952). L'effet germicide de H₂O₂ sur les solutions exemptes de protéines est plus prononcé que sur les liquides qui contiennent des protéines, comme le lait.

Molland (1947) a observé que certaines souches aérobies (environ 10¹⁰ germes/ml) peuvent se développer dans un bouillon contenant 0,0125% de H₂O₂, après incubation à 37°C. Même les bactéries qui ne produisent que très peu ou pas de catalase, comme le pneumocoque, le streptocoque, *Salmonella typhosa*, *Bacillus anthracis* et *Erysipelothrix rhusiopathiae*, se développent dans un milieu contenant 0,0125% de H₂O₂. Les concentrations en H₂O₂ tolérées par différentes souches de bactéries sont les suivantes: *Proteus* spp.: 0,2%; *Bacterium coli*: 0,05-0,1%; *Staphylococcus aureus*, souche 1: 0,0125%-0,025%; souche 2: 0,1-0,2%; *Brucella abortus*: 0,4%;

Streptococcus agalactiae: 0,4%; *Str. zymogenes*, 0,0125%; *Neisseria catarhalis*, 0,0125-0,025%.

Nambudripad & Iya (1951), Nambudripad, Laxminarayana & Iya (1949) ont étudié le pouvoir bactéricide de H₂O₂ contre des micro-organismes isolés du lait. En général, les bactéries Gram négatives (coliformes) sont plus sensibles que les espèces Gram positives (sporulantes). La sensibilité des bactéries lactiques se situe entre les deux. Le tableau 4 indique le temps nécessaire pour détruire à 100% certains micro-organismes importants du point de vue laitier. Des germes survivants de *Str. lactis* après exposition à 0,05% p/p de H₂O₂ ont été cultivés, puis introduits (colonie isolée) dans du lait écrémé stérile; on a observé une diminution marquée de la production d'acide au bout de 3 jours (0,71% d'acide lactique dans le lait non traité, 0,48% dans le lait traité). L'aptitude des micro-organismes à réduire le bleu de méthylène n'était pas sensiblement modifiée.

TABLEAU 4
DURÉE DU TRAITEMENT PAR H₂O₂ NÉCESSAIRE POUR INACTIVER TOTALEMENT CERTAINS MICRO-ORGANISMES *

Micro-organisme	0,005%		0,03%		0,05%	
	h	mn	h	mn	h	mn
<i>Streptococcus lactis</i>	6	0	4	0	2	30
<i>Streptococcus liquefaciens</i>	16	0	7	0	4	0
<i>Sarcina</i> sp.	8	10	5	0	2	30
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	6	0	4	30	2	30
<i>Bacillus subtilis</i>	36	0	24	0	18	0
<i>Bacillus cereus</i>	24	0	14	0	7	0
<i>Bacillus kaustophilus</i>	120	0	32	0	18	0
<i>Bacillus megatherium</i>	**	**	24	0	16	0
<i>Escherichia coli</i>	5	45	0	45	0	45
<i>Aerobacter aerogenes</i>	6	0	1	0	0	30
<i>Alcaligenes viscosus</i>	2	0	1	0	0	40
<i>Serratia marcescens</i>	6	0	3	30	2	0
<i>Torula</i> sp.	24	0	7	0	3	0
<i>Oidium</i> sp.	26	0	8	0	3	30

* D'après Nambudripad & Iya (1951); Nambudripad, Lawminarayana & Iya (1949).

** Valeurs indéterminables.

D'autres résultats portant sur des coliformes anormaux isolés dans du lait traité (Manzari, 1951) donnent à penser que le traitement par le peroxyde peut modifier le métabolisme des bactéries survivantes.

Bactéries non pathogènes du lait

Dans certaines conditions, le traitement par H₂O₂ provoque une réduction bactérienne plus forte que celle donnée par la pasteurisation. Les germes sporulants anaérobies peuvent être totalement éliminés (Morris, 1950). Satta et al. (1943) ont déterminé le pourcentage de réduction de la numération bactérienne dans le lait traité par différentes concentrations de H₂O₂.

pendant 20 heures; les résultats sont rassemblés dans le tableau 5. L'addition de 0,05 % de solution de H₂O₂ a enrayé la multiplication des bactéries pendant plus de 15 heures à 15° et 20°C. L'addition de 0,1 % a réduit la numération initiale pendant 24 heures; le démarrage de la prolifération a été retardé de 36 heures par rapport à celle du témoin.

TABLEAU 5
POURCENTAGE DE RÉDUCTION DE LA NUMÉRATION BACTÉRIENNE
APRÈS 20 HEURES DANS DU LAIT TRAITÉ PAR H₂O₂*

Température (°C)	Pourcentage de réduction en fonction des concentrations p/p de H ₂ O ₂		
	0,08	0,10	0,12
15-17	99,82	99,88	99,88
20-22	98,64	99,76	99,79
32	93,57	99,53	99,96

* D'après Satta et al. (1943).

Monaci (1949) a observé une réduction de la numération bactérienne totale comprise entre 74,3 % et 96,3 % sous l'influence de 0,08 % p/p de H₂O₂ pendant 14-24 heures à 20°-22°C et 28°-30°C. Morandi (1943) a obtenu des résultats analogues.

Nai & Giolitti (1947) ont recommandé le contact avec 0,28 %-0,40 % p/p du préservateur pendant 8-10 heures, car ils estiment que l'addition de 0,1 %-0,12 % p/p n'assure pas une marge de sécurité suffisante. En hiver, la dose peut être limitée à 0,16 %-0,24 % (Giolitti & Nardi, 1949).

Clostridium butyricum, dont le nombre de germes est considérablement réduit en 11 heures, disparaît en 24 heures. *Thermobacteria* et *Streptococcus lactis* sont très sensibles à H₂O₂ (Arnandi & Treccani, 1953). Babad, Boros & Baier (1959) signalent que l'effet bactéricide de H₂O₂ est réduit dans le lait provenant de vaches traitées à la pénicilline, sans doute par sélection de bactéries qui sont également thermorésistantes.

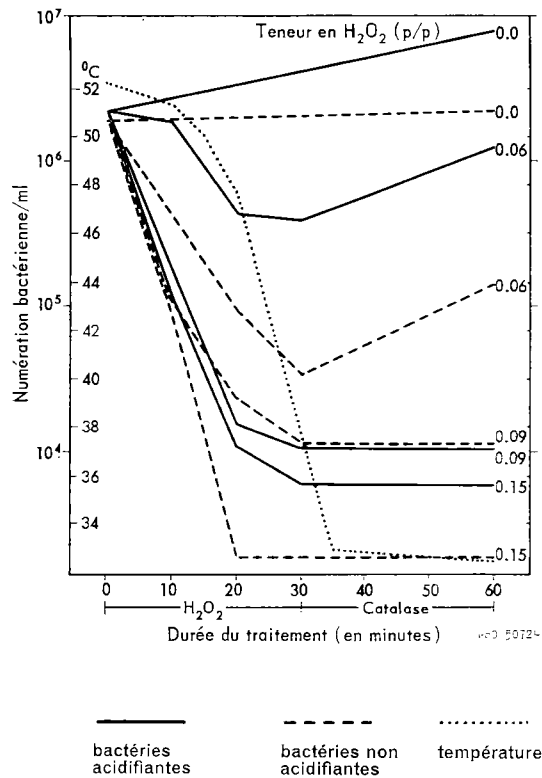
TABLEAU 6
RÉDUCTION DE LA NUMÉRATION BACTÉRIENNE MOYENNE
APRÈS UN COURT TRAITEMENT * PAR H₂O₂**

Micro-organismes	Numération bactérienne/ml dans		
	Lait cru	Lait pasteurisé ***	Lait traité par H ₂ O ₂
Nombre total des bactéries	304 280	11 485	1090
Coliformes	4 339	10	4
Germes sporulants aérobies	1 730	88	68

* 0,07% de H₂O₂, 30 minutes à 49°C.

** D'après Morris, Larson & Johnson (1951).

*** Température non indiquée.

EFFETS DU TRAITEMENT PAR H₂O₂ (0,06% p/p)
SUR LA NUMÉRATION BACTÉRIENNE DU LAIT CRU *

* D'après Demeter et al. (1959).

Comme on l'a indiqué plus haut, l'addition de H₂O₂ a aussi été recommandée comme traitement de brève durée (0,08 % de H₂O₂ et 30 mn à 49°-51°C) à la place de la pasteurisation. Le tableau 6 montre l'efficacité de cette méthode. Habituellement les ferments non lactiques sont plus facilement inactivés par ce procédé (98,5 % de réduction) que les ferments lactiques (84 % de réduction); les coliformes et les anaérobies sporulants sont totalement détruits (Demeter et al., 1959). C'est pour cette raison que la méthode est particulièrement recommandée dans la fabrication du fromage. Les données correspondantes concernant la réduction bactérienne sont en évidence sur la figure.

Micro-organismes pathogènes

Le traitement par H₂O₂ détruit la plupart des micro-organismes pathogènes, mais *Mycobacterium tuberculosis* résiste à la concentration de 0,8 % p/p (Giolitti, 1947b). Le traitement par ce produit ne peut donc être recommandé que pour des laits exempts de bacilles tuberculeux. Des bacilles de la tuber-

culose bovine ajoutés au lait ont résisté jusqu'à 25 heures à 0,08 % p/p de H_2O_2 (Bertarelli et al., 1945). Monaci (1949) a obtenu des résultats analogues. Sur neuf échantillons de laitensemencés de suspensions de *Myco. tuberculosis* var. *bovis* traités par H_2O_2 , deux ont été positifs à l'épreuve d'inoculation sur cobaye.

Lorsque le traitement est court, *Myco. tuberculosis bovis* n'est inactivé par addition de 0,15 % p/p de H_2O_2 que si la contamination du lait n'est pas trop forte (Demeter et al., 1959).

Les résultats expérimentaux de la destruction de *Brucella* dans le lait par H_2O_2 ne sont pas homogènes. La destruction complète de *Brucella abortus* et de *Br. melitensis* a été obtenue en traitant le lait par 0,08 % p/p de H_2O_2 soit pendant 3 heures (Biffi & Romagnoli, 1949), soit pendant 14-24 heures à 20°-22°C et à 28°-30°C (Monaci, 1949), soit pendant 30 minutes à 20°C et à 32°C (Satta et al., 1943). *Br. melitensis* est moins résistant que *Br. abortus* (Rosati & Mitrovic, 1951), le premier germe survivant 12 heures et le second 24 heures à l'addition de 0,08 % p/p de H_2O_2 à 20°-28°C. Les auteurs en concluent que si le traitement du lait par H_2O_2 n'élimine pas nécessairement tous les *Brucella* du lait, c'est néanmoins, jusqu'à présent, la plus sûre des méthodes chimiques mises au point, et qu'elle mérite d'être plus largement utilisée.

D'autres auteurs ont toutefois noté qu'une concentration de 0,08 % p/p de H_2O_2 ne suffit pas pour détruire complètement les *Brucella*. Par contre, un traitement de 12 heures à concentration triple entraîne leur destruction totale (Maestone, 1952; Giolitti, 1952). Demeter et al. (1959) ont constaté qu'un traitement de courte durée à 0,06 % inactive *Br. abortus*.

Salmonella typhosa est tué en 8-9 heures par 0,08 % p/p de H_2O_2 à 17°-32°C, et en 4-5 heures par 0,10-0,12 % à la même température (Satta et al., 1943). Des germes typhoïdiques n'ont été isolés (Monaci, 1949) que dans 1 échantillon sur 20ensemencés d'une suspension de *S. typhosa* et traités par 0,08 % p/p de H_2O_2 à 20°-22°C et à 28°-30°C pendant 14-24 heures.

Compte tenu des résultats obtenus sur les mycobactéries, il apparaît clairement que l'addition d'eau oxygénée ne doit être considérée que comme un moyen d'accroître la conservabilité et de réduire la numération bactérienne totale; elle ne détruit pas complètement, dans les conditions normales, certains micro-organismes pathogènes du lait. Le traitement par H_2O_2 ne peut donc être recommandé que pour la fabrication de ceux des produits laitiers que l'on prépare aussi, usuellement, avec du lait cru. *Si le lait est destiné à être consommé à l'état liquide, il est indispensable que le traitement par H_2O_2 soit suivi d'un autre traitement par une méthode approuvée assurant la destruction totale des germes pathogènes.*

Conditions propres à assurer une conservabilité maximale

En principe, H_2O_2 ne doit pas assurer une longue conservation du lait; comme d'autres substances biologiques, le lait contient de la catalase, en

petite quantité initialement, puis en plus grandes proportions par suite de l'activité catalasique des cellules et des bactéries. Cet enzyme décompose l'eau oxygénée; au bout d'un certain temps, celle-ci est donc totalement détruite et tout effet préservateur cesse. Heureusement, comme on l'a mentionné plus haut, la catalase est inactivée par H₂O₂ cependant que le peroxyde est décomposé par l'enzyme (Lück, 1957). Ainsi, une certaine quantité de H₂O₂ est décomposée en détruisant la catalase, mais le reste joue un rôle préservateur pendant un certain temps. On sait que la vitesse de destruction de H₂O₂ par cet enzyme est accélérée par une augmentation de température (dans l'intervalle des limites physiologiques), mais la destruction de la catalase est, elle aussi, favorisée par un accroissement de la température. Les proportions de H₂O₂ décomposée en 24 heures à 4°, 13°, 20° et 30°C par du lait fortement contaminé de colibacilles (Lück, 1955a; Lück et Schillinger, 1958b) étaient respectivement de 0,17 %, 0,12 %, 0,078 % et 0,043 %. Ces résultats montrent que l'addition de 0,1 % de H₂O₂ protège convenablement le lait à 20° ou à 30°C mais pas à 13°C.

Par ailleurs, pour détruire le surplus de H₂O₂ dans le lait par addition de catalase, il convient que le lait soit relativement froid. En effet, à faible température, la décomposition du conservateur est plus longue mais il faut moins de catalase qu'aux températures plus élevées. La quantité de H₂O₂ décomposée par le lait à température constante est proportionnelle à la quantité de catalase (cellules, bactéries aérobies) du lait. Pour obtenir un effet protecteur et germicide maximal, il y a donc lieu d'ajouter H₂O₂ peu de temps après la traite, lorsque la population bactérienne est encore faible et que le lait est à une température de 37°C (température du sang).

Etant donné que la pasteurisation détruit la majeure partie de la catalase, H₂O₂ a un meilleur effet préservateur sur le lait pasteurisé que sur le lait cru.

Utilisation de l'eau oxygénée en laiterie

L'utilisation pratique de H₂O₂ comme préservateur laitier a été décrite par de nombreux auteurs (notamment: Minut, 1946, 1947; Demeter, 1953; Rosell, 1954). Comme on l'a vu plus haut, on applique normalement deux méthodes: un traitement court qui réduit la numération bactérienne du lait (par exemple, le traitement «Per-zym» et le traitement H₂O₂-catalase) et un traitement ayant pour but d'améliorer la conservabilité.

Traitement court remplaçant la pasteurisation

Rosell (1957) et d'autres auteurs ont décrit le traitement par H₂O₂ substitué à la pasteurisation pour réduire la numération bactérienne. Le recours à ce traitement a été préconisé pour préserver les caractéristiques du lait cru en vue de la fabrication du fromage (Morris, Larson & Johnson, 1951, 1952, 1953; Roundy, 1958, 1959), du traitement et de la mise en boîtes

du lait conservé sucré (Winger, 1952a) et du traitement du lait de consommation (Lewis, 1953).

Pour la fabrication du fromage, on ajoute l'eau oxygénée au lait et après avoir attendu assez longtemps pour obtenir l'effet germicide, on détruit l'excès de H_2O_2 par addition de catalase.

Normalement, on recommande un traitement par 0,08-0,1 % p/p de H_2O_2 pendant 20-40 minutes à 49°-54°C. A cette température, le peroxyde ne doit pas séjourner dans le lait plus d'une heure, car un traitement prolongé provoquerait la formation d'un caillé gommeux. Une fois le lait refroidi à 38°C environ, on ajoute la catalase. Certains estiment que les fromages confectionnés avec ce lait (fromage suisse, Cheddar et Jack) sont supérieurs en arôme, pâte et texture à ceux que donne le lait pasteurisé (Morris, Larson & Johnson, 1951), mais selon d'autres expérimentateurs, il n'y aurait guère de différence du point de vue de la texture, de la formation de «trous» et du goût entre les fromages tels que l'Emmental et le Tilsit fabriqués avec du lait cru, du lait pasteurisé ou du lait traité par H_2O_2 (Heidrich, 1956). Seul le lait riche en ferments butyriques forme plus de «trous» lorsqu'il est traité par H_2O_2 . La technique de fabrication du fromage dans ce cas est analogue aux méthodes habituelles, mais on emploie des quantités supérieures de levain et des températures de cuisson légèrement plus élevées que de coutume, car on observe parfois de légères variations de réaction aux différents stades de la fabrication.

Les avantages du procédé ont été résumés comme suit (Armour & Company, Inc., 1953):

- 1) Qualité supérieure et goût agréable
- 2) Pâte et texture améliorées
- 3) Régulation de la fermentation par action sur la température et sur la quantité de H_2O_2
- 4) Suppression de la fermentation tardive
- 5) Absence d'interférence du pré-traitement par H_2O_2 avec les opérations ultérieures de fabrication de fromage
- 6) Elimination des modifications dues aux hautes températures de pasteurisation

Mais le traitement du lait par l'addition d'eau oxygénée et de catalase pour la fabrication du fromage est plus long que la pasteurisation normale, et la destruction des ferments butyriques par 0,1 % de H_2O_2 est incomplète lorsque le lait est très contaminé (Wassermann, 1959).

Pour la préparation de lait stérilisé, on utilise un traitement analogue par le peroxyde. Le lait est traité par 0,035-0,070 % p/p de H_2O_2 à 49°C pendant 30 minutes (Winger, 1952a). Après destruction de H_2O_2 par la catalase, le lait est homogénéisé, mis en boîtes et stérilisé à plus de 100°C. Le produit ainsi

manufacturé n'a pas le goût de cuit (ou de brûlé) du lait stérilisé par la chaleur. Dans un autre brevet, Winger (1952b) recommande de pasteuriser le lait avant de le traiter par 0,0053 % p/p de H₂O₂ à 61°-62°C pendant 30-35 minutes, et de ne pas ajouter de catalase avant la stérilisation.

Le procédé de traitement à basse température par H₂O₂ et la catalase a également été préconisé pour le traitement du lait frais dans les pays tropicaux (Lewis, 1953). Les résultats cités plus haut concernant l'effet sur *Myco. tuberculosis* donnent à penser que ce procédé ne convient pas au lait qui doit être consommé liquide, sauf en cas de pasteurisation certaine. Si l'on veut obtenir le même taux de destruction que par thermo-pasteurisation, il faut prolonger la durée du traitement par H₂O₂ et utiliser une concentration supérieure (Nai & Giolitti, 1947).

Addition de H₂O₂ pour améliorer la conservabilité

De nombreux auteurs ont signalé l'amélioration de la conservabilité du lait à la suite du traitement par H₂O₂. Deux méthodes sont applicables:

- 1) l'addition d'une quantité relativement faible de H₂O₂ pour faciliter la conservation entre la traite et l'arrivée au centre de pasteurisation; et
- 2) l'addition d'une quantité relativement élevée de H₂O₂ pour améliorer la conservabilité et éviter la pasteurisation.

L'une et l'autre réduisent les pertes dues à l'acidification pendant le transport, qui rend le lait impropre à la pasteurisation et à la consommation. Du point de vue nutritif, seule la première méthode est à recommander. Comme on l'a vu précédemment, les concentrations en H₂O₂ supérieures à 0,1 % p/p peuvent nuire aux constituants du lait.

L'intérêt d'une faible concentration en peroxyde pour préserver le lait dans les pays chauds tient à l'augmentation des possibilités de transport, ce qui permet de fournir des protéines pour la consommation humaine et encourage la production du lait dans des régions éloignées des centres de consommation. Le principal inconvénient de la méthode est de retarder l'amélioration des conditions d'hygiène à la production.

La concentration nécessaire en peroxyde dépend du climat, de la qualité du lait et de la durée de conservation souhaitée. Les quantités suivantes (en % p/p) ont été préconisées: 0,009 (Vintika, 1948), 0,03 (Nambudripad et al., 1952), 0,03-0,07 (Rossell, 1957), 0,04-0,08 (Pien, 1948), 0,08-0,12 (Satta, 1948; Satta et al., 1943). Aux faibles concentrations, H₂O₂ est totalement détruite, et l'addition de catalase peut être inutile. Le lait pasteurisé, dans lequel la majeure partie de la catalase a été détruite par la chaleur, peut être protégé à plus faible dose de H₂O₂ que le lait cru. Ce procédé de conservation permet d'approvisionner les grandes villes des pays tropicaux en lait fraîchement pasteurisé transporté sur de grandes distances. Le lait écrémé traité par 0,08 % p/p de H₂O₂ peut remplacer le lait écrémé frais dans l'alimentation des veaux (Mainradi, 1952). En résumé, les concentra-

tions de H_2O_2 pour assurer la préservation doivent être comprises entre 0,01 et 0,08 % p/p, mais ce traitement ne peut pas être substitué à la pasteurisation.

La seconde méthode vise au contraire à remplacer la pasteurisation normale grâce à un accroissement de la concentration en peroxyde, ou de la température ou encore de la durée du traitement. Dans certains essais italiens pratiqués dans un petit centre collecteur (Giolitti, 1947a; Nai et al., 1951), on a ajouté au lait cru de 0,1 à 0,24 % p/p de H_2O_2 — selon la teneur en catalase. Après 8 heures de contact, l'excès de peroxyde était éliminé par addition de catalase, puis le lait était mis en bouteilles et distribué. Le coût de la méthode s'avéra légèrement inférieur à 6,25 liras par litre. La conservabilité des échantillons ainsi traités était meilleure que celle du lait pasteurisé, surtout à 13°C (Nemec, 1950).

On a également essayé d'utiliser des concentrations en peroxyde supérieures à 1%. Le lait peut être conservé à 5°C par addition de 0,4, 0,8 ou 1,2% p/p de H_2O_2 pendant 24-35 jours, 32-40 jours et 100-110 jours respectivement (Romani, 1947). Negretti (1956) a communiqué des résultats analogues; il a observé que le lait pouvait être conservé jusqu'à 39 jours à 28°C par addition de 1% de H_2O_2 . Cette méthode ne peut toutefois tenir lieu d'aucune des méthodes actuelles agréées pour la conservation du lait.

Romani (1944) estimait qu'on pourrait utiliser l'oxygène naissant pour conserver le lait, comme dans le procédé Hofius; mais, comme on l'a déjà indiqué, cette méthode est difficilement applicable au lait en vrac à l'échelon commercial.

Conservation du lactosérum

On trouve aussi dans la littérature spécialisée la description des procédés de conservation du lactosérum par l'eau oxygénée. On a obtenu de bons résultats par addition de 0,015% et 0,030% p/p de H_2O_2 au lactosérum doux. Après précipitation des protéines par chauffage à 98°C pendant 10 minutes, ou après addition de petites quantités de levure, le goût de H_2O_2 disparaît. Jasewics & Porges (1959) ont rapporté des résultats analogues. Du lactosérum destiné à la fabrication de fromage a été conservé pendant plus de 10 jours par addition, peu après la séparation, de 0,02% p/p de H_2O_2 . Cette concentration a tué en 1 heure 97% des bactéries dans un sérum massivement contaminé ($2,8 \times 10^7$ micro-organismes/ml), mais elle s'est révélée relativement inefficace contre des contaminations bactériennes plus fortes. *Saccharomyces fragilis* a été cultivé avec succès dans du sérum traité par H_2O_2 dont l'excès avait été détruit par la catalase.

Les essais de conservation par des concentrations en peroxyde moindres n'ont pas été très concluants. L'addition de 0,01% de H_2O_2 n'a pas empêché la croissance de levures (Plöttner, 1947).

A l'opposé des bons résultats précédemment indiqués, Yunus (1953) a signalé que l'addition de 0,1% de H_2O_2 ne permettait pas de conserver le

lactosérum. Le formaldéhyde s'est montré plus efficace, inhibant l'acidification pendant au moins 21 jours.

Conservation de la crème

La conservation de la crème par H₂O₂ a aussi été tentée. Dans un brevet d'avant-guerre (Reichert, McAllister & Hinegardner, 1936), on recommande l'addition de 0,01-0,09% p/p de H₂O₂ suivie d'un chauffage à 61°-63°C pendant 15-30 minutes. Pour éviter la contamination des crèmes «synthétiques», il convient d'ajouter 0,005-0,02% de H₂O₂ (Hobbs & Smith, 1954). En présence de beurre, de lait et de jaune d'œuf, il faut multiplier par trois au moins la concentration de H₂O₂ comme pour la conservation des matières grasses émulsionnées sans addition de protéines.

Fabrication de produits laitiers à partir de lait préservé par H₂O₂

Fabrication des fromages

Comme on l'a vu plus haut, les fromages faits de lait soumis à un traitement court par H₂O₂ (0,07% p/p de H₂O₂ pendant 20-40 minutes à 49-55°C) peuvent être supérieurs en qualité aux produits fabriqués avec du lait cru ou pasteurisé. Par ailleurs, les fromages faits de lait préservé par H₂O₂ (0,08% p/p) pendant assez longtemps (8-24 heures) sont le plus souvent de qualité inférieure, pâteux, mous (Morris, 1950; Lück, 1955b). Aux concentrations supérieures, l'effet est encore plus prononcé; il est difficile de faire un fromage dur avec du lait traité par 1% de H₂O₂ (Peltola & Mattson, 1950). Deux facteurs sont responsables de ces anomalies: 1) un post-effet d'inhibition sur les ferments lactiques (Arnaudi, Cartasegna & Passani, 1949; Lück & Schillinger, 1958b); 2) l'influence de H₂O₂ sur la structure de la caséine (Lück et Joubert, 1955b). Le retard à l'acidification par les ferments lactiques est partiellement dû à la forte quantité d'oxygène dissous (Lück & Schillinger, 1958b) et probablement à une petite variation du potentiel d'oxydo-réduction. Pour parer à ces inconvénients, il faut utiliser plus de levain que dans les conditions normales et cuire à une température légèrement supérieure. Arnaudi et al. (1949) ont dû ajouter jusqu'à 3 fois la quantité de présure normalement utilisée pour obtenir un caillé suffisamment ferme. Comme on l'a déjà vu, la conservation par H₂O₂ prolonge le temps de caillage; le retard à la coagulation est d'autant plus important que la concentration en peroxyde est plus forte et que la période de conservation a été plus longue (Lück & Joubert, 1955b). Et plus la coagulation est lente, moins le caillé est ferme.

Les essais de confection de fromage (Gouda et Cheddar) avec du lait préservé (0,1% p/p de H₂O₂ pendant 24-30 heures à 26-30°C) n'ont pas donné de bien bons résultats, même en doublant la quantité de culture de levain et en ajoutant du chlorure de calcium. La pâte du Gouda était très molle et flasque; le fromage se déformait, avait un goût étrange et un arôme impur. Par vieillissement, il devenait amer. La pâte du Cheddar était analogue

à celle du Gouda; après 8 jours de conservation, elle avait pris un goût défec-tueux et sa texture était devenue pâteuse, grasseuse et pliable, rappelant celle du fromage fondu (Lück, 1955b). Le goût, lui aussi, était caractéristique d'un sel chimique, légèrement amer. D'après ces résultats expérimentaux, la confection de fromage avec du lait préservé par H_2O_2 (0,1% p/p, 24 heures) n'est pas à recommander. Pourtant, les essais de fabrication de fromage avec des mélanges de lait préservé et de lait frais non traité, ou bien avec du lait protégé par une plus faible concentration de H_2O_2 , ont donné de bons résultats. Le mélange de lait protégé et de lait frais se fait avant la pasteurisation. Il doit reposer 30 minutes à 1 heure pour que la catalase du lait frais ait le temps de décomposer l'excès de H_2O_2 . Il est inutile d'ajouter de la catalase. Le fromage de Gouda fait à 50% avec du lait protégé avait, contrairement au Cheddar, un léger goût étrange. Les échantillons faits de 33% et de 25% de lait protégé par H_2O_2 étaient de meilleure qualité que les témoins, surtout dans les pays tropicaux, pendant la saison où le lait arrive trop acide à la fabrique et où la pâte du fromage a tendance à devenir granuleuse, friable ou même crayeuse (Lück, 1955b).

La qualité du fromage fait de lait traité par H_2O_2 est supérieure quand le conservateur est ajouté en plusieurs fois à faible concentration (par exemple, 0,1% p/p en trois lots égaux à intervalles de 8 heures) que lorsque la même quantité est ajoutée en une seule fois (par exemple, 0,1% en une seule fois). La conservation du lait par 0,02-0,04% p/p de H_2O_2 n'affecte pas la technique de fabrication des fromages (Arnaudi, 1949; Treccani, 1952). Des essais de fabrication de Parmesan avec du lait traité par H_2O_2 ont été également pratiqués (Annibaldi, 1958).

Fabrication du beurre

Plusieurs essais de fabrication de beurre avec du lait traité par H_2O_2 (0,03% p/p de H_2O_2) (Nambudripad, Laxminarayana & Iya, 1952) n'ont révélé aucune différence appréciable de qualité entre le produit obtenu et le beurre fait de lait non traité; aucune différence de rendement ou d'arôme n'a été observée lorsqu'on a opéré à l'échelle industrielle sur du lait conservé par 0,2% p/p de H_2O_2 , l'excès de désinfectant étant détruit par la catalase en 8 heures (Negretti, 1952). Le beurre fait de lait traité présentait une meilleure conservabilité; sa teneur en colibacilles était très faible et sa teneur en bactéries presque nulle.

Fabrication de caséine

Il n'y a pas de véritable différence entre la fabrication de caséine avec du lait traité par H_2O_2 (0,1% p/p, 24 heures à 25°C) et avec du lait non traité, sauf que, dans le premier cas, la durée de coagulation est un peu plus longue et que l'acidité du sérum avant cuisson doit être un peu plus forte. Il faut contrôler exactement cette acidité car la caséine fabriquée à partir de lait traité a tendance à devenir caoutchouteuse et plastique quand la tempéra-

ture est trop élevée. On observe également cet effet à température de séchage excessive. On l'évite en ajustant la dernière eau de rinçage à pH 4,6 par addition d'acide. Il convient de ne pas laisser un caillé faiblement acide provenant de lait traité pendant toute une nuit dans l'eau de rinçage non acidifiée, car il risquerait de devenir si mou et si laiteux qu'il ne pourrait plus être pressé et séché (Lück, 1955b).

Fabrication de lait en poudre

Dans le Nigéria septentrional, on protège le lait par addition d'eau oxygénée pour le transporter entre les centres collecteurs et les laiteries. Une fois écrémé, le lait est transformé en poudre par séchage sur cylindres et l'eau oxygénée est totalement détruite. La poudre est distribuée dans des centres sociaux aux enfants, à raison de 900 grammes par mois, soit telle quelle, soit en mélange avec trois fois son poids de farine d'arachide (H. Davelaar, communication personnelle, 1961). L'emploi de cette farine est encore à l'étude.

Considérations sur la toxicité de H₂O₂ en laiterie

L'effet du traitement par l'eau oxygénée sur les constituants du lait est moins marqué que celui des autres traitements agréés que l'on applique dans l'industrie laitière. Le lait ne perd guère de sa valeur nutritive; on n'observe qu'une légère diminution de certaines vitamines et une destruction considérable d'acide ascorbique.

D'après nos connaissances actuelles concernant l'effet de H₂O₂ sur les organismes vivants, cet agent de préservation doit être complètement détruit avant que le lait ou ses dérivés soient livrés à la consommation. L'eau oxygénée provoque en effet une diminution du nombre des cellules en mitose dans l'intestin de la souris (Dustin & Gompel, 1949) et suscite des mutations chez certains micro-organismes (par exemple, chez *Neurospora* et *Escherichia coli*). Il convient donc de prendre des précautions pour éviter que du peroxyde non décomposé ne subsiste dans les aliments destinés à l'homme, bien que H₂O₂ soit rapidement décomposé dans le tractus gastro-intestinal et que les tissus vivants puissent en produire des traces.

Epreuves de détection de H₂O₂

Au cours de la fabrication des produits laitiers (par exemple du fromage) et du traitement du lait liquide destiné à la consommation humaine, le principal problème est de s'assurer qu'aucune trace de peroxyde ne subsiste dans le lait.

En pratique laitière, il importe de disposer d'épreuves qualitatives sensibles. A cette fin, on peut recommander l'emploi de bandes de papier à l'iodure de potassium et à l'amidon. Cette méthode permet de déceler moins de 0,001% p/p de H₂O₂. On mélange à volumes égaux quelques millilitres de lait et d'acide chlorhydrique concentré, on ajoute une goutte d'une solution diluée de formaline, on porte à 60°C et on plonge dans la solution une bande du papier réactif. En présence de H₂O₂, le papier vire au bleu ou au violet.

Munday (1957) a utilisé une solution de pentoxyde de vanadium pour décélérer H_2O_2 dans le lait: à 10 ml de lait, on ajoute 10-20 gouttes d'une solution à 1% de V_2O_5 dans l'acide sulfurique dilué (6%); s'il y a des traces de H_2O_2 , le lait vire au rose rouge. Le test est sensible à moins de 0,008% p/p de H_2O_2 .

Les auteurs suivants donnent des renseignements plus détaillés sur les méthodes d'épreuve: Funk, 1949; Humpoletz, 1949; Patrick & Wagner, 1949; Aquino, 1950; Freytag, 1950; Ovenston & Rees, 1950; Musha, Higashino & Doi, 1951; Pien, Désirant & Lafontaine, 1953, 1954; Andreae, 1955; Janiček & Pokorny, 1955; Rouquette, 1955; Balley & Boltz, 1959; Meloan, Mauck & Huffman, 1961; Perschke & Broda, 1961.

Conclusions

Pour conclure, il paraît opportun de citer ici l'opinion formulée par les experts réunis en 1957 sous les auspices de la FAO: ¹

«Le Groupe est d'avis:

» 1. qu'en général l'emploi d'agents de préservation dans le lait n'est pas souhaitable et qu'en fait il ne peut être considéré que comme un mal nécessaire. Ce procédé ne peut être toléré que dans des cas exceptionnels et dans les pays chauds ou sous-développés où il n'est pas possible de transporter rapidement le lait du lieu de production au centre de traitement ou d'assurer son refroidissement efficace, et lorsque des pertes importantes de produits alimentaires ne pourraient être évitées que par ce procédé;

» 2. que, parmi les agents de préservation dont on dispose actuellement, le seul qui puisse être admis pour le traitement du lait destiné à la consommation humaine ou à la fabrication de produits laitiers est l'eau oxygénée pure (vendue dans le commerce sous forme de solutions aqueuses de concentrations diverses);

» 3. que l'addition d'eau oxygénée au lait ne doit être faite qu'au centre de ramassage et non par le producteur, sauf dans des cas exceptionnels où ce dernier y est autorisé par l'autorité sanitaire ou toute autre autorité compétente;

» 4. que si, par suite de difficultés locales, l'autorisation est accordée au collecteur de lait ou au producteur, d'utiliser l'eau oxygénée, la dose par litre de lait ne doit en aucun cas dépasser 0,80 gramme d' H_2O_2 (calculé en produit pur) et être généralement comprise entre 0,10 et 0,40 d' H_2O_2 pour le lait destiné à être consommé à l'état liquide;

» 5. qu'étant donné que l'eau oxygénée sert uniquement à retarder l'acidification du lait et qu'aux doses non nocives elle ne peut détruire certains

¹ Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (1957). Rapport de la Réunion d'experts sur l'emploi de l'eau oxygénée et autres agents de préservation du lait. Interlaken, Suisse, 23-27 septembre 1957. Rome (document ronéographié non publié FAO/58/5/3510).

types de micro-organismes pathogènes (*notamment le M. tuberculosis*), le lait traité à l'eau oxygénée doit être soumis ensuite à un traitement thermique efficace avant sa distribution aux consommateurs ou au cours de sa transformation en produits laitiers;

» 6. que les additions d'eau oxygénée au lait destiné à être consommé à l'état liquide ou transformé en d'autres produits, doivent faire l'objet d'un contrôle très strict et que des organismes officiels doivent procéder à des analyses assez fréquentes pour s'assurer que l'agent de préservation a été complètement éliminé avant que le lait et les produits laitiers ne soient livrés à la consommation;

» 7. que si l'on a recours à la catalase pour faire disparaître les dernières traces d'eau oxygénée dans le lait, il faut s'assurer que la préparation soit irréprochable du triple point de vue enzymatique, chimique et bactériologique;

» 8. que, du fait que l'eau oxygénée modifie dans une certaine mesure la qualité du lait, le Groupe recommande de pousser plus avant les recherches pour déterminer l'effet de cette altération sur la valeur nutritive du lait et la santé humaine (cf. le rapport du Comité mixte FAO/OMS d'experts des additifs alimentaires — Rapport FAO N° 15 des réunions sur la nutrition);

9. enfin, que les services officiels de contrôle et le personnel technique intéressés doivent bien se pénétrer du fait que l'emploi de l'eau oxygénée n'est pas une mesure d'hygiène et ne peut remplacer un traitement thermique efficace. En bref, c'est une méthode à ne pas recommander, sauf dans des cas exceptionnels.»

BIBLIOGRAPHIE

- Andrae, W. A. (1955) *Nature (Lond.)* **175**, 859
 Annibaldi, S. (1958) *Latte, Lattic. Cons. anim.*, **32**, 425
 Aquino, R. M. (1950) *Publ. Inst. invest. microquim., Rosario*, **14**, 119
 Armour & Company, Inc. (1953) *Bull. Armour Inst. (Chicago)*, No. EC-10
 Arnaudi, C. (1949) *Mondo d. Latte*, No. 8, pp. 271, 273
 Arnaudi, C., Cartasegna, F. & Passani, M. (1949) *Ann. Microbiol. (Milano)*, **4**, 41
 Arnaudi, C. & Treccani, V. (1953) *Proc. XIII Int. Dairy Congr.*, **2**, 403
 Babad, J., Boros, D. L. & Baier, F. (1959) *Nature (Lond.)*, **184**, 292
 Balley, R. & Boltz, D. F. (1959) *Analyt. Chem.*, **31**, 117
 Banerjee, N. L. (1947) *Indian med. Gaz.*, **82**, 156
 Bell, R. W. & Mucha, T. J. (1949) *J. Dairy Sci.* **32**, 833
 Bertarelli, E., Peregallo, J. & Caserio, E. (1945) In: *Report of Official Publications Board, US Department of Commerce, No. 31003*, Washington, D.C., Appendix III, p. 24
 Biffi, G. G. & Romagnoli, A. (1949) *Boll. Soc. Biol. sper.*, **25**, 93
 Bisogni, G. & Calendoli, G. (1943) *Boll. Soc. Biol. sper.*, **18**, 322
 Budde, G. (1904) *Tuberculosis (Berl.)*, **3**, 94
 Cimino, G. (1945) *Atti Accad. Fisiocr. Siena*, **13**, 19
 Csiszar, J. (1944) *Tejgazdaság*, **4**, 159

- Csiszar, J., Tomka, G. & Bittera, R. (1949) *Tejgazdaság*, **7**, 129
- Dahlen, M. A. & Crossley, M. L. (1945) In: *Report of Official Publications Board, US Department of Commerce, No. P.B. 31003*, Washington, p. 67
- Demeter, K. J. (1953) *Dtsch. Lebensmitt Rdsch.*, **49**, 33
- Demeter, K. J., Kundrat, W., Faber, A., Schellner, H. & Hahn, H. (1959) *Proc. XV Int. Dairy Congr.*, **2**, 538
- Dustin, P. & Gompel, C. (1949) *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, **143**, 874
- Ferrara, B. & Salerno, A. (1957) *Acta med. vet.* **3**, 313
- Ferrara, B., Salerno, A., Minieri, L. & Paolis, P. de (1957) *Latte, Lattic, Cons. anim.*, **31**, 106
- Freytag, H. (1950) *Z. anal. Chem.*, **131**, 77
- Funk, E. (1949) *Molkereiztg, Hildesh.*, **3**, 129
- Giolitti, G. (1947a) *Atti Soc. ital. Sci. vet.*, **1**, 187
- Giolitti, G. (1947b) *Atti Soc. ital. Sci. vet.*, **1**, 190
- Giolitti, G. (1949) *Atti Soc. ital. Sci. vet.* **3**, 543
- Giolitti, G. (1952) *Igiene San. pubbl.*, **8**, 433
- Giolitti, G. & Nardi, E. (1949) *Atti Soc. ital. Sci. vet.*, **3**, 588
- Heidenhein (1890) *Zbl Bakt.*, **8**, 488, 695
- Heidrich, P. (1956) *Proc. XIV Int. Dairy Congr.*, **2**, 231
- Hobbs, B. C. & Smith, M. E. (1954) *J. Hyg., Camb.*, **52**, 230
- Humpoletz, J. E. (1949) *Aust. J. Sci.*, **12**, 111
- Jablin-Gonnet (1901) *Ann. Chim. anal. appl.*, **6**, 129
- Janiček, G. & Pokorný, J. (1955) *Chem. Listy*, **49**, 1315
- Janiček, G. & Pokorný, J. (1958) *Sbornik*. Edit.: Vysoká škola chemickotechnologická v Praze. Praha, Státní Pedagogické Nakladatelství [Abstr. *Z. Lebensmitteluntersuch.*, 1959, **110**, 412]
- Jasewicz, L. & Porges, N. (1959) *J. Dairy Sci.*, **42**, 1119
- Krukovsky, V. N. (1949) *J. Dairy Sci.*, **32**, 163
- Krukovsky, V. N. & Guthrie, E. S. (1946) *J. Dairy Sci.*, **29**, 293
- Lewis, P. (1953) Lab. Inc. manufact. Chemists, Milwaukee [Abstr. *Milchwissenschaft*, 1954, **9**, 31]
- Low (1900) Cité par: Rosell, J. M. (1954) *Milchwissenschaft*, **9**, 180
- Lück, H. (1955a) *S. Afr. Dairym.*, **17**, No. 2, p. 14; No. 3, p. 14
- Lück, H. (1955b) *Sci. Bull. Admin. Dairy Ind. Control Bd, S.W. Africa*, Windhoek
- Lück, H. (1956a) *Dairy Sci. Abstr.*, **18**, 363
- Lück, H. (1956b) *Biochem. Z.*, **328**, 216
- Lück, H. (1957) *Biochem. Z.*, **329**, 165
- Lück, H. & Joubert, F. J. (1955a) *Milchwissenschaft*, **10**, 160
- Lück, H. & Joubert, F. J. (1955b) *Milchwissenschaft*, **10**, 370
- Lück, H. & Joubert, F. J. (1955c) *Biochem. Z.*, **327**, 221
- Lück, H. & Schillinger, A. (1958a) *Z. Lebensmitteluntersuch.*, **108**, 341
- Lück, H. & Schillinger, A. (1958b) *Z. Lebensmitteluntersuch.*, **107**, 512
- Maestone, G. (1952) *Arch. vet. ital.*, **3**, 111
- Mainradi, B. (1952) *Atti Soc. ital. Sci. vet.*, **6**, 129
- Manzari, P. (1951) *Nuovi Ann. Ig.*, **2**, 336
- Mayerhofer E. & Pribram, E. (1910) *Mschr. Kinderheilk.*, **9**, 1
- Meloan, C. E., Mauck, M. & Huffman, C. (1961) *Analyt. Chem.*, **33**, 104
- Minut, J. (1946) *Industr. lechera*, **28**, 549, 737, 824
- Minut, J. (1947) *Industr. lechera*, **29**, 36, 124, 218
- Molland, J. (1947) *Acta path. microbiol. scand.*, **66**, 149
- Monaci, V. (1949) *Boll. Ist. sieroter. Milano*, **28**, 357
- Morandi, L. (1943) *Chim. e Industr. (Milano)*, **25**, 45
- Morris, A. J. (1950) *Proc. W. Div. Amer. Dairy Sci. Ass.*, p. 130
- Morris, A. J., Larson, P. B. & Johnson, J. D. (1951) *Fm Home Sci.*, **12**, 79

- Morris, A. J., Larson, P. B. & Johnson, J. D. (1952) *Food Engng*, **24**, 2, 167
- Morris, A. J., Larson, P. B. & Johnson, J. D. (1953) *Canad. Dairy Ice Cr. J.*, **32**, 72
- Much, H. & Römer, P. (1906) *Beitr. Klin. Tuberk.*, **5**, 349
- Munday, W. H. (1957) *J. Ass. off. agric. Chem., Wash.*, **40**, 789
- Muset, P. P., Calvet, F. & Valls, J. (1954) *Arch. Inst. Farmacol. exp. (Madr.)*, **6**, 13
- Musha, S., Higashino, T. & Doi, T. (1951) *J. chem. Soc. Japan (Pure Chem. Sect.)*, **72**, 995
- Nai, D. D., Alberti, G., Bertani, M., Giolitti, G., Grisotti, A., Nemeč, R. & Rognoni, A. (1951) *Atti Soc. ital. Sci. vet.*, **5**, 493
- Nai, D. D. & Giolitti, G. (1947) *Atti Soc. ital. Sci. vet.*, **1**, 197
- Nambudripad, V. K. N. & Iya, K. K. (1951) *Indian J. Dairy Sci.*, **4**, 38
- Nambudripad, V. K. N., Laxminarayana, H. & Iya, K. K. (1949) *Indian J. Dairy Sci.*, **2**, 65
- Nambudripad, V. K. N., Laxminarayana, H. & Iya, K. K. (1952) *Indian J. Dairy Sci.*, **5**, 135
- Negretti, F. (1952) *Mondo d. Latte*, No. 1, pp. 10, 13, 17, 19, 21
- Negretti, F. (1956) *Arch. vet. ital.*, **7**, 121
- Nemeč, R. (1950) *Atti Soc. ital. Sci. vet.*, **4**, 266
- Nicolle, C. & Duclaux, E. (1904) *Rev. Hyg. Police sanit.*, **26**, 101
- Organisation mondiale de la Santé, Comité mixte FAO/OMS d'experts des Additifs alimentaires (1957), *Principes généraux régissant l'emploi des additifs alimentaires. Premier rapport*, Genève, Rome (*Org. mond. Santé sér. rapp. techn.*, **129**; *Réunions de la FAO sur la Nutrition*, Rapport N° 15)
- Organisation mondiale de la Santé, Comité mixte FAO/OMS d'experts des Additifs alimentaires (1962), *Evaluation de la Toxicité de certains Antiseptiques et Antioxydants. Sixième rapport*, Genève, Rome (*Org. mond. Santé sér. rapp. techn.*, **228**; *Réunions de la FAO sur la Nutrition*, Rapport N° 31)
- Ovenston, T. C. J. & Rees, W. T. (1950) *Analyst*, **75**, 204
- Patrick, W. A. & Wagner, H. B. (1949) *Analyt. Chem.*, **21**, 1279
- Peltola, E. & Mattson, R. (1950) *Mejeri Tidsskr. Finl. Svenskbygd*, **12**, 27
- Perschke, H. & Broda, E. (1961) *Nature (Lond.)*, **190**, 257
- Pien, J. (1948) *Ann. Falsif., Paris*, **4**, 178
- Pien, J., Désirant, J. & Lafontaine, D. (1953) *Ann. Falsif., Paris.*, **46**, 416
- Pien, J., Désirant, J. & Lafontaine, D. (1954) *Lait*, **34**, 133
- Plöttner, D. (1947) *Süddeutsche Molkereizeitung (Kempten)*, **68**, 181
- Reichert, J. S., McAllister, R. W. & Hinegardner, W. S. (1936) «Preserving cream». US Pat. No. 2,053,740, 8. September 1936
- Renard, A. (1904) *Rev. Hyg. Police sanit.*, **26**, 97
- Romani, B. (1944) *Chim. e Industr. (Milano)*, **26**, 134
- Romani, B. (1947) *Chim. e Industr. (Milano)*, **29**, 143
- Rosati, T. & Mitrovic, M. (1951) *Igiene San. pubbl.*, **7**, 291
- Rosell, J. M. (1954) *Milchwissenschaft*, **9**, 180
- Rosell, J. M. (1957) *Milchwissenschaft*, **12**, 343
- Roundy, Z. D. (1958) *J. Dairy Sci.*, **41**, 1460
- Roundy, Z. D. (1959) «Peroxide treatment of milk for making Swiss cheese». US Pat. No. 2,900,257, 18 August 1959
- Rouquette, R. (1955) *Ann. Falsif., Paris*, **48**, 4
- Rudy, H. (1944) «Verfahren zur Herstellung von gegen bakterielle Infektionen unempfindlichen Schmelzkäse». German Pat. No. 936,182, 1 June 1944; 7 December 1955
- Sanders, P. & Sager, O. S. (1949) *J. Dairy Sci.*, **32**, 166
- Satta, E. (1948) *Riv. ital. Igiene*, **8**, 183
- Satta, E., Morandi, L., Satta, L. & Moggi, D. (1943) *Med. e Biol.*, **3**, 333
- Schrodt, M. (1883) *Milchztg*, p. 785
- Tepley, L. J., Derse, P. H. & Price, W. V. (1958) *J. Dairy Sci.*, **41**, 593
- Treccani, V. (1952) *Ann. Microbiol. (Milano)*, **5**, 17
- Vintika, J. (1948) *Sborn. cs. Akad. Zeméd.*, **20**, 390

- Voitkevich, A. T., Davidov, R. B. & Voitkevich, O. V. (1944) *Doklady vsesojuz. Akad. Nauk S.S.S.R.*, No. 31, 249
- Wassermann, O. (1959) *Proc. XV Int. Dairy Congr.*, 2, 530
- Weinstein, B. R. & Trout, G. M. (1951) *J. Dairy Sci.*, 34, 559
- Winger, L. T. (1952a) «Processing and canning whole sweet milk with the elimination of condensed milk taste». US Pat. No. 2,596,753, 13 May 1952
- Winger, L. T. (1952b) «Method of processing and canning whole sweet milk». US Pat. No. 2,622,983
- Yunus, M. (1953) *Pakist. J. Sci.*, 5, No. 1, p. 25
- Zweig, G. & Block, R. J. (1953) *J. Dairy Sci.*, 36, 427
-