LE LAIT

REVUE GÉNÉRALE DES QUESTIONS LAITIÈRES

SOMMAIRE

MÉMOIRES ORIGINAUX :

Ch. ALAIS. — La constitution de la caséine 369

J. BUDSLAWSKI et K. POGORZELSKI. — Dosage colorimétrique du palmitate d'ascorbyle dans les matières grasses 379

G. DELFORNO. — Recherches sur l'influence exercée par les alginates dans la fabrication des fromages à pâte molle 385

SUPPLÉMENT TECHNIQUE :

G. GENIN. — Recherches néo-zélandaises sur la fabrication de la caséine sulfurique 395

DOCUMENTS ET INFORMATIONS

Les grandes maladies animales et leur prophylaxie . . . 474

Brevet d'invention : copropriété 476

Le lait et les laitages dans l'ouest africain 478

Réunion Internationale sur l'Enseignement et la Formation professionnelle en laiterie 479

2^e Congrès International de la Science et de la Technologie des Aliments. 480

MÉMOIRES ORIGINAUX (*)

LA CONSTITUTION DE LA CASÉINE

par

CHARLES ALAIS (1)

Institut de Biochimie, Faculté des Sciences, Orsay (Seine-et-Oise)

Dans l'état actuel des recherches sur la constitution de la caséine, la situation est confuse, malgré la publication de bonnes revues [1, 2]. Il nous a paru utile de faire une mise au point, dans un esprit de simplification.

Rappelons brièvement que le terme « caséine entière » désigne la substance protéique qui précipite au cours de l'acidification du lait écrémé, vers pH 4,6-4,7 ; elle est également désignée par les termes : caséine isoélectrique ou « caséine de Hammarsten » [3], (bien que le premier auteur qui ait clairement décrit sa préparation

(*) Reproduction interdite sans indication de source.

(1) Chercheur contractuel de l'Institut National de la Recherche Agronomique.

soit QUÉVENNE [4]). Son hétérogénéité a été mise en évidence il y a près de quarante ans, par des études de solubilité [5] ; mais elle n'a été solidement établie que plus tard, au moyen de la méthode électrophorétique [6]. Les perfectionnements de cette méthode, avec l'usage de supports ayant un haut pouvoir de résolution (surtout l'amidon) et de réactifs permettant la dispersion moléculaire de constituants fortement liés entre eux (surtout l'urée en solution concentrée), ont conduit à la distinction d'un grand nombre de fractions, jusqu'à 20 [7]. Les méthodes modernes de chromatographie sur colonnes d'échangeurs d'anions ont également fait proliférer les espèces de caséine [8, 9].

Des remarques générales peuvent conduire à la simplification envisagée :

1) Le nombre d'espèces protéiques constituant la caséine entière n'est, sans doute, pas égal à la somme des bandes ou des pics observés dans les examens électrophorétiques ou chromatographiques. Les écarts constatés dans les nombres de fractions trouvées par divers chercheurs ne reflètent pas simplement les différences de sensibilité des méthodes suivies. Des perturbations dans les migrations ou des répartitions anormales peuvent se produire du fait d'interactions protéine/protéine, protéine/support ou protéine/tampon, d'effet de sels dans les solutions tampons complexes et de modifications de constituants fragiles par un réactif ou par l'action de conditions expérimentales défavorables.

2) Certaines fractions représentent plusieurs formes d'une même espèce protéique ; ce sont des variants génétiques. Les différences très minimes, qui les séparent à peine sur le plan chimique, suffisent à leur conférer des propriétés physiques distinctives, surtout en ce qui concerne la mobilité électrophorétique.

3) En ce qui concerne les fractions isolées, soit par précipitation, soit par chromatographie, les auteurs ont parfois créé trop hâtivement une dénomination nouvelle, en étudiant des fractions dont l'homogénéité n'était pas solidement établie ou en insistant sur des différences analytiques moins importantes que les analogies de composition ou de propriétés. Il est bien probable que, dans plusieurs cas, on se trouve devant des préparations d'une même protéine, à des degrés de pureté différents.

4) La dénomination générique de « caséine » ne devrait pas être utilisée pour toutes les protéines inclues dans le précipité à pH 4,6-4,7. Certaines sont solubles dans cette zone de pH, lorsqu'elles sont isolées.

Compte tenu de ces observations, nous avons réparti les consti-

TABLEAU I

Constituants	Variants génétiques	Proportion p. 100	Poids moléculaire	pHi (1)	Solubil. + 0,03 M Ca		Phosphore p. 100	Cystine p. 100	Glucides p. 100	Similitudes
					à					
					4°	25°				
A. Protéines phosphorées à caractère acide : caséines										
1. Caséine α_s	A B C	40	16 500 — 27 000	4,7 — 4,4	—	—	1,0	0 (?)	0	$\alpha_1 - \alpha$ $\alpha s1 - \alpha s2$
2. Caséine β	A B C	30	18 000 — 25 000	4,9	+	—	0,6	0	0	
3. Caséine κ	?	15	60 000	5,1 — 3,7	+	+	0,2	1,4	5	α_3
4. Constituants mineurs :										
a) accomp. α_s		5			—	—				
b) accomp. κ (caséine λ)		3			+	+	1,2			« m » - α_2
		93								
B. Protéines à point isoélectrique élevé : impuretés										
1. « Caséine » γ	A B	3	30 000 (?)	6,4			0,1			globulines
2. Protéine rouge . . .	}	4	86 000	7,8			0,2 (?)	5	7	trans- ferrine
3. Lactolline			43 000	8,0			0	1	0	
4. Enzymes (protéase, etc.)		traces								

(1) Point isoélectrique ; lorsqu'il y a deux nombres, le premier correspond au minimum de solubilité en l'absence de sels (point isoionique).

tuants connus de la caséine entière en deux groupes ; le tableau I résume cette classification.

A. — Caséines ou protéines phosphorées à bas point isoélectrique

Ces protéines sont synthétisées dans la glande mammaire ; elles constituent la plus grande partie de la caséine entière : environ 90 p. 100.

Les caséines ont un caractère acide marqué du fait d'un net excès des groupes carboxyliques sur les groupes aminés libres et de la présence dans la molécule de radicaux acides forts : phosphorique et, dans un cas, sialique. Elles sont donc électronégatives dans les examens habituels ; elles migrent vers l'anode au cours de l'électrophorèse et elles peuvent être séparées par chromatographie sur un échangeur d'anions, comme la DEAE-cellulose. Elles forment entre elles des complexes relativement stables. Il existe trois sortes bien définies de caséines :

1) Caséine α_s ou caséine « sensible au calcium »

Cette désignation signifie que la caséine α_s , à un pH voisin de la neutralité, est insoluble en présence de 0,03 M d'ions calcium (concentration moyenne en calcium du lait de vache), aussi bien aux températures ordinaires (20°-40°), qu'à basse température (1-5°). La dénomination simple : α serait la meilleure si elle ne prêtait à confusion avec la première fraction de Mellander [6], qui renferme à la fois la caséine sensible et la caséine insensible au calcium ; c'est pourquoi la dénomination : α_s d'après WAUGH [10] est préférable, au moins temporairement.

L'existence de trois variants génétiques a été démontrée [11]. Il est probable que les sous-constituants α_{s1} et α_{s2} [12], correspondent à deux de ces variants. Les caséines α_1 [13] et α_r [14] ne se distinguent de α_s que par de légères différences analytiques, portant principalement sur le phosphore.

La caséine α_s est préparée, à partir de la caséine entière, par précipitation au moyen du chlorure de calcium [10], suivie d'une purification par chromatographie sur DEAE-cellulose [12] ou d'un fractionnement par l'urée [15]. Le poids moléculaire a été mesuré par les méthodes hydrodynamiques, deux valeurs différentes ont été indiquées : 27 000 [12, 16] et 16 500 [17] ; il est difficile d'admettre qu'il s'agit de monomères et de dimères. L'arginine est

le seul acide aminé N-terminal [16, 18] et la tyrosine est C-terminale [12].

La caséine α_s ne contient pas de glucides et la cystine serait absente (19) ; cependant une analyse complète des acides aminés de la caséine α_1 a révélé la présence de 0,2 p. 100 de cystine (20).

La fraction « sensible au calcium » représente environ 45 p. 100 de la caséine entière (12) ; mais par chromatographie sur DEAE-cellulose la proportion du constituant homogène n'est que de 38 p. 100 (9).

2) Caséine β

Elle présente des analogies avec la précédente : son poids moléculaire est du même ordre de grandeur (18 000 [16], 25 000 [21]) ; elle ne contient ni glucides, ni cystine ; elle existe sous trois formes génétiques A, B et C [22]. Par contre, la caséine β n'est « sensible au calcium » qu'au-dessus de 18° ; à basse température, elle reste en solution dans les conditions où la caséine α_s précipite. De plus, la caséine β contient moins de phosphore que α_s ; son point iso-électrique est plus élevé et sa mobilité électrophorétique plus faible. Sa composition et sa structure n'ont encore été que peu étudiées. La purification par chromatographie sur DEAE-cellulose permet d'obtenir une substance homogène [45] ; ce qui n'était pas le cas de l'ancienne méthode de fractionnement à l'urée. La détermination des acides aminés a été effectuée sur une ancienne préparation [23].

3) Caséine κ

C'est, comme les précédentes, une phosphoprotéine à caractère acide ; mais elle en diffère beaucoup par sa composition et ses propriétés. La caséine κ est le constituant « insensible au calcium » ; en présence d'une concentration relativement forte de chlorure de calcium (0,3 M), le complexe formé par les trois caséines est dissocié et seule la caséine κ reste en solution. Sa grande solubilité, sa capacité de stabiliser les autres caséines en présence de calcium et son aptitude à subir seule la réaction primaire de la présure résultent de sa composition particulière.

La caséine κ est une *glycoprotéine* [24] ; elle contient trois composants glucidiques en proportions sensiblement équimoléculaires : galactose, galactosamine et acide N-acétylneuraminique (ou acide 0-sialique). Sa composition en acides aminés a été déterminée [25] ; la proportion des hydroxy-aminoacides est relativement élevée (12,3 p. 100). Il y a donc, dans la caséine κ , une accumulation de groupements OH lyophiles. L'étude de l'action de la présure [24, 26],

de l'hydroborure de lithium [27] et de la callieréine [28] a permis d'élucider certains points de sa structure et un schéma moléculaire provisoire a été établi [27] (1). La séquence C-terminale est (Ser, Ala, Thr) Val-OH ; on n'a pas pu mettre en évidence un acide aminé N-terminal dans les conditions habituelles.

La caséine α contient moins de phosphore que les précédentes ; elle a cependant un point isoélectrique aussi bas, du fait de la présence dans sa molécule de plusieurs résidus d'acide sialique (pK voisin de 2).

On ignore s'il existe des variants génétiques de cette caséine, comme dans le cas des précédentes ; certains faits laissent penser qu'il doit en être de même.

La caséine α peut être préparée par diverses méthodes de fractionnement de la caséine entière : par le calcium et l'alcool [29], par l'acide trichloracétique et l'urée [30], par l'acide sulfurique et l'urée [31]. La purification peut également être atteinte par chromatographie [32].

L'hypothèse a été émise que la caséine α est complexe [32, 33] ; elle serait formée de 3 unités de même poids moléculaire : 16 000, différant entre elles par le contenu en acide sialique et en cystine ; il n'a pas encore été apporté de preuves. Par contre, il est probable que le monomère de caséine α est composé de plusieurs chaînes peptidiques, unies par des liaisons disulfures ; son poids moléculaire doit être voisin de 60 000 [34]. La caséine α est donc la plus grosse molécule du groupe des caséines ; mais c'est aussi le constituant le moins abondant : environ 15 p. 100.

Comme les précédentes, la caséine α est électronégative ; mais elle se comporte différemment dans l'électrophorèse de zone ; elle donne des taches étirées, surtout dans les gels [7]. La valeur du pH pour le minimum de solubilité varie beaucoup selon que les mesures sont faites en présence de sels (point isoélectriques 3,7) ou en l'absence de sels (point isoionique 5,1) [35].

La caséine α_3 [20, 46], ressemble beaucoup à la caséine α .

4) Constituants mineurs

La question se pose de savoir s'il existe d'autres espèces de caséine ? D'après les proportions moyennes que nous avons indiquées dans le tableau I, les trois caséines décrites plus haut forment environ 85 p. 100 de la caséine entière. Dans le reste se trouvent des substances à caractère acide, se comportant comme les caséines ;

(1) *Le Lait*, 1964, 44, 138 et 259

elles représentent environ 8 p. 100 du total et l'on n'est que très mal renseigné sur leur nature ; elles sont de deux sortes :

a) Fraction(s) accompagnant la caséine α_s , pouvant être séparée par chromatographie sur DEAE-cellulose [9] ;

b) Une fraction « insensible au calcium », accompagnant la caséine κ , mais plus difficile à séparer par centrifugation. Les caséines λ [14] et « m » [36], correspondent à cette fraction et la caséine α_2 [13] doit la contenir. La caséine λ serait beaucoup plus riche en phosphore que la caséine κ ; elle ne possède pas le pouvoir stabilisant.

On ne peut actuellement se prononcer sur la nature et la signification de ces constituants mineurs, par comparaison aux précédents.

B. — Protéines à point isoélectrique élevé

Ces protéines ne sont probablement pas synthétisées dans la glande mammaire ; deux d'entre elles présentent des similitudes avec des constituants du plasma sanguin. Du fait de la valeur relativement élevée du point isoélectrique, elles ne se comportent pas comme les caséines dans les examens habituels. De faibles quantités de phosphore ont été trouvées dans trois de ces protéines ; pour l'une d'elle, la lactolline, l'auteur a conclu à une impureté [43] ; il en est peut-être de même pour les autres, car elles sont extraites d'une masse de protéines relativement riches en phosphore ; d'autre part, les protéines plasmatiques auxquelles elles ressemblent ne contiennent pas de phosphore.

En raison de ces propriétés et de la très faible proportion de chacune d'elles, ces protéines peuvent être considérées comme des impuretés des caséines.

1) La « caséine γ » a été un des premiers constituants identifié de la caséine entière [6], mais par la suite on lui a attribué le caractère d'une globuline [37] ; elle ressemble en effet aux globulines immunes, mais ne leur est pas identique [38]. La composition en acides aminés de la « caséine γ » a été déterminée [39] et un poids moléculaire de 30 000 a été indiqué [38] ; mais cette substance se révèle hétérogène au cours des examens physiques. On ne devrait pas la considérer comme une caséine, malgré la présence d'un peu de phosphore ; trop de caractéristiques sont divergentes, surtout le fait qu'elle n'est pas synthétisée dans la glande mammaire, comme l'a montré l'étude par les radio-éléments [40]. Deux variants génétiques ont été observés par électrophorèse [22] ; c'est une protéine pure (holoprotéine).

2) Deux protéines à caractère basique ont été séparées de la caséine entière en abaissant le pH à 4,0. Ces protéines sont insolubles entre pH 7 et 9. L'une d'elles, la « protéine rouge » est une métalloglycoprotéine [41] ; on doit la ranger dans le groupe des transferrines ou sidérophilines, qui peuvent fixer réversiblement un atome de fer ; sa composition a été établie [42]. L'autre protéine basique est la « lactolline » ; elle a été obtenue à l'état cristallisé [43] ; elle est présente dans la caséine en très faible proportion.

3) Différents enzymes sont fortement liés à la caséine, en particulier une protéase [44].

Résumé

Il existe trois espèces bien définies de caséines : α_s , β et κ . Elles sont accompagnées de constituants mineurs mal connus. A côté de ces protéines phosphorylées ayant un caractère acide, d'autres constituants à point isoélectrique élevé se trouvent en faibles proportions dans la caséine entière.

Summary

Whole casein contains three major well studied fractions : α_s , β and κ , and some minor not well defined compounds. Besides these phosphorylated acidic proteins, other fractions with a higher iso-electric point are present in small proportions.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. R. BRUNNER, C. A. ERNSTROM, R. A. HOLLIS, B. L. LARSON, McL. R. WHITNEY et C. A. ZITTLE. *J. Dairy Sci.*, 1960, **43**, 901.
- [2] B. LINDQVIST, *Dairy Sci. Abstr.*, 1963, **25**, 257.
- [3] O. HAMMARSTEN. *Z. Physiol. Chem.*, 1883, **7**, 227 et 1885, **9**, 273.
- [4] T. A. QUÉVENNE, *Mémoire sur le Lait. Ann. d'Hygiène Publique*, Paris, 1841.
- [5] L. LINDERSTROM-LANG et S. KODAMA. *C. R. Trav. Lab. Carlsberg*, 1925, **16**, 1.
- [6] O. MELLANDER. *Biochem. Z.*, 1939, **300**, 240.
- [7] R. G. WAKE et R. L. BALDWIN. *Biochim. Biophys. Acta*, 1961, **47**, 225.
- [8] B. RIBADEAU-DUMAS. *Biochim. Biophys. Acta*, 1961, **54**, 400.
- [9] B. RIBADEAU-DUMAS, J.-L. MAUBOIS, G. MOCQUOT et J. GARNIER. *Biochim. Biophys. Acta*, 1964, **82**, 494.
- [10] D. F. WAUGH et P. v. HIPPEL. *J. Am. Chem. Soc.*, 1956, **78**, 4576.
- [11] M. P. THOMPSON, C. A. KIDDY, L. PEPPER et C. A. ZITTLE. *Nature*, 1962, **195**, 1001.
- [12] D. F. WAUGH, M. L. LUDWIG, J. M. GILLESPIE, B. MELTON, M. FOLEY et E. S. KLEINER. *J. Am. Chem. Soc.*, 1962, **84**, 4929.

- [13] T. L. McMEEKIN, N. J. HIPPI et M. L. GROVES. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1959, **83**, 35.
- [14] J. LONG, Q. VAN WINKLE et I. A. GOULD. *J. Dairy Sci.*, 1958, **41**, 417.
- [15] C. A. ZITTLE, J. CERBULIS, L. PEPPER et E. S. DELLAMONICA. *J. Dairy Sci.*, 1959, **42**, 1897.
- [16] H. A. MCKENZIE et R. G. WAKE. *Austral J. Chem.*, 1959, **12**, 734.
- [17] D. G. SCHMIDT et T. A. J. PAYENS. *Biochim. Biophys. Acta*, 1963, **78**, 492.
- [18] W. MANSON. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1961, **95**, 336.
- [19] D. F. WAUGH, M. L. LUDWIG, P. DREIZEN et R. NOBLE. *Abstr. Intern. Biophys. Congrès*, Stockholm, 1961, p. 197.
- [20] N. J. HIPPI, J. J. BASCH et W. G. GORDON. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1961, **94**, 35.
- [21] T. A. J. PAYENS et B. W. VAN MARKWIJK. *Biochim. Biophys. Acta*, 1963, **71**, 517.
- [22] R. ASCHAFFENBURG. *Nature*, 1961, **192**, 431.
- [23] W. G. GORDON, W. F. SEMMETT, R. S. CABLE et M. MORRIS. *J. Am. Chem. Soc.*, 1949, **71**, 3293.
- [24] C. ALAIS et P. JOLLÈS. *Biochim. Biophys. Acta*, 1961, **51**, 315.
- [25] P. JOLLÈS, C. ALAIS et J. JOLLÈS. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1962, **98**, 56.
- [26] P. JOLLÈS, C. ALAIS et J. JOLLÈS. *Biochim. Biophys. Acta*, 1961, **51**, 309.
- [27] P. JOLLÈS, C. ALAIS et J. JOLLÈS. *Biochim. Biophys. Acta*, 1963, **69**, 511.
- [28] P. JOLLÈS, C. ALAIS et J. JOLLÈS. *C. R. Acad. Sci.*, 1963, **256**, 4308.
- [29] H. A. MCKENZIE et R. G. WAKE. *Biochim. Biophys. Acta*, 1961, **47**, 240.
- [30] H. E. SWAISGOOD et J. R. BRUNNER. *J. Dairy Sci.*, 1962, **45**, 1.
- [31] C. A. ZITTLE. *J. Dairy Sci.*, 1962, **45**, 650.
- [32] R. D. HILL et R. R. HANSEN. *J. Dairy Res.*, 1963, **30**, 375.
- [33] R. BEEBY. *J. Dairy Res.*, 1963, **30**, 77.
- [34] R. G. SWAISGOOD et J. R. BRUNNER. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1963, **12**, 148.
- [35] C. A. ZITTLE et J. H. CUSTER. *J. Dairy Sci.*, 1963, **46**, 1183.
- [36] D. F. WAUGH. *Disc. Faraday Soc.*, 1958, **25**, 186.
- [37] H. HEYNDRIKX et DE VLEESCHAUVER. *Biochim. Biophys. Acta*, 1951, **6**, 487.
- [38] G. K. MURTHY et McL. R. WHITNEY. *J. Dairy Sci.*, 1958, **41**, 1.
- [39] W. G. GORDON, W. F. SEMMETT et M. BENDER. *J. Am. Chem. Soc.*, 1953, **75**, 1678.
- [40] B. L. LARSON et D. C. GILLESPIE. *J. Biol. Chem.*, 1957, **227**, 565.
- [41] M. L. GROVES. *J. Am. Chem. Soc.*, 1960, **82**, 3345.
- [42] W. G. GORDON, M. L. GROVES et J. J. BASCH. *Biochemistry*, 1963, **2**, 817.
- [43] M. L. GROVES, J. J. BASCH et W. G. GORDON. *Biochemistry*, 1963, **2**, 814.
- [44] R. C. WARNER et R. POLLIS. *J. Am. Chem. Soc.*, 1945, **67**, 529.
- [45] J. GARNIER, B. RIBADEAU-DUMAS et G. MOCQUOT. *J. Dairy Res.*, 1964, **31**, 131.
- [46] N. J. HIPPI, M. L. GROVES et T. L. McMEEKIN. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1961, **93**, 245.