Article original

Mise en évidence d' α -lactalbumine glycosylée dans une préparation industrielle d' α -lactalbumine bovine

J.J. Baummy et J. Fauquant

Laboratoire de recherche de technologie laitière, INRA, 65, rue de Saint-Brieuc, 35042 Rennes Cedex, France

(reçu le 18 janvier 1989; accepté le 3 avril 1989)

Résumé — Ce travail met en évidence la présence d' α -lactalbumine glycosylée dans une préparation industrielle d' α -lactalbumine bovine. Les protéines sont séparées par chromatographie de gel filtration sur Sephadex G 50 (Pharmacia) puis ultérieurement identifiées par HPLC. La séparation a permis d'obtenir 4 fractions dont les rapports pondéraux ont été déterminés. La présence d' α -lactalbumine glycosylée a été mise en évidence par des dosages d'acides aminés et par des électrophorèses révélant les glycoprotéines. Une évaluation montre qu'environ 7% de l' α -lactalbumine est glycosylée dans cette préparation.

α -lactalbumine — glycoprotéine — gel filtration

Summary — Evidence for the presence of glycosylated α -lactalbumin in an industrial bovine α -lactalbumin preparation. This work demonstrates the presence of glycosylated α -lactalbumin in an industrial bovine α -lactalbumin preparation. The proteins were separated using Sephadex G 50 (Pharmacia) gel filtration chromatography, then characterized using HPLC. The protein contents of the 4 fractions were calculated. Glycosylated α -lactalbumin was characterized by amino-acids composition and electrophoresis with glycoprotein staining. The amount of glycosylated α -lactalbumin was about 7% of total α -lactalbumin.

α -lactalbumin — glycoprotein — gel filtration

INTRODUCTION

Le lactosérum est un sous-produit laitier, contenant des protéines, qui peut être facilement valorisé à des fins nutritionnelles ou technologiques. Dans le but de préparer des laits maternisés, l' α -lactalbumine est séparée de la β -lactoglobuline par aggrégation et précipitation sous l'ac-

tion combinée d'un abaissement de pH et d'un traitement thermique (Pearce, 1983; Pierre & Fauquant, 1986). Cette précipitation entraîne, outre l' α -lactalbumine, d'autres protéines solubles de poids moléculaire élevé (Sérum Albumine Bovine (SAB), immunoglobulines, etc.), qu'il est possible d'éliminer par tamisage moléculaire (Pierre & Fauquant, 1986). Il a été

montré, par chromatographie de gel filtration, que l' α -lactalbumine contenue dans de telles préparations était hétérogène (Bauby & Brulé, 1988); ce phénomène a aussi été observé dans des préparations commerciales (Kim & Kim, 1986).

L' α -lactalbumine bovine, de poids moléculaire 14 200, possède 2 variants génétiques A et B, se différenciant par un acide aminé; le variant normalement présent dans les troupeaux laitiers européens est le variant B (Lyster, 1972). Chaque variant étudié en chromatographie d'échange d'ions, présente 2 pics qui ne proviennent pas d'une hétérogénéité, mais de l'interaction de la protéine avec les ions NH_4^+ ou SO_4^{2-} du tampon; le rapport de surface des 2 pics dépend des traitements subis lors de la préparation de l'échantillon (Hopper, 1973). Ce comportement chromatographique, qui n'existe pas pour les protéines de lait de toutes les espèces de mammifères (Hopper & McKenzie, 1974), se retrouve dans l' α -lactalbumine humaine (Prieels & Schlusberg, 1977).

Outre cette particularité, l' α -lactalbumine bovine possède 2 formes, dont une glycosylée (Hindle & Wheelock, 1970) comportant 11 à 12 résidus hexoses et présentant une mobilité électrophorétique en milieu alcalin, inférieure à celle de l' α -lactalbumine majeure; les deux protéines ont une activité équivalente dans le système enzymatique de la lactose synthétase (Barman, 1970). Cet auteur a ultérieurement séparé 3 formes d' α -lactalbumine, dont une glycosylée (Barman, 1972). D'autres travaux ont montré la présence, en plus de la protéine majeure, de 3 composants nommés S_1 , S_2 et F (Hopper & McKenzie, 1973), ayant des propriétés immunologiques équivalentes (Préaux *et al.*, 1965); seuls les composants S_1 et S_2 sont glycosylés. La composition en carbohydrates diffère entre les composants et selon les auteurs, mais on note la présence d'hexoses, d'hexosa-

mines, de désoxyhexoses et d'acide sialique (Barman, 1970; Hopper & McKenzie, 1973; Prasad *et al.*, 1980). La liaison de ces résidus sur la chaîne protéique se réalise au niveau de Asn 45 (Hopper & McKenzie, 1973).

Des composants mineurs ont aussi été mis en évidence dans l' α -lactalbumine de chienne, de babouine, de lapine (Quarfoth & Jenness, 1975), de rate (Prasad *et al.*, 1980). Chez la souris, 5 à 10% de l' α -lactalbumine est glycosylée et présente des propriétés immunologiques et une activité de lactose synthétase équivalentes à celles de l' α -lactalbumine majeure (Nagatsuki & Oka, 1980).

L'utilisation d' α -lactalbumine en alimentation infantile nécessite l'obtention d'une protéine de grande pureté. Le produit obtenu par la méthode de Pierre & Fauquant (1986), étant hétérogène, ne répond pas à cette exigence. L'objet de ce travail est de mettre en évidence la présence d' α -lactalbumine glycosylée dans une préparation industrielle d' α -lactalbumine et de la quantifier.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

La préparation d' α -lactalbumine provient d'un essai pilote industriel. La précipitation de l' α -lactalbumine était réalisée à partir de lactosérum de caséinerie, selon la méthode décrite par Pierre & Fauquant (1986); le précipité était séparé par microfiltration puis lavé par diafiltration. Après resolubilisation en milieu basique, l' α -lactalbumine était lyophilisée.

Déterminations analytiques

Chromatographie de gel filtration à basse pression

La séparation des différents constituants protéiques de la poudre, après solubilisation (200 g.l⁻¹) dans le tampon Tris/HCl, a été réali-

sée par chromatographie de gel filtration.
Colonne : L = 140 cm - Diamètre = 4,5 cm;
gel : Sephadex G 50 (Pharmacia);
tampon : Tris 0,02 M - HCl - pH 7,5;
Système de chromatographie basse pression : Pharmacia;
échantillon : 1 g de poudre pour 5 ml de tampon;
débit : 25 ml.h⁻¹;
durée : 17 h;
température : ambiante;
volume des fractions : 4,5 ml;
détection : 280 nm.

Dosage des protéines

La séparation et le dosage des protéines ont été réalisés en chromatographie de gel filtration HPLC (Varian 5000) sur colonne Micropak G 300 SW (30 cm - Varian) avec un tampon Tris/HCl (0,01 M, pH 6,68, débit 1 ml.min⁻¹ - 280 nm). La précision de la méthode est de 5%. Les standards utilisés étaient des protéines (type III, Sigma Chemical Company); les étalons étaient préparés par pesée en tenant compte de leur pureté.

Dosage des acides aminés

Le dosage des acides aminés était réalisé en double selon le protocole de Spackman *et al.* (1958) sur Amino Acid Analyzer Beckman (hydrolyse à 110°C pendant 24 h).

Dosage d'azote

Le dosage d'azote était effectué par la méthode Kjeldhal sur système Kjeltac System 1003 (Tecator).

Détermination de l'extrait sec

L'échantillon (environ 0,5 g de poudre) était déshydraté à 105°C dans une étuve pendant 7 h.

Détermination de la teneur en cendres

L'échantillon était minéralisé pendant 3 h 30 à 530-550°C.

Electrophorèses

La séparation des protéines a été réalisée sur gel de polyacrylamide à pH 8,3, sans SDS et sans urée, selon le protocole décrit par

Andrews (1983). La coloration des glycoprotéines a été effectuée selon la méthode de Kapitany & Zebrowski (1973). La liaison C-C des groupements α -glycol est oxydée par l'acide périodique pour donner un dialdéhyde qui réagit avec le réactif de Schiff pour donner un composé coloré. 150 μ g d'échantillon étaient déposés dans chaque puits.

RÉSULTATS

Composition des poudres

L'extrait sec de la poudre est de 980,9 g.kg⁻¹; sa teneur en protéines (N x 6,38) est de 917,6 g.kg⁻¹; la teneur en cendres est égale à 29,0 g.kg⁻¹. La teneur en α -lactalbumine déterminée par HPLC est de 814,0 g.kg⁻¹; l'intégration regroupe l' α -lactalbumine et l'épaulement qui le précède; cet épaulement correspond à la protéine que nous devons caractériser.

Séparation des différents constituants par chromatographie

La chromatographie de gel filtration à basse pression de l'échantillon a permis de séparer 4 pics. Le chromatogramme correspondant est présenté à la Figure 1. L'identification des 4 pics est réalisée par gel filtration en HPLC par rapport à des étalons témoins (Fig. 2) et par électrophorèse. Le premier pic correspond à des composés de poids moléculaire élevé; le second pic renferme la SAB. Le troisième pic regroupe la protéine indéterminée que nous devons caractériser, de l' α -lactalbumine et des traces de SAB. Le quatrième pic correspond à l' α -lactalbumine majeure.

Les collectes correspondant aux 4 pics ont été regroupées en 4 fractions dont l'extrait sec a été déterminé sur une partie aliquote. Après correction, tenant compte de l'extrait sec du tampon, la répartition pondérale de chaque fraction a été déterminée. Les fractions 1, 2, 3 et 4 renferment respectivement 16,9, 3,7, 9,7, et 69,7% du poids total des protéines éluées dans ces fractions.

Pour la fraction 3, la surface intégrée par HPLC correspondant au composé indéterminé représente 59% de la surface totale intégrée (Fig. 2).

Comparaison des fractions 3 et 4

Les compositions en acides aminés (sauf cystéine) des fractions 3 et 4 sont données dans le Tableau I. Les coefficients de corrélation entre la composition donnée par l'analyse et la composition théorique de l' α -lactalbumine (Eigel *et al.*, 1984) sont de 0,986 et 0,991, pour les fractions 3 et 4.

Fig. 1. Profil chromatographique de la séparation en gel filtration (Sephadex G50 - Pharmacia) de l'échantillon d' α -lactalbumine. Tampon Tris 0,02 M / HCl pH 7,5. Les flèches indiquent le début et la fin de chaque fraction (F) : F1, F2, F3 et F4.

Etude de la fraction 3

Pour confirmer le résultat précédent, nous avons réalisé un second fractionnement par chromatographie de gel filtration de l'échantillon de départ et avons déterminé la composition en acides aminés de différentes fractions individuelles d'éluats de 4,5 ml. Les compositions en acides aminés sont données dans le Tableau II. Les coefficients de corrélation vis-à-vis de la composition de l' α -lactalbumine (Eigel *et al.*, 1984) et les surfaces relatives des 2

Fig. 2. Profil chromatographique HPLC (gel filtration sur colonne Micropak G 300 SW, tampon Tris 0,01 M / HCl pH 6,68) de la préparation d' α -lactalbumine (éch.), de ses fractions F1, F2, F3 et F4 séparées par gel filtration (Sephadex G50 - Pharmacia) et d'un étalon d' α -lactalbumine (α La) et de β -lactoglobuline (β Lg).

Tableau I. Teneur en acides aminés (g pour 100 g d'acides aminés totaux) des fractions 3 (F3) et 4 (F4) séparées par chromatographie en gel filtration (Sephadex G50 - Pharmacia) et composition théorique de l' α -lactalbumine d'après Eigel *et al.* (1984).

	F3	F4	α -lactalbumine
Asp	18,4	18,7	18,4
Thr	5,6	5,4	5,5
Ser	5,1	5,0	4,8
Glu	14,2	14,4	16,5
Pro	3,2	3,1	1,5
Gly	2,8	2,9	3,0
Ala	2,1	1,9	1,8
Val	4,7	4,7	4,6
Met	1,1	1,1	1,0
Ile	6,7	7,1	6,9
Leu	12,3	11,5	11,2
Tyr	4,3	4,4	4,8
Phe	4,6	4,4	4,3
His	3,2	3,2	3,1
Lys	9,8	10,6	11,5
Arg	1,8	1,7	1,1

pics, déterminées par HPLC, sont rassemblés dans le Tableau III. Ces coefficients de corrélation valent 0,987 ou 0,988, quel que soit le rapport de surface des 2 pics correspondant à la protéine indéterminée et à l' α -lactalbumine.

Les électrophorèses, selon Andrews (1983), présentées à la Figure 3 (A) montrent, pour ces fractions individuelles, trois bandes distinctes. La bande qui migre le plus correspond à l' α -lactalbumine majeure. Les 2 autres bandes, qui migrent moins rapidement, correspondent à la protéine indéterminée; elles ont une charge apparente inférieure à celle de l' α -lactalbumine. La coloration spécifique des protéines glycosylées (Fig. 3 (B)) montre 2 bandes situées au même niveau que les protéines indéterminées; leur intensité décroît lorsque la teneur en α -lactalbumine majeure augmente.

Fig. 3. Electrophorèses selon Andrews (1983) (A) révélant les protéines et selon Kapitany & Zebrowski (1973) (B) révélant les glycoprotéines contenues dans un étalon (ét.) et dans les tubes 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50 et 56 de la séparation par gel filtration (Sephadex G50 - Pharmacia). (SAB = Serum Albumine Bovine; α La = α -lactalbumine; α Lag = α -lactalbumine glycosylée).

Tableau II. Teneur en acides aminés (g pour 100 g d'acides aminés totaux) des protéines contenues dans les tubes 40, 44, 46 et 56 séparés par gel filtration (Sephadex G50 - Pharmacia) et de l' α -lactalbumine (Type III - Sigma).

	T 40	T 44	T 46	T 56	α -lactalbumine
Asp	16,5	17,7	18,2	18,9	19,4
Thr	5,4	5,1	4,5	5,5	5,3
Ser	5,1	5,0	4,8	4,7	4,8
Glu	14,6	13,9	13,8	13,5	13,3
Pro	2,8	2,7	3,0	2,6	2,3
Gly	2,8	2,9	2,9	3,0	3,0
Ala	2,1	2,0	2,0	1,9	1,8
Val	4,4	4,6	4,6	4,5	4,2
Met	0,8	0,8	1,3	1,2	1,1
Ile	8,5	8,3	8,1	6,7	6,3
Leu	11,7	11,7	11,5	11,6	11,9
Tyr	4,1	4,3	4,4	4,7	5,0
Phe	4,2	4,3	4,4	4,4	4,5
His	3,2	3,3	3,3	3,3	3,4
Lys	11,7	11,8	11,7	11,8	12,0
Arg	1,7	1,6	1,5	1,3	1,3

DISCUSSION

Les méthodes de séparation de l' α -lactalbumine par chromatographie de gel filtration ont été choisies, car elles permettaient d'éviter le dédoublement du pic

Tableau III. Coefficients de corrélation (r) entre composition en acides aminés des protéines des tubes 40, 44, 46, 56 et composition de l' α -lactalbumine (d'après Eigel *et al.*, 1984). Surfaces du pic indéterminé et du pic d' α -lactalbumine intégrés par HPLC (unités arbitraires).

	r	Surface pic indéterminé	Surface α -lactal- bumine
Tube 40	0,988	176	96
Tube 44	0,987	142	127
Tube 46	0,987	133	155
Tube 56	0,987	0	503
α -lactalbumine (Sigma)	0,984	0	150

correspondant à cette protéine lors de la séparation par échange d'ions (Hopper, 1973).

Les résultats de la répartition pondérale des 4 fractions isolées par chromatographie montrent qu'environ 21% du produit correspond à des protéines autres que l' α -lactalbumine. En additionnant les teneurs correspondant aux fractions 3 et 4, on trouve une valeur de 79,4%, équivalente à celle donnée par HPLC, qui englobe l' α -lactalbumine et la protéine contaminante (81,4%). La fraction 3 n'est pas pure; la surface d'intégration relative à la protéine indéterminée ne représente que 59% de la surface totale. La composition en acides aminés de cette fraction est semblable à celle de l' α -lactalbumine (Eigel *et al.*, 1984). Les coefficients de corrélation entre composition déterminée par l'analyse et composition théorique sont équivalents pour les deux fractions 3 et 4 ce qui tend à prouver que le composé indéterminé est de l' α -lactalbumine.

Ce résultat est confirmé par une étude de la composition en acides aminés des protéines contenues dans les tubes de la fraction 3 collectés individuellement; leur composition est équivalente à celle de l' α -lactalbumine. La mise en évidence de résidus glycosylés sur ces protéines permet de conclure que la protéine indéterminée correspond à différentes formes de glycosylation de l' α -lactalbumine. Les 2 bandes relatives à des protéines glycosylées détectées en électrophorèse et ayant une migration plus lente que l' α -lactalbumine majeure correspondraient aux composants S_1 et S_2 décrits par Hopper & McKenzie (1973).

En HPLC, nous n'avons pas totalement séparé ces 3 composants. Le poids moléculaire (PM) de ces protéines est plus élevé que celui de l' α -lactalbumine majeure. En considérant les temps de rétention en HPLC de la β -lactoglobuline (PM = 18 400) et de l' α -lactalbumine, respectivement égaux à 6,17 et 7,04, et la relation linéaire existant entre $\log(\text{PM})$ et le temps de rétention, il est possible de déterminer le PM de l' α -lactalbumine glycosylée (temps de rétention = 6,57), qui est égal à $16\,300 \pm 400$; la partie glucidique représente environ 13% du poids de la protéine. Ces valeurs sont en accord avec celles de Barman (1970), respectivement égales à 16 800 pour la première et à 15% pour la seconde.

En supposant que les coefficients d'absorption molaire de l' α -lactalbumine et de l' α -lactalbumine glycosylée sont équivalents, l'intégration par HPLC de la fraction 3 donne 59% d' α -lactalbumine glycosylée. Les résultats de la répartition pondérale montrent donc que 7,2% (poids/poids) de l' α -lactalbumine est glycosylée, ce qui correspond à 1,0% (poids/poids) de sucres. Nos résultats sont supérieurs à ceux de Hopper et McKenzie (1973), qui ont montré que les

composants S_1 et S_2 ne représentaient que 3% de l' α -lactalbumine.

Nous avons mis en évidence, dans une préparation industrielle d' α -lactalbumine, la présence de cette protéine sous forme glycosylée. Les 2 types d' α -lactalbumine ont des propriétés physico-chimiques proches qui les rendent difficilement séparables. Des travaux ultérieurs devront confirmer la composition exacte en carbohydrates et comparer les propriétés physico-chimiques de ces 2 protéines.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier M. Piot pour sa participation aux analyses d'acides aminés.

RÉFÉRENCES

- Andrews A.T. (1983) Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins. *J. Dairy Res.* 50, 45-55
- Barman T.E. (1970) Purification and properties of bovine milk glyco- α -lactalbumin. *Biochim. Biophys. Acta* 214, 242-244
- Barman T.E. (1972) The modification of the tryptophan residues of bovine α -lactalbumin with 2-hydroxy-5-nitrobenzyl bromide and with dimethyl (2-hydroxy-5-nitrobenzyl) sulphonium bromide. I. Characterization of the modified protein. *Biochim. Biophys. Acta* 258, 297-313
- Baomy J.J. & Brulé G. (1988) Binding of bivalent cations to α -lactalbumin and β -lactoglobulin: effect of pH and ionic strength. *Lait* 68, 33-48
- Eigel W.N., Butler J.E., Ernstrom C.A., Farrell H.M., Harwalkar V.R., Jenness R. & Withney R. McL. (1984) Nomenclature of protein of cow's milk: fifth revision. *J. Dairy Sci.* 67, 1599-1631
- Hindle E.J. & Wheelock J.V. (1970) Carbohydrates of bovine α -lactalbumin preparations. *Biochem. J.* 119, 14P

- Hopper K.E. (1973) Apparent heterogeneity of bovine α -lactalbumin A and B in DEAE-Sephadex chromatography. *Biochim. Biophys. Acta* 293, 364-370
- Hopper K.E. & McKenzie H.A. (1973) Minor components of bovine α -lactalbumin A and B. *Biochim. Biophys. Acta* 295, 352-363
- Hopper K.E. & McKenzie H.A. (1974) Comparative studies of α -lactalbumin and lysozyme: Echidna lysozyme. *Mol. Cell. Chem.* 3, 93-108
- Kapitany R.A. & Zebrowski E.J. (1973) A high resolution PAS stain for polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 56, 361-369
- Kim J. & Kim H. (1986) Fusion of phospholipid vesicles induced by α -lactalbumin at acidic pH. *Biochemistry* 25, 7867-7874
- Lyster R.L.J. (1972) Reviews of the progress of dairy science. Section C - Chemistry of milk proteins. *J. Dairy Res.* 39, 279-318
- Nagamatsu Y. & Oka T. (1980) Purification and characterization of mouse α -lactalbumin and preparation of its antibody. *Biochem. J.* 185, 227-237
- Pearce R.J. (1983) Thermal separation of β -lactoglobulin and α -lactalbumin in bovine cheddar cheese whey. *Aust. J. Dairy Technol.* 33, 144-149
- Pierre A. & Fauquant J. (1986) Principes pour un procédé industriel de fractionnement des protéines de lactosérum. *Lait* 66, 405-419
- Prasad R., Hudson B.G., Strickland D.K. & Ebner K.E. (1980) The structure of the asparagine-linked carbohydrate unit of rat α -lactalbumin. *J. Biol. Chem.* 255, 1248-1251
- Préaux G., De Weer P., Peirsman E., Tielemans K. & Lontie R. (1965) Concentration à partir du sérum de lait de 3 composants immunologiquement identiques à l' α -lactalbumin. *Arch. Int. Physiol. Biochim.* 73, 154-155
- Prieels J.P. & Schusselberg J. (1977) Heterogeneity in α -lactalbumin - I - Human α -lactalbumin. *Biochim. Biophys. Acta* 491, 76-81
- Quarfoth G.J. & Jenness R. (1975) Isolation, composition and functional properties of α -lactalbumins from several species. *Biochim. Biophys. Acta* 379, 476-487
- Spackman D.H., Stein W.H. & Moore S. (1958) Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino-acids. *Ann. Chem.* 30, 1190-1206