

## MÉMOIRES ORIGINAUX (1)

### TRAVAUX BIOCHIMIQUES ET BIOPHYSIQUES RÉCENTS SUR LA STRUCTURE ET LA CONSTITUTION DES CASÉINES

par

Z. ZELTER  
Ingénieur Docteur

(Fin.)

#### DEUXIÈME PARTIE

#### HÉTÉROGÉNÉITÉ DE LA CASÉINE

##### I. Historique

Pendant une quarantaine d'années, la plupart des auteurs admettaient la thèse du physiologiste suédois HAMMARSTEN [21] qui, invoquant les propriétés remarquablement constantes de la caséine séparée du lait de vache par précipitations répétées aux acides, affirmait que cette substance était un protéide homogène. En 1918 toutefois, OSBORNE et WAKEMAN [48] constatent, que le précipité de caséine purifié par de l'alcool à chaud, procure une substance dont la composition élémentaire diffère beaucoup du protéide décrit par HAMMARSTEN, et mettent les premiers en défaut la conception de ce dernier auteur. Ce fait semblait donc réhabiliter la suggestion formulée vers 1880 par DANILEVSKI et RADENHAUSEN, suggestion fortement critiquée par HAMMARSTEN [21] et selon laquelle la caséine de lait de vache était constituée par un mélange d'au moins deux composants distincts.

##### A. Preuves de l'hétérogénéité de la caséine par fractionnement à l'aide d'agents chimiques.

C'est au cours des années 1925-1929 que LINDERSTRØM-LANG et KODAMA [34] réussissent, au cours de leurs recherches fondamentales sur la caséine, le fractionnement systématique de ce protéide en plusieurs parties, par l'emploi d'alcool à 70° légèrement acidifié avec de l'acide chlorhydrique. Ces auteurs démontrent en effet que la solubilité de la caséine dans le mélange ethanol-HCl en présence de chlorure de sodium et à température et concentration égales, était dépendante de la quantité de produit mise en œuvre.

Ils parviennent ainsi à dissocier la caséine en plusieurs fractions

(1) Reproduction interdite sans indication de source.

se distinguant entre elles par leur solubilité, par leur vitesse de coagulation, par leur pouvoir neutralisant vis-à-vis des bases, ainsi que par la teneur en phosphore et en acides aminés de leurs produits d'hydrolyse.

Faisant valoir que, non seulement le traitement par un mélange ethanol-HCl n'accroît pas le taux de l'azote formol, mais encore que la réunion des fractions de caséine ainsi isolées, donnent un produit possédant toutes les caractéristiques du protéide primitif, LINDERSTRØM-LANG et KODAMA écartent l'hypothèse de l'action dénaturante possible des réactifs employés. Ils concluent donc à l'hétérogénéité de la caséine, en faisant observer que c'est l'impossibilité de dissocier cette substance en ses constituants éventuels, par la simple technique de précipitations répétées dans des conditions invariables, qui a faussé la thèse de l'homogénéité de HAMMARSTEN.

La théorie de la non homogénéité de la caséine a été corroborée très peu de temps après par la technique de l'ultra-centrifugation [64], qui a permis de constater, que la substance en question est formée d'un mélange de micelles dont le poids moléculaire varie de 75.000 à 375.000, alors qu'une de ses fractions isolée par le procédé de LINDERSTRØM-LANG se présentait comme un corps homogène de poids moléculaire constant (375.000). CARPENTER et HUCKER [3] obtiennent, à partir d'une caséine dissociée au moyen d'alcool à 70° et d'oxalate de potassium, trois fractions distinctes par leurs poids moléculaires respectifs de 75.000, 188.000 et 375.000, et caractérisées par des différences sérologiques.

De nombreux chercheurs ont tenté, depuis, le fractionnement de la caséine, le plus souvent à l'aide de solutions salines.

En 1932, CHERBULIEZ et SCHNEIDER [4] étudient l'action dissolvante exercée par divers sels neutres sur la caséine et observent que, parmi ceux-ci, le chlorure d'ammonium en dissout le plus. Viennent ensuite, dans un ordre décroissant : le sulfate de magnésium, les sels de mercure, le chlorure de sodium, puis le sulfate d'ammonium dont les propriétés de solubilisation sont très réduites.

La technique de fractionnement de la caséine par du chlorure d'ammonium mise au point par ces auteurs, s'applique comme voici : 5 grammes de caséine sont agités dans 500 cm<sup>3</sup> d'une solution de chlorure d'ammonium à 5% ; après centrifugation, la partie soluble est décantée et additionnée de 1.800 cm<sup>3</sup> d'acétone ; le précipité volumineux et incolore qui se forme est alors purifié par redissolution dans du chlorure d'ammonium, suivie d'une reprécipitation. La substance ainsi obtenue est désignée comme étant la fraction de caséine  $\alpha$ . Le culot de centrifugation purifié à son tour fournit la fraction de caséine  $\beta$ .

Les auteurs de cette technique affirment, à la suite de leurs recherches, que la caséine est composée d'au moins deux constituants accusant des propriétés distinctes. La fraction  $\alpha$  insoluble dans les solutions salines se rapproche par ses caractéristiques de la caséine primitive, dont elle forme les 8/9<sup>e</sup> à 4/5<sup>e</sup> parties ; la fraction  $\beta$  soluble dans les solutions de chlorure d'ammonium, se différencie nettement de la première, non seulement par sa solubilité, mais également par sa teneur en P et en S. Le rapport approximatif de  $\beta/\alpha$  trouvé par ces auteurs est de 1/8. La stabilité de ces fractions, leur teneur en azote formol et leur composition élémentaire (P et S exceptés) autorisent à croire qu'ils ne sont pas des produits d'hydrolyse.

Mais ces composants ainsi isolés sont-ils homogènes ? CHERBULIEZ et MEYER [5] améliorent le précédent mode opératoire par adjonction d'un traitement à l'acide chlorhydrique 0,1N, qui amène la solution de caséine au *pH* isoélectrique de 4,6. Ceci entraîne la formation d'un flocculat qui, séparé par centrifugation, lavé à l'acétone et à l'éther, puis séché, est désigné par  $\alpha I$ . Le filtrat traité par de l'acétone purifié, produit un second précipité qui, séparé par centrifugation, est dénommé  $\alpha II$ . L'addition au second filtrat de HCl/0,1 N précipite la fraction  $\gamma$  séparée également par centrifugation. Le dernier filtrat enfin, laissé en contact avec de l'acétone pendant vingt-quatre heures, abandonne une dernière fraction, la caséine  $\delta$ .

Toutes ces fractions purifiées par dissolution et précipitations répétées, se différencient par leurs propriétés physiques et surtout par leur teneur en P et en S qui, d'après les auteurs, seraient les suivantes :

Fractions	$\alpha I$	$\alpha II$	$\gamma$	$\delta$
P % .....	0,65	0,55	0,69	1,93
S % .....	0,78	0,70	0,51	0,26

Les produits d'hydrolyse de ces divers constituants seraient caractérisés par des concentrations décroissantes en arginine allant de  $\alpha I$  à  $\gamma$ . Parmi ces quatre constituants de la caséine, la fraction  $\alpha II$  serait porteuse des propriétés de coagulabilité par la présure.

Quelques années plus tard cependant, CHERBULIEZ et JEANNERAT [6] reconnaissent que la fraction  $\delta$  n'est autre chose que la protéose de HAMMARSTEN, avec laquelle elle présente des propriétés chimiques et physiques absolument identiques. Mais en 1950, CHERBULIEZ et BAUDET [7] recourant cette fois à la technique de purification par sédimentation isoélectrique mise au point par WARNER [71], obtiennent à nouveau quatre fractions distinctes de

caséine :  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$  formant respectivement 60%, 25%, 10% et 5% du protéide global. La présure n'aurait pas d'action sur les constituants  $\beta$  et  $\gamma$ , qui se retrouveraient tels quels dans le coagulum.

GROH et Collaborateurs [19] partant de lait de vache, puis KONDO et YAMADA [30] utilisant du lait de chèvre, n'obtiennent cependant que deux fractions  $\alpha$  et  $\beta$  à partir d'une caséine solubilisée dans de l'urée et traitée à l'alcool, les deux constituants ainsi isolés se distinguant par leur teneur en certains acides aminés, en azote et en phosphore.

La plupart des techniques de fractionnement ayant recours à des agents chimiques de précipitation, susceptibles d'exercer une action dénaturante sur la caséine, on était en droit de se demander si la plupart des fractions isolées n'étaient pas simplement le résultat d'une dissociation hydrolytique du protéide original. Ce sont les techniques d'électrophorèse utilisées depuis 1937 qui ont permis de démontrer sans conteste, à la fois l'hétérogénéité réelle de la caséine, et prouver, grâce aux récentes recherches de HOSTETTLER et RYCHENER [23] qu'on ne se trouvait pas en présence d'un processus d'hydrolyse. Ces auteurs ont en effet réussi la reconstitution parfaite d'une solution aqueuse colloïdale de caséine, à partir des composants purifiés et non altérés qui, séparés par centrifugation, présentaient des frontières nettement délimitées sur le diagramme électrophorétique.

#### B. Preuves de l'hétérogénéité de la caséine par fractionnement à l'aide de sédimentation isoélectrique.

Examinant en 1939, pour la première fois, de la caséine de lait de vache dans l'appareil de TISELIUS [67], MELLANDER [37] confirme l'hétérogénéité de la substance préparée par la technique de LINDERSTRÖM-LANG. Le diagramme électrophorétique enregistré par l'auteur en présence d'un tampon de phosphate, est en effet caractérisé par la présence de trois pics, correspondant à trois fractions distinctes par leur vitesse de migration. Classées dans un ordre de mobilité décroissante, ces fractions sont désignées par l'auteur sous le vocable de caséines  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ .

La fraction  $\alpha$ , la plus mobile, isolée dans l'appareil d'électrophorèse, contenait davantage de P que la caséine originelle. Sa plus grande mobilité a été attribuée à une plus forte charge négative provenant de sa concentration plus élevée en phosphore.

MELLANDER n'est toutefois pas parvenu à isoler électrophorétiquement, par la même occasion, la fraction  $\beta$  à l'état pur, pas plus d'ailleurs que le constituant  $\gamma$  dont la concentration dans la solution était trop faible. WARNER [71] toutefois, doute de l'existence de cette dernière fraction, qui présente à peine 4% de la caséine

globale. Il l'attribue à des interactions entre constituants  $\alpha$  et  $\beta$ , qui formeraient des complexes que nous étudierons plus loin. Pour ce dernier auteur, la caséine ne renferme en réalité que deux composants : la caséine  $\alpha$  figurant pour 80,7% dans le protéide global et la caséine  $\beta$  qui y est présente pour 19,3%.

L'existence possible de complexes  $\alpha$ - $\beta$  implique nécessairement des techniques de fractionnement et de purification particulièrement étudiées, assurant l'isolement de fractions parfaitement homogènes se prêtant à une étude précise de leurs propriétés physico-chimiques.

C'est l'exposé de ces nouvelles méthodes de fractionnement mises au point récemment que nous aborderons maintenant.

## II. Récentes techniques de fractionnement et de purification de la caséine et de ses constituants.

Considérant que l'homogénéité des constituants de la caséine, isolés par les techniques usuelles, n'est point prouvé avec certitude, WARNER [71] entreprend une étude critique du fractionnement, effectué selon ces méthodes, en soumettant les composants ainsi séparés à un examen électrophorétique. Il constate alors que les fractions  $\alpha$  et  $\beta$  caséines obtenues, soit par le procédé de LINDERSTRØM-LANG, soit par celui d'OSBORNE et WAKEMANN, soit encore par les techniques de CHERBULIEZ ou de GROH, accusent des différences de composition considérables, plus particulièrement dans les teneurs en phosphore, en tyrosine et en tryptophane. Il attribue ces différences à trois causes : 1°  $\alpha$  et  $\beta$  caséine sont toutes les deux de nature composite ; il se pourrait donc que certains procédés mènent à un fractionnement de l'un ou de ces deux constituants ; 2° quelques-unes des techniques usuelles exercent une action dénaturante dont il pourrait résulter une légère hydrolyse de la caséine primitive et 3° toutes les préparations de caséine, exceptées celles traitées par la chaleur et par l'alcool, contiennent de la protéase qui hydrolyse lentement la caséine en produisant un grand nombre de fragments non dialysables, qui sont électrophorétiquement distincts.

Il constate, d'autre part, que les constituants isolés par la méthode de LINDERSTRØM-LANG se trouvent à la limite entre fractionnement et purification, et qu'il est possible d'extraire du filtrat d'une précipitation isoélectrique de caséine, effectuée à basse température, une certaine quantité de substances dont le rapport moyen P/N = 0,046 se trouve être celui de la  $\beta$ -caséine. Ceci permet à l'auteur de supposer, que durant la fragmentation de la caséine, des fractions quantitativement petites peuvent prendre

naissance par des voies différentes et échapper à l'isolement, étant donné leur solubilité relative dans l'alcool.

S'inspirant de ces considérations, Warner réussit en 1944 la mise au point d'une nouvelle technique de fractionnement et de purification de la caséine et de ses constituants. Cette technique, qui tire parti de la solubilité plus grande de la caséine  $\beta$  à  $pH$  4,2 et à basse température, élimine les risques d'altération du protéide et procure deux fractions  $\alpha$  et  $\beta$  absolument pures. Le mélange de ces deux substances en proportions convenables permet de reproduire avec fidélité le diagramme électrophorétique de la caséine globale, malgré la nature composite de cette dernière. L'examen électrophorétique de la caséine globale se fait dans un tampon de phosphate au  $pH$  6,98, tandis que celui du degré de pureté des fractions s'effectue avec un tampon de véronal.

#### A. Technique de Warner (71).

La grande importance de cette technique nous incite à la décrire succinctement :

##### 1° Préparation de la caséine :

Du lait de vache prélevé à la traite et non pasteurisé est additionné de toluène et porté immédiatement à 2° C. Toutes les opérations s'effectuent à cette même température dans une chambre froide. Le lait est écrémé et la caséine précipitée au  $pH$  4,6 par addition de  $HCl/0,1$  N. Le lait acidifié est dilué avec de l'eau glacée. Le précipité de caséine lavé six fois et recueilli par décantation, est dissous au  $pH$  6,5 dans de la soude. La solution est lavée deux fois avec de l'éther, puis diluée jusqu'à obtention d'une concentration de 0,5%, et la caséine reprécipitée par du  $HCl/0,01$  N. Le précipité est alors lavé avec de l'eau, puis séché avec de l'alcool et de l'éther. On l'étale ensuite sur une plaque de verre et on la laisse à la température ambiante pour vingt-quatre heures, afin de faire évaporer l'éther et obtenir une caséine à un taux d'humidité constant, état dans lequel elle est soumise au fractionnement.

##### 2° Isolement et purification de la caséine $\alpha$ :

Le précipité humide de la caséine est dissous dans suffisamment de  $NaOH$  pour aboutir à une solution de 1% au  $pH$  6,5. Après agitation mécanique, on ajoute rapidement du  $HCl/0,05$  N pour amener le  $pH$  à 3,5. Le précipité formé se redissout très rapidement pour donner une solution opalescente, qui est aussitôt refroidie à 2° C. et diluée à une concentration de 0,2-0,3% de protéine. On agite mécaniquement et on ajoute goutte à goutte du  $NaOH/0,01$  N. Il se forme un précipité au voisinage du  $pH$  4,2. On continue à ajouter la solution sodique jusqu'à éclaircissement du liquide

surnageant, phénomène qui se produit au  $pH$  4,4-4,5 lors de la première précipitation et à un  $pH$  légèrement plus bas au cours des précipitations suivantes. Le précipité est à nouveau dissous dans du  $NaOH$  et on recommence les opérations. Six précipitations successives sont normalement nécessaires pour éliminer totalement la fraction de caséine  $\beta$ . Après la dernière précipitation, la caséine  $\alpha$  est dissoute dans du  $NaOH$ , reprécipitée au  $pH$  4,5 et à  $2^{\circ}$  par du  $HCl$ , dans une solution concentrée à 0,2%. Le précipité soigneusement lavé avec de l'eau est séché avec de l'alcool et de l'éther. Les purifications successives de la fraction  $\alpha$  sont suivies au moyen d'examen électrophorétiques répétés, et le pourcentage de la caséine  $\beta$  non encore éliminé se déduit de la partie du diagramme descendant.

### 3° *Isolement et purification de la caséine $\beta$ :*

On précipite le protéide résiduel contenu dans les filtrats provenant des purifications successives de la fraction  $\alpha$  par chauffage à la température ambiante. L'examen électrophorétique révèle la présence dans le précipité, non seulement de caséine  $\alpha$ , mais également d'une autre substance (« contaminant ») de faible concentration et dont la mobilité est inférieure à celle de la caséine  $\beta$ . Il est par conséquent indispensable d'éliminer ces deux constituants, pour aboutir à une fraction  $\beta$  complètement purifiée. L'opération est relativement aisée, du fait que la caséine  $\beta$  est soluble à  $2^{\circ} C.$  et au  $pH$  4,9 en absence de sel, tandis que la caséine  $\alpha$  et le « contaminant » le sont beaucoup en présence de sel.

Le mode opératoire consiste donc à dissoudre les résidus bruts de caséine  $\beta$  provenant des premiers 3-4 filtrats avec du  $NaOH$ , pour obtenir au  $pH$  6,0 une solution de 0,2%. La solution est refroidie à  $2^{\circ}$  et on ajoute goutte à goutte, tout en agitant, du  $HCl/0,01N$  froid. Au  $pH$  4,9, il se forme un précipité qui est recueilli par filtration et redissous par du  $NaOH$ , fournissant ainsi une solution à 0,03%. Cette dernière, amenée à  $2^{\circ}$  et au  $pH$  4,5, est traitée par du  $HCl$ , et le précipité formé (cas.  $\alpha$ ) éliminé. Le filtrat est réchauffé à la température ambiante et on dissout le précipité qui se forme avec du  $NaOH$  pour obtenir une solution de 0,5%. On reprécipite comme précédemment à  $2^{\circ}$  et au  $pH$  4,9. Le précipité caséine  $\beta$  pure ainsi formé est alors lavé à l'eau et séché par de l'alcool et de l'éther.

La première et la troisième précipitations éliminent la substance contaminante, et la seconde la caséine  $\alpha$ . Ces manipulations entraînent des pertes importantes de caséine  $\beta$ , de sorte que le rendement est d'environ 40 à 50%.

## B. Techniques de Hipp et Collaborateurs (22).

Arguant que le procédé WARNER est fastidieux et ne permet pas l'obtention d'importantes quantités de constituants de caséine, HIPPI et Collaborateurs parviennent à mettre au point (1950-1952) deux autres méthodes de fractionnement. Celles-ci permettent d'isoler trois fractions pures de  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  (la dernière de ces fractions correspond au « contaminant » de WARNER), que contiendrait, selon les auteurs, la caséine globale; dans les proportions respectives de 75 %, 22 % et 3 %.

Ces deux nouveaux procédés s'inspirant à la fois de la technique de WARNER et de celles citées antérieurement, nous nous bornerons à en indiquer ici seulement les principes.

### 1° *Technique de fractionnement avec un mélange d'alcool + eau :*

La méthode est basée sur le fait que la solubilité de la caséine isoélectrique est maximum lorsque la concentration d'éthanol dans l'eau est de 50 %. Les fractions  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  ayant, dans ce mélange et en présence d'acétate d'ammonium, des propriétés de solubilité distinctes, leur séparation et purification, vérifiées par électrophorèse, réussissent parfaitement grâce à des variations de température (32° C. à 2° C.) et de pH (4,5 à 7,6).

### 2° *Technique de fractionnement avec des solutions aqueuses d'urée :*

Le procédé est fondé sur les différences de solubilité des constituants de la caséine, dans des solutions aqueuses d'urée dont on fait varier la concentration, différences signalées depuis longtemps par GROH [19]. Une concentration d'urée de 4,6 molécules insolubilise la fraction  $\alpha$ . La concentration du filtrat en urée est alors ramenée à 1,7 molécule par une addition d'eau, ce qui entraîne la précipitation de la fraction  $\beta$ . Une dilution du nouveau filtrat avec de l'eau ou par du  $(\text{NH}_4) \text{SO}_4$  permet de récupérer la caséine  $\gamma$ . Les manipulations peuvent se dérouler à la température ambiante. Le procédé paraît par conséquent relativement simple. Il n'est toutefois pas très rapide.

## III. Etude du comportement électrophorétique de la caséine et de ses constituants

### A. Comportement de la caséine de lait de vache.

Nous avons déjà signalé que, lors d'un premier examen du diagramme électrophorétique de caséine de lait de vache, MELLANDER (1939) a observé trois sommets caractéristiques désignés par lui de fractions  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . Mais, après avoir réussi à isoler la dernière de ces fractions, dont la concentration dans la caséine

atteint à peine 4%, WARNER (1944) doute fort qu'elle corresponde à un sommet bien déterminé, prouvant l'existence réelle d'un troisième constituant.

Selon ce dernier auteur, l'aspect du diagramme descendant de la caséine globale examinée en présence d'un tampon de véronal à  $pH$  7,78, est analogue à celui observé en présence d'un tampon de phosphate. Toutefois, la zone  $\alpha$  du diagramme ascendant, d'une solution de caséine à 0,6% en milieu tamponné au véronal, semble présenter deux sommets dont la vitesse de migration décroît dans la mesure où la concentration de la solution augmente, les deux sommets se confondant en un seul lorsque la dite concentration dépasse 1%. La caséine  $\alpha$  purifiée présente une image identique. Notons cependant qu'en présence d'un tampon de phosphate, MELLANDER n'observe pas de tel phénomène. HIPP [22], qui ne remarque pas non plus cette scission du sommet d'une caséine  $\alpha$  extraite d'un mélange de plusieurs laits, attribue l'observation rapportée par WARNER au fait que ce dernier auteur a utilisé pour ses préparations, du lait provenant d'une ou deux vaches seulement. Signalons en outre que les deux fractions  $\alpha$  et  $\beta$  isolées par WARNER ne sont pas homogènes dans toute la gamme des  $pH$ . La mobilité du constituant  $\alpha$  purifié, enregistrée par l'auteur avec un tampon de véronal de force ionique de 0,1, est de  $6,98 \cdot 10^{-5}$  au  $pH$  7,78; mais en présence de 20% de caséine  $\beta$ , cette mobilité se trouve réduite à  $6,30 \cdot 10^{-5}$ , ce qui indiquerait une interaction entre les deux constituants. Dans les mêmes conditions, celle de la fraction  $\beta$  est de  $3,27 \cdot 10^{-5}$ , et n'est pas influencée par la présence de la caséine  $\alpha$ .

L'étude des diagrammes électrophorétiques de laits de vache que MELLANDER reprend en 1947 [37] amène également cet auteur à douter que le pic  $\gamma$  corresponde à un troisième constituant réel de la caséine, étant donné que l'accroissement de la force ionique du tampon ne réduit guère ce sommet, dont la mobilité est très lente et presque indépendante de la concentration en ions H.

Signalons incidemment que NITSCHMANN et LEHMANN [43] rapportent que le comportement électrophorétique d'une caséine précipitée par les acides et d'une caséine-présure diffère très sensiblement en présence de véronal. Dans des solutions sodiques de caséine-présure (à  $pH$  7,3), le pic du gradient  $\alpha$  de la zone ascendante du diagramme se scinde en deux après un certain temps, alors que le sommet de la fraction  $\alpha$  d'une caséine-acide reste indivise. Le rapport du sommet  $\alpha_1$  plus mobile à celui de  $\alpha_2$  plus lent, serait de 0,9 : 1.

#### B. Comportement comparé des caséines de lait de vache et de femme.

L'étude en a été faite par MELLANDER [37]. L'auteur constate

que la caséine humaine renferme également deux fractions  $\alpha$  et  $\beta$  et que, dans la zone alcaline, par rapport au point isoélectrique, les diagrammes de lait de vache et de lait de femme ne présenteraient pas de différence. Dans la zone acide cependant, le pic  $\beta$  de la caséine de vache apparaît moins développé et très diffus. Le fait, qui ne se remarque pas sur le diagramme de lait humain, pourrait résulter d'une formation de complexes  $\alpha$ - $\beta$  dans le premier cas.

Dans la zone alcaline, la fraction  $\alpha$  de lait de vache paraît posséder plus de mobilité que celle de lait humain. L'image se trouve inversée dans la zone acide. Il n'a pas été observé de différences de mobilité entre les fractions  $\beta$  des deux caséines. Les différences de mobilité entre les fractions  $\alpha$  et  $\beta$  de lait de vache sont beaucoup plus prononcées que pour celles de caséine humaine. Ceci rend particulièrement difficile le fractionnement électrophorétique de cette dernière et l'application de la technique de purification de WARNER à celle-ci.

### C. Complexes $\alpha$ - $\beta$ .

A l'exception de ceux de caséine  $\beta$  pure, tous les diagrammes de caséine globale ou de caséine  $\alpha$  purifiée de lait de vache, obtenus par WARNER dans un milieu tamponné avec du véronal, présentaient dans la région descendante de petites zones diffuses. L'image n'avait pas de contrepartie dans la région ascendante de ces diagrammes, qui révélaient cependant une petite zone trouble se déplaçant devant le pic  $\alpha$  avec une mobilité plus réduite.

Un phénomène analogue a été rapporté par MOORE et LYNN [41] qui ont procédé à l'électrophorèse du sérum en milieu également tamponné au véronal.

Or, on sait que KREJCI et ses Collaborateurs [31] ont remarqué en présence d'un tampon de phosphates, l'asymétrie du pic de la fraction  $\beta$  qui est plus grand dans la partie ascendante du diagramme de la caséine globale, que dans celle descendante. Ces auteurs ont interprété cette anomalie comme étant due à une interaction entre constituants  $\alpha$  et  $\beta$ , aboutissant à la formation de complexes.

WARNER, de son côté, étudie le diagramme d'une caséine « reconstituée » par un mélange de 21,6% de caséine  $\beta$  et de 78,4% de caséine  $\alpha$  purifiées. Il constate, à la suite d'un calcul des aires du diagramme, la présence de seulement 15,7% de caséine  $\beta$  libre dans la région descendante, et de 16,4% dans la zone ascendante, quantités nettement inférieures à celles introduites dans les solutions examinées.

L'étude de la mobilité des solutions, dont la concentration en caséine « reconstituée » est maintenue constamment à 0,8%, mais dont les proportions en  $\alpha$  et  $\beta$  étaient variables, montre à WARNER

que la mobilité de la fraction  $\alpha$  (limite de l'aire descendante) se trouve d'autant plus réduite que les mélanges contiennent davantage de  $\beta$ -caséine. Ce dernier constituant possédant une moindre vitesse de migration, on comprend que celle de la fraction  $\alpha$  soit ralentie lorsqu'elle se trouve associée à la  $\beta$ -caséine.

L'auteur admet donc l'existence de complexes  $\alpha$ - $\beta$  et conclut qu'étant donné leur présence, la surface de l'aire des gradients  $\beta$  ne constitue pas une mesure précise de la quantité totale de ce constituant, réellement contenue dans la caséine globale. Les écarts constatés dépendent de la concentration des solutions : la surface relative des gradients  $\beta$  se trouvant d'autant plus réduite que la concentration en caséine s'accroît. De plus, la teneur en  $\beta$  caséine semble décroître avec l'abaissement du  $pH$ .

Cette influence de la concentration des solutions en caséine sur la teneur en  $\beta$ -caséine libre, revêt évidemment une importance toute particulière pour la détermination quantitative des fractions, effectuée par le calcul des aires des diagrammes électrophorétiques. NITSCHMANN et ZÜRCHER [45] viennent de l'étudier tout récemment (1950), sur des solutions de caséine native de lait préparée par le procédé de HAMMARSTEN et dont la concentration variait de 0,3 à 3,8%. Leurs recherches montrent que, plus la concentration est élevée, moins les quantités de  $\beta$  caséine déduites du calcul des surfaces des gradients du diagramme descendant, sont élevées. Ceci résulterait beaucoup moins des anomalies de frontières (« effets  $\delta$  et  $\varepsilon$  ») que de la réversibilité de la formation du complexe  $\alpha$ - $\beta$  qui dépend nettement de la concentration de la solution en caséine globale. Sur le diagramme électrophorétique, la caséine  $\beta$  associée, disparaît nettement dans les gradients de la fraction  $\alpha$ .

#### IV. Constitution et propriétés physico-chimiques des fractions

Les données se rapportant à la composition des constituants de la caséine que l'on trouve dans la littérature antérieure à 1939, sont bien entendu sujettes à caution, la pureté et l'homogénéité des fractions isolées sans examen électrophorétique n'étant pas certaines. Les premiers résultats pouvant être considérés comme valables sont ceux fournis par WARNER en 1944, puis par MELLANDER en 1947.

##### A. Teneur en azote et en phosphore.

Selon WARNER [71], les teneurs en azote des fractions  $\alpha$  et  $\beta$  de caséine de vache, électrophorétiquement pures, sont très semblables. Pour ce qui est de la concentration en phosphore, le constituant  $\beta$  diffère beaucoup plus que le  $\alpha$ , de la caséine globale, leurs

taux respectifs étant de 0,60%, 0,99% et 0,86%. Cette composition est un peu plus élevée que celle rapportée par MELLANDER en 1947 et que voici :

	Caséine globale	Caséine $\alpha$
N% .....	15,19	15,60
P% .....	0,78	0,89

La fraction  $\alpha$  de caséine humaine contiendrait plus de P que celle de lait de vache.

La teneur en serine de la fraction  $\alpha$  de caséine de vache, isolée par la technique de WARNER est beaucoup plus élevée (6,8%) que celle de la caséine primitive (3,5%). Dans tous les cas, le rapport P/N trouvé par MELLANDER est plus bas dans le constituant  $\alpha$  que dans le protéide global. WARNER observe d'ailleurs des rapports analogues.

### B. Composition en acides aminés.

En 1948, HAGBERG et SWANSON [20] signalent que, dans la caséine  $\alpha$ , les concentrations en phosphore total, en acides aspartique et glutamique, ainsi qu'en tyrosine, sont plus élevées que dans la caséine  $\beta$ . Une première étude systématique de la composition des fractions de la caséine, en corrélation avec leurs propriétés physiques, est publiée en 1949 par GORDON et Collaborateurs [18].

Cette étude, effectuée sur des constituants isolés par la technique de WARNER, montre que les fractions  $\alpha$  et  $\beta$ , ainsi que la caséine globale dont elles sont extraites, présentent entre elles des différences considérables de composition en acides aminés, différences qui expliquent leurs propriétés distinctes de solubilité et de motilité électrophorétique.

Les écarts de composition les plus frappants concernent, comme le montrent les résultats ci-après, les teneurs en proline, en tryptophane, en tyrosine, ainsi que la présence dans la fraction  $\beta$  de moins de 0,1% de cystine.

	Teneurs en grammes % de protéide		
	Caséine globale	Caséine $\alpha$	Caséine $\beta$
Proline .....	11,3	8,2	16,0
Cystine .....	0,34	0,43	0,0 - 0,1
Tryptophane .....	1,2	1,6	0,65
Tyrosine .....	6,3	8,1	3,2

Les taux d'histidine, d'acide glutamique, de thréonine et également de N aminé paraissent fort comparables. Les différences en glycine, en isoleucine et en serine, quoique peu sensibles, seraient toutefois significatives du fait qu'elles sont particulièrement pro-

noncées pour la fraction  $\beta$ , qui est le constituant mineur de la caséine.

Selon ces auteurs, la proportion beaucoup plus élevée des groupes apolaires dans la fraction  $\beta$  expliquerait sa plus grande solubilité dans le mélange eau-éthanol. Les différences de mobilité électrophorétique entre  $\alpha$  et  $\beta$  proviendraient de leurs écarts de composition en acides aminés : le nombre plus élevé des groupements ioniques qui caractérise la première de ces fractions étant à l'origine de sa plus grande mobilité, à la fois dans les solutions acides et alcalines, jusqu'au point isoélectrique du protéide.

HIPP et Collaborateurs [22], qui procèdent également à un dosage d'acides aminés dans les fractions  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  isolées et purifiées par leurs propres techniques, notent que la caséine  $\alpha$  est caractérisée par une haute teneur en proline. La faible concentration en phosphore trouvée dans la fraction  $\gamma$  expliquerait la plus grande solubilité de celle-ci dans l'eau.

### C. Volume spécifique apparent.

La détermination directe du volume spécifique apparent de la caséine globale et de ses fractions, a été faite par McMEKIN et Collaborateurs [40], à l'aide du pycnomètre. Les volumes trouvés sont de 0,731 pour la caséine globale, de 0,728 pour la fraction  $\alpha$  et de 0,741 pour la fraction  $\beta$ . La comparaison de ces données mesurées directement avec celles déduites indirectement par le calcul des restes de chaînes amino-acides d'après la composition indiquée par GORDON, montre une concordance très satisfaisante ; ce qui permet aux auteurs de conclure que le volume spécifique apparent d'une protéine est essentiellement déterminé par sa composition en acides aminés.

### D. Propriétés de précipitabilité et de coagulabilité.

NITSCHMANN et LEHMANN [43] pensent que la stabilité du caséinate de calcium est due à l'action de protection colloïdale qu'exercerait un de ses constituants, dont la proportion dans la caséine acide est d'environ 20%. Nous rapprochons cette idée de l'opinion exprimée tout récemment par PYNE [55]. Cet auteur soumet des caséinates  $\alpha$  et  $\beta$  préparés d'après la technique de WARNER, à l'action de la présure. Il remarque que la fraction  $\alpha$  coagule facilement, même à des températures inférieures à 0°, tandis que la caséine  $\beta$  sur laquelle la présure ne semble pas exercer d'action, précipite à partir de 20° et se redissout par refroidissement. PYNE émet par conséquent l'idée que, dans un mélange de deux caséinates exposé à une température dépassant 20°, la fraction  $\beta$  protège la fraction  $\alpha$  contre la coagulation par les ions Ca.

Signalons enfin, pour terminer, que quelques travaux récents ont également été consacrés à l'étude de l'absorption d'eau par les groupements aminés libres de la caséine, ainsi qu'à l'étude du rôle de ces mêmes groupements dans la réaction de la caséine avec les sucres réducteurs. Mais ceci intéresse la conservation des laits en poudre, sujet que nous ne traiterons pas ici.

### Conclusions

La mise au point, durant ces vingt dernières années, de nouvelles techniques de laboratoire telles que l'ultracentrifugation, l'électrophorèse et la microscopie électronique, ont contribué à enrichir énormément nos connaissances concernant la structure et la constitution du protéide phosphoré et soufré qu'est la caséine. Il est donc actuellement permis de dire que :

1° La caséine à l'état natif se présente sous forme de particules sphériques de dimensions variables, et dont le diamètre le plus fréquent se situe entre 90 et 120  $\mu$ .

2° Elle forme dans le lait des complexes avec les éléments minéraux colloïdaux du milieu, plus spécialement avec les ions Ca et P. L'existence de complexes avec d'autres ions n'est pas exclue.

3° Le mode de liaison de la caséine avec le calcium et le phosphore dans le complexe phosphocasinatate de Ca n'est pas connu avec certitude. Cette liaison est-elle purement chimique, physique ou de nature physico-chimique ? Actuellement, il n'est pas possible de formuler une réponse précise sur cette question. Il semble néanmoins probable, par ailleurs, que le phosphore lié au caséinate de Ca se trouve à l'état de sel tribasique et non pas dibasique ; les preuves décisives manquent toutefois pour le moment.

4° L'hétérogénéité de la caséine obtenue par précipitation au point isoélectrique est actuellement une certitude. Elle est un mélange de deux constituants  $\alpha$  et  $\beta$ , dont le rapport est d'environ 4/1. L'existence d'une troisième fraction ( $\gamma$ ) paraît douteuse. Toutefois, si cela était, ce constituant mineur ne représenterait que 4% à peine de la caséine globale.

5° Malgré l'existence de complexes  $\alpha$ - $\beta$  qui gênent le dosage quantitatif de ces deux constituants, dosage déduit du calcul des aires du diagramme électrophorétique, on est parvenu à les isoler à l'état pur, et on a constaté qu'ils possédaient des propriétés physico-chimiques distinctes.

Le rapport P/N est plus élevé dans la caséine  $\alpha$  et plus faible dans la caséine  $\beta$ , que dans la caséine globale. Il existe entre les fractions des différences très nettes dans les teneurs en divers acides aminés, plus particulièrement en proline, cystine, tryptophane et

tyrosine. Ces différences expliquent leurs propriétés distinctes de solubilité et de mobilité électrophorétique (1).

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] N. F. BURK, D. M. GREENBERG. *Journal Biol. Chem.*, 1930, **87**, 197.  
 [2] M. BEAU. *Le Lait*. a) 1933, **13**, 325 ; b) 1941, **21**, 113.  
 [3] D. C. CARPENTIER, G. HUCKER. *Journal Inf. Dis.*, 1930, **47**, 435.  
 [4] E. CHERBULIEZ, M. C. SCHNEIDER. *Helvet Chim. Acta*, 1932, **15**, 597.  
 [5] E. CHERBULIEZ, F. MEYER. *Helvet. Chim. Acta*, 1933, **16**, 600.  
 [6] E. CHERBULIEZ, J. JEANNERAT. *Helvet Chim. Acta*, 1939, **22**, 959.  
 [7] E. CHERBULIEZ, P. BAUDET. *Helvet. Chim. Acta*, 1950, **33**, 398 et 1.673.  
 [8] A. CHANUTIN, S. LUDERWIG, A. V. MASKET. *Journal Biol. Chem.*, 1942, **143**, 737.  
 [9] M. DAMODARAN, B. V. RAMACHANDRAN. *Bioch. Journal*, 1941, **35**, 122.  
 [10] W. L. DAVIES. *Chemistry of Milk* (London), 1939.  
 [11] G. S. DE KADT. *Chem. Weekbl.*, 1939, **36**, 427.  
 [12] G. S. DE KADT, G. VAN MINNEN. *Rec. Trav. Chim. (Pays-Bas)*, 1943, **62**, 257.  
 [13] D. C. DERVICHIAN. *Journal Chim. Phys.*, 1941, **38**, 68.  
 [14] DUCLAUX. *Le Lait*. Etudes chim. et bactériol. (Paris), 1889.  
 [15] J. T. EDSALL. *Advances in colloid. Sci.*, 1942, **1**, 269.  
 [16] H. EILERS, R. N. J. SAAL, M. WAARDEN. *Chem. a Physic. investigation on dairy products* (Elsevier, Amsterdam), 1947.  
 [17] FORD, G. A. RAMSDEL. *XII<sup>e</sup> Congrès Internal. de Laiterie*, Stockholm, 1949, **2**, 17.  
 [18] W. G. GORDON, W. F. SEMMET, R. S. CABLE, M. MORRIS. *Journal Am. Chem. Soc.*, 1949, **71**, 3.293.  
 [19] J. GROH, E. KARDOS, K. DENIS, V. SERENYI. *Z. Phys. Chem.*, 1934, **226**, 32.  
 [20] E. C. HAGBERG, A. M. SWANSON. *Journal Dairy Sci.*, 1948, **31**, 718.  
 [21] O. HAMMARSTEN. *Z. Phys. Chem.* a) 1883, **7**, 227 ; b) 1885, **9**, 273 ; c) 1908, **6**, 18.  
 [22] N. J. HIPPEL, M. L. GROVES, J. H. CUSTER, T. L. McMEEKIN, a) *Journal Am. Chem. Soc.*, 1950, **72**, 4.928 ; b) *Journal Dairy Sci.*, 1952, **35**, 272.  
 [23] H. HOSTETTLER, E. RYCHENER. *XIII<sup>e</sup> Congrès International de Lait*, 1949, **2**, 175.  
 [24] H. HOSTETTLER, E. RYCHENER, L. KÜNZLE. *Landw. Jahrb. Schweiz*, 1949, **63**, 31.  
 [25] H. HOSTETTLER, H. R. RÜEGGER. *Landw. Jahrb. Schweiz.*, 1950, **64**, 670.  
 [26] H. HOSTETTLER, L. IMHOF. *Milchwissenschaft*, 1951, **6**, 351 et 400.  
 [27] W. F. HOFFMANN, R. A. GORTNER. *Journal Phys. Chem.*, 1925, **29**, 769.  
 [28] D. B. JONES, C. E. F. GERSDORF. *Journal Biol. Chem.*, 1934, **104**, 99.  
 [29] I. M. KLOTZ. *Arch. Biochem.*, 1946, **9**, 109.  
 [30] K. KONDO, T. YAMADA. *Journal Chem. Soc. Jap.*, 1937, **13**, 791.

(1) Nous remercions vivement M. G. Mocquot, directeur de la Station Centrale de Microbiologie et de Recherches laitières de l'I.N.R.A., d'avoir bien voulu nous procurer ses conseils éclairés, qui ont facilité la rédaction de cette étude.

- [31] L. E. KREJCI, R. K. JENNINGS, L. D. SMITH. *Journal Frankl. Inst.*, 1941, **232**, 592.
- [32] P. A. LEVENE, D. W. HILL. *Journal Biol. Chem.*, 1933, **101**, 711.
- [33] L. LINDET. *Le Lait*, 1921, **4**, 161.
- [34] K. LINDERSTROM-LANG, S. KODOMA. *Comptes rendus Travaux Labor. Carlsberg*, a) 1925, **16**, n° 1 ; b) 1929, **17**, n° 9.
- [35] E. R. LING. *Dairy Chemistry* (Chapman-London), 1949, p. 31.
- [36] F. LIPMANN. *Bioch. Z.*, 1933, **262**, 3.
- [37] O. MELLANDER, a) *Bioch. Z.*, 1939, **300**, 240 ; b) *Upsala Läkar. Forh.*, 1947, **52**, 107.
- [38] L. MEUNIER. Cours Sorbonne.
- [39] E. F. MELLON, A. H. KORN, S. R. HOOVER. *Abstr. Pop. Am. Chem. Soc.*, 1952 ; n° septembre, p. 48c.
- [40] T. L. McMEEKIN, M. L. GROVES, N. J. HIPPI. *Journal Am. Chem. Soc.*, 1949, **71**, 3.298.
- [41] MOORE et LYNN. Cités par numéro 71.
- [42] B. NICOLS, E. D. BAILEY, G. E. HOLM, G. R. GREENBAUM, E. I. DEXSHER. *Journal Phys. Chem.*, 1931, **35**, 1.303.
- [43] H. NITSCHMANN, W. LEHMANN. *Experientia*, 1947, **3**, 153 et 804.
- [44] H. NITSCHMANN. *Helvet. Chim. Acta*, 1949, **32**, 1.258.
- [45] H. NITSCHMANN, H. ZÜRCHER. *Helvet. Chim. Acta*, 1950, **33**, 1.698.
- [46] H. NITSCHMANN. *Helvet. Chim. Acta*, 1938, **21**, 315.
- [47] H. NITSCHMANN, H. GUGGISBERG. *Helvet. Chim. Acta*, 1941, **24**, 434 et 574.
- [48] T. B. OSBORNE, A. J. WAKEMAN. *Journal Biol. Chem.*, 1918, **33**, 243.
- [49] W. PAULI et E. WALKO. Cités par numéro 16.
- [50] W. PAULI et L. HOFFMANN. Cités par numéro 16.
- [51] K. O. PEDERSEN. *Bioch. Journal*, 1936, **30**, 948.
- [52] S. POSTERNAK, a) *Bioch. Journal*, 1927, **21**, 287 ; b) *Comptes rendus Acad. Sci.*, Paris, 1927, **184**, 306.  
c) S. POSTERNAK, T. POSTERNAK. *Comptes rendus Acad. Sci.*, Paris, 1928, **187**, 313.
- [53] G. T. PYNE. *Bioch. Journal*, 1934, **28**, 940.
- [54] G. T. PYNE. *XII<sup>e</sup> Congrès International de Lait*, 1949, **2**, 231.
- [55] G. T. PYNE. *Chem. Ind.* (London), 1951, **9**, 171.
- [56] G. A. RAMSDEL, E. O. WHITTIER. *Journal Biol. Chem.*, 1944, **154**, 413.
- [57] S. RAPPAPORT. *Biochem. Zeit.*, 1937, **289**, 420.
- [58] C. RIMINGTON, H. D. KAY. *Bioch. Journal*, 1926, **20**, 777.
- [59] J. Roche, M. MOURGUE. *Comptes rendus, Acad. Sc.* (Paris), 1944, 218, 86 et 610.
- [60] A. D. ROBINSON, R. A. GORTNER, L. S. PALMER. *Journal Phys. Chem.*, 1932, **36**, 1.857.
- [61] A. E. SANDELIN. *Meyerit. Alik.*, 1943, **5**, 1.
- [62] M. SORENSEN, M. MAUGAARD. *Comptes rendus Trav. Lab.*, Carlsberg, 1933, **19**, n° 12.
- [63] T. SVEDBERG, K. O. PEDERSEN. *The Ultracentrifuge. Oxf. Univ. Press*, 1948, p. 408.
- [64] T. SVEDBERG, L. M. CARPENTER, D. C. CARPENTER. *Journal Am. Chem. Soc.*, 1930, **52**, 241 et 701.

- [65] M. G. TER HORST. *Neth. Milk Dairy Journal*, 1950, **4**, 246.  
[66] M. G. TER HORST. *Neth. Milk Dairy Journal*, 1947, **1**, 137.  
[67] A. TISELIUS. Cité par numéro 37.  
[68] VAN DEN BURG. Cité par MOCQUOT, IX<sup>e</sup> Congrès International Ind. Agric., Rome, 1952, C. P. 20.  
[69] L. L. VAN SLYKE, A. W. BOSWORTH. *Journal Biol. Chem.*, 1915, **20**, n° 2.  
[70] C. H. VERDIER. *Nature* (London), 1952, **170**, 804.  
[71] R. C. WARNER. *Journal Amer. Chem. Soc.*, 1944, **66**, 1.725.  
[72] R. C. WARNER, E. POLIS. *Journal Am. Chem. Soc.*, 1945, **67**, 529.  
[73] E. G. WEIR, A. B. HASTING. *Journal Biol. Chem.*, 1936, **114**, 397.  
[74] D. W. WOOLLEY, a) *Journal Am. Chem. Soc.*, 1945, **67**, 1.734 ; b) VIII<sup>e</sup> Congrès de Chimie-biologique, Paris, 1948.

## L'EMPLOI DES ULTRA-SONS POUR L'ASSAINISSEMENT DU LAIT (1)

par

le Professeur CORRADO PACI

On sait que le lait, même produit dans les meilleures conditions de milieu ambiant, renferme une riche flore microbienne : 30.000 à 200.000 germes par centimètre cube quand il est récolté proprement, 500.000 à 10.000.000 quand la propreté et l'hygiène sont négligées. Il s'agit soit de germes banaux, soit de germes utiles en fromagerie comme les ferments lactiques, ou industriellement nocifs comme les bacilles *Coli* et les bacilles butyriques, ou souvent même de germes spécifiques de maladies infectieuses transmissibles à l'homme : tuberculose bovine, brucellose, salmonellose, fièvre « Q », etc., qui dans les cas les plus favorables, en raison des toxines produites par ces organismes, augmentent le degré déjà élevé d'instabilité du lait. Le problème de l'assainissement du lait contaminé à l'origine ou au cours du transport, en raison de ses conséquences sur l'alimentation humaine et sur les utilisations industrielles du lait lui-même, représente donc un grand problème économique, hygiénique et social, qui n'a pas encore reçu de solution satisfaisante. L'ébullition (parfois incomplète) à laquelle on a coutume de soumettre le lait avant la consommation, chez l'utilisateur, constitue dans la majeure partie des cas un moyen optimum d'assainissement, mais cela au prix de transformations profondes du produit qui portent un grave préjudice aux caractères organoleptiques et aux très précieuses propriétés biochimiques. La pasteurisation résout en grande partie ce problème, mais au prix d'une dépense excessive et en communiquant au lait pasteurisé un goût caractéristique de « cuit » qui ne plaît pas au consommateur. D'autre part, la pasteurisation n'élimine pas les produits de méta-

(1) *La Clinica Veterinaria*, septembre 1952.