

- [5] F. d'HERELLE. Le bactériophage et son comportement, 160-181. Masson et C^{ie}, Editeurs, Paris 1926.
- [6] H. M. ADAMS. Methods in medical research, vol. II, 12. Julius H. Comroe Editor, Chicago, 1950.
- [7] A. GRATIA. Des relations numériques entre bactéries lysogènes et particules de bactériophage. *Annales Institut Pasteur*, **57**, 652, 1936.
- [8] N. N. POTTER et F. E. NELSON. Effets of calcium on proliferation of lactic streptococcus bacteriophage. II. Studies on plaque formation with a modified technique. *Journal Bact.*, **64**, 105, 1952.
- [9] F. d'HERELLE. *Loc. cit.*, 178-179.
- [10] A. A. NICHOLS et M. HOYLE. Bacteriophage in typing lactic streptococci. *Journal Dairy Research*, **16**, 175-191, 1949.
- [11] R. WAHL et P. LAPEYRE MENSIGNAC. L'identification des staphylocoques par les bactériophages. *Annales Institut Pasteur*, **78**, 352, 1950.

ÉTUDES SUR LA CASÉINE (1)

par

MAURICE BEAU

II. L'homogénéité de la caséine

La revue *Le Lait* a publié, de septembre à décembre 1953, sous la signature de M. Z. ZELTER, un article très complet sur les « Travaux biochimiques récents sur la structure et la composition de la caséine », avec une très importante bibliographie, comprenant 74 références, qui se rapportent surtout à la période de 1925 à nos jours.

D'autre part, M. G. MOCQUOT, Directeur du Laboratoire Central de Recherches laitières, a présenté devant le IX^e Congrès International des Industries agricoles, qui s'est tenu à Rome en 1952, un Rapport très complet concernant les « Conceptions récentes sur la constitution de la caséine ».

Ces deux auteurs donnent chacun un résumé des travaux anciens et récents sur la caséine, et leurs articles seront consultés avec fruit par tous les intéressés. Toutefois, ces articles ne sont généralement que des exposés des travaux effectués et des conclusions, parfois peut-être un peu hasardées, de leurs auteurs. Ils ne contiennent pas de critiques.

C'est pourquoi nous avons pensé faire connaître les réflexions que nous a suggérées la lecture dans les originaux des divers articles en question, notamment sur un point très étudié depuis 1925, et encore discuté à l'heure actuelle. Nous voulons parler de la question de savoir si la caséine est un corps homogène ou au contraire,

(1) *Le Lait*, 1955, —, n° 341-342, 1.

hétérogène, c'est-à-dire formé de deux ou plusieurs autres corps différents, plus ou moins « associés » ensemble d'une manière que d'ailleurs on ignore, qu'il s'agisse d'un simple mélange ou de diverses diverses combinaisons sur lesquelles les hypothèses ne manquent pas.

* * *

Tout le monde sait que le premier travail sérieux qui ait été fait sur la caséine du lait (de vache) est celui du Professeur suédois O. HAMMARSTEN qui, vers 1870, travaillait à Upsala dans les Laboratoires de l'Université de cette ville. Son mémoire original est peu connu parce qu'il a été écrit en suédois et publié dans cette langue dans les comptes rendus des discussions de l'Union des médecins d'Upsala (1).

Ce travail sur la caséine est un modèle du genre et c'est certainement la raison pour laquelle l'auteur est arrivé à des conclusions qui n'ont guère changé depuis, sauf sur le point indiqué ci-dessus, où d'ailleurs on ne peut sans doute pas encore considérer définitivement que HAMMARSTEN se soit trompé.

Cet auteur a considéré de prime abord, et sa conclusion à cet égard a été confirmée par ses propres travaux eux-mêmes, que la caséine était un corps parfaitement homogène, composé d'une seule et unique substance, facile d'ailleurs à préparer par une méthode simple qu'il a alors inventée, la méthode de précipitation par un acide, encore employée à l'heure actuelle, non seulement dans les laboratoires, mais aussi dans l'industrie pour la fabrication des caséines dites « acides », en particulier de la caséine « lactique ».

Ce qu'on retire ainsi du lait est considéré comme étant la « caséine pure », ce qui ne veut pas dire exactement « à l'état où elle se trouve dans le lait », où elle semble être liée physiquement ou chimiquement avec des corps minéraux divers tels que la chaux et l'acide phosphorique, soit isolés, soit combinés entre eux sous forme de phosphate de chaux. Sous cette forme on peut également retirer la caséine du lait au moyen de la présure ; elle entraîne alors avec elle les sels en question et forme ce qu'on appelle la caséine présure du commerce.

Trois choses différencient nettement les caséines acides des caséines présure :

1° Leur mode de préparation est, pour les premières, une *précipitation*, c'est-à-dire que la caséine tombe au fond des vases,

(1) Upsala Lakareföreningens Förhandlingar, 1872-1873. *Om mjölkzthingen och de dervid verksamma fermenterna i magslemhinan*. Cette publication, avec les travaux de Hammarsten, se trouve à Paris, à la Bibliothèque de l'Académie de Médecine.

et, pour les secondes, une *coagulation*, c'est-à-dire que la caséine forme un bloc restant en suspension dans les vases, dont elle occupe tout le volume.

2° Leur teneur en cendres ; les premières n'en contiennent que très peu, d'autant moins que l'action des acides a été plus prolongée et plus intense (la « caséine pure » des laboratoires n'en renferme que des traces), tandis que les secondes contiennent de 7 à 8% de sels minéraux constitués presque exclusivement par de la chaux et de l'acide phosphorique.

3° Leur comportement sous forme de solutions dans la soude diluée : toutes deux se dissolvent dans celle-ci et l'on obtient, dans chaque cas, une solution transparente de caséinate ou paracatéinate de soude. Mais si l'on ajoute du chlorure de calcium, il ne se produit rien au début ; cependant peu à peu les solutions se troublent, mais il faut, pour le caséinate de soude, du temps et des doses élevées pour obtenir la précipitation complète, tandis que, avec la solution de paracatéinate de soude, cette addition amène une précipitation immédiate.

*
* * *

Les idées de HAMMERSTEN ont été universellement adoptées jusqu'en 1925, époque à laquelle le chercheur danois LINDERSTROM-LANG mit en doute l'homogénéité de la caséine.

Opérant tout d'abord (1) sur de la caséine du commerce, secouée dans HCl 0,02 n à $pH = 4,5$, l'auteur trouve que la solubilité, à la même concentration totale de l'acide, diminue quand la quantité de précipité de caséine augmente, ce qu'il explique en disant que le précipité absorbe de plus en plus de HCl.

Il en conclut que la caséine employée consiste en plusieurs différentes substances, ayant des degrés différents de solubilité, et aboutit à considérer que la caséine contient deux groupes de corps, l'un plus, l'autre moins soluble que la caséine non fractionnée ; mais il ajoute qu'il y a pu y avoir des erreurs expérimentales et qu'il y a lieu de voir si l'on obtient les mêmes résultats avec d'autres préparations de caséine.

C'est ce que fait LINDERSTROM-LANG dans un second travail (2), où il part d'une caséine obtenue au laboratoire en traitant le lait écrémé par HCl 0,05 n, puis filtrant et dissolvant le précipité dans NaOH 0,02 n, jusqu'à $pH = 7$, filtrant à nouveau et ajoutant au

(1) K. Linderstrom-Lang et S. Kodoma. Studies on casein. I. On the solubility of casein in hydrochloric acid. Travaux du Laboratoire de Carlsberg. Vol. XVI, 1925.

(2) K. Linderstrom-Lang. Studies on casein. II. Is casein an homogeneous substance ? Même publication, même année, même volume.

filtrat HCl 0,02 n jusqu'à $pH = 4,5$, enfin répétant ces opérations plusieurs fois de suite, comme dans la méthode Hammersten de préparation de la « caséine pure », ce qui donne trois précipités qu'on lave trois fois dans 6 litres de NaCl 0,01 n.

Il obtient ainsi trois caséines qui sont mises en contact avec HCl 0,01 n, le mélange étant secoué pendant 24, 48 ou 72 heures, dans un thermostat à 18° .

L'auteur arrive ainsi à séparer, au point isoélectrique, 4 fractions successives, A,B et D,E et à constater que la solubilité des fractions augmente au fur et à mesure que le phosphore diminue. Il reconnaît toutefois :

- Qu'il est très difficile de séparer les composants les uns des autres ;
- Que, comme précédemment, la solubilité dépend de la quantité de précipité présent ;
- Qu'on n'a jamais de composants purs, car ils sont « associés » les uns avec les autres ;
- Que la moyenne de l'azote titrable au formol pour A et B d'une part, pour D et E d'autre part, n'excède pas le taux de l'azote de la caséine, ce qui lui fait conclure que les qualités des composants sont les mêmes que celles de la caséine, mais ce qui pourrait aussi permettre de conclure que, à part les teneurs en P, il ne s'agit en réalité que de la caséine elle-même.

Comme on le voit, il semble résulter de ces deux travaux une considérable incertitude sur les résultats obtenus et surtout sur les conclusions à en tirer. C'est probablement ce qu'a compris l'auteur, qui, les années suivantes, a repris la question plus en détails, ce qui l'a conduit à la nouvelle étude que voici (1) :

La préparation de la caséine se fait comme ci-dessus, mais sans élutions à la soude, ce qui donne un produit de base K_2O que l'on purifie par des lavages à HCl, la première fois à froid, la seconde, à l'ébullition, 16 fois de suite dans l'alcool chlorhydrique, chaque fois pendant 2 heures, soit au total pendant 32 heures, afin d'obtenir un produit aussi pur que possible. L'auteur avoue que « it is not exactly a mild treatment ». (Evidemment, mais alors que se passe-t-il pendant ce traitement brutal ?)

L'auteur opère ensuite, sur K_2O , une série de traitements à la soude jusqu'à $pH = 4,7$, ce qui précipite 7 fractions différentes, dont voici le tableau :

(3) K. Linderstrom-Lang. Studies on casein. III. On the fractionation of casein. Même publication. Vol. XVII, 1929.

Fractions	% du total	Teneurs en azote %	Teneurs en phosphore %	P/N
K1	3,0	15,49	0,108	0,0070
K2	0,6	—	—	0,0195
K3	20,2	15,67	0,528	0,0337
K4	5,5	15,65	0,508	0,0325
K5	1,7	—	—	0,0415
K6	542	15,64	0,954	0,0610
K7	14,3	15,68	0,960	0,0612

On voit que les teneurs en azote, qui varient de 15,33 à 15,67%, alors que celle de Ko est de 15,69%, sont pratiquement les mêmes que celle de la caséine primitive, alors que les poids des fractions et leurs teneurs en phosphore sont très variables.

Les deux premières fractions sont très pauvres en P (P/N = 0,070 et 0,195), les deux dernières sont très riches (P/N = 0,0610 et 0,0612) les autres intermédiaires (P/N = 0,0352, 0,0330 et 0,0415), la valeur correspondante de Ko étant de 0,0503.

Les deux dernières fractions forment à elles seules 68,5% du poids de Ko et, leurs teneurs en P étant les plus élevées, celles des deux premières les plus basses, l'auteur en conclut que la caséine est formée d'au moins deux substances, l'une riche, l'autre pauvre en phosphore.

Mais cette conclusion est-elle acceptable ? Les résultats précédents prouvent surtout que HCl chasse le phosphore de la molécule de caséine ; il l'a déphosphoryle, comme le font aussi les bases, mais celles-ci bien plus rapidement, puisque, avec HCl, il faut 7 opérations successives, au lieu d'une avec la soude. Cela n'est du reste pas étonnant, la soude, qui est une base forte, s'emparant violemment de P, alors que les phosphoryles, qui sont des radicaux acides, ont plus de mal à subir l'action d'un autre acide. Dans le premier cas, il s'agit d'une combinaison ; dans le second, il s'agit sans doute plutôt d'une dissolution.

L'auteur cherche ensuite quelle est la distribution de l'azote dans les diverses fractions, étudie leur pouvoir rotatoire spécifique, leur solubilité dans les solutions de HCl + NaCl, leurs capacités de combinaisons avec les bases, leur solubilité dans l'alcool, leur fractionnement par CaCl₂, l'action de la présure, leur hydrolyse par la trypsine, enfin leur titrage au formol.

Malheureusement, il lui est impossible après tout ce travail, de tirer une conclusion définitive et claire ; il se borne à fournir au lecteur le détail, résumé ci-dessus, des essais, en lui laissant le soin de tirer lui-même la conclusion, et il y ajoute ses idées personnelles sous la forme suivante :

« La caséine est une substance hétéromoléculaire, une mixture

« plus ou moins homogène de différentes sortes de molécules colloïdales, composants qui, en raison de leur interaction mutuelle, accompagnent tout du long les opérations auxquelles on soumet la caséine, et ainsi forment un système de co-précipitation. A la difficulté de séparer ces composants peut être imputée la raison pour laquelle la caséine a été généralement considérée comme homomoléculaire. »

Arrivés à ce point de cet énorme travail, on ne peut s'empêcher de se demander où l'on en est, étant donné toutes les objections ci-dessus, y compris celles que l'auteur donne lui-même dans le cours du travail. La conclusion ci-dessus, passablement imprécise, est elle-même peu acceptable, car, comme le dit l'auteur :

« Il semblerait qu'aucune clarté spéciale n'a été apportée par les résultats obtenus, qui, au lieu de simplifier la chimie de la caséine, apparemment la compliquent. »

Ceci est, à notre avis, la vraie conclusion à tirer de ce travail, par ailleurs très consciencieusement fait et qui a dû coûter beaucoup de peine à son auteur. Ce dernier s'en excuse, en disant que, dans l'ensemble, il ne s'agit là que d'investigations préliminaires. Malheureusement, elles n'ont pas été suivies par d'autres, ce qui semble signifier que l'auteur y a renoncé.

* * *

Malgré ce qui précède, il n'empêche que cette idée de l'hétérogénéité de la caséine a été peu à peu adoptée par la science et que, en particulier, le savant suisse E. CHERBULIEZ et ses collaborateurs, ont exécuté, à partir de 1932, une série de travaux à cet égard (1).

Dans un premier travail (1932), cet auteur part des idées ci-dessus de LINDERSTROM-LANG en opérant, non comme ce dernier sur des caséines préparées en laboratoire, mais sur une caséine du commerce, qu'il épuise par une série de secouages dans une solution de NH_4Cl à 5%, ce qui est évidemment un traitement plus doux que celui employant HCl même dilué; puis, après centrifugation, on précipite la liqueur claire par un gros excès d'acétone (1.800 cm^3 pour 400 cm^3 de liqueur); les réactifs doivent être purissimes et notamment strictement exempts de soufre. Il ne faut pas moins, ici aussi, de 7 extractions successives pour épuiser la caséine de son constituant soluble β , que l'on sépare ainsi du constituant insoluble α .

Mais il y a des pertes considérables dues aux décantations et transvasements, si bien que l'on ne retrouve à la fin que 50% de la

(1) Ces travaux ont été publiés dans les *Helvetica Chimica Acta* en 1932, 1933, 1939, 1950 et 1953.

caséine primitive ; dans ces conditions, le rapport β/α doit être compris entre 1/5 et 1/8.

La caséine est donc constituée par deux corps α et β :

— Le premier α , insoluble dans NH^4Cl , ayant à peu près les propriétés de la caséine ;

— Le second β , soluble dans NH^4Cl , insoluble dans l'acétone, et qui se distingue de α par sa solubilité dans les solutions salines neutres diluées, ce qui le rapproche des globulines. Toutefois, les quantités dissoutes dépendent de la concentration du sel : par exemple, avec SO^4Mg , il ne se forme pas de précipité par l'acétone, le maximum de précipitation se produisant entre 3 et 5% de SO^4Mg , et à 5% avec NH^4Cl , les précipités diminuant en-dessus et en-dessous de ces concentrations, ce qui est difficile à expliquer.

On peut alors se demander s'il n'y a pas eu une hydrolyse de la caséine, pouvant varier selon les conditions des expériences. C'est la question que se pose l'auteur. Pour y répondre, il étudie la composition des deux produits qui est la suivante : la composition centésimale est la même en C, H et N. Mais les teneurs en P sont différentes, ainsi que les autres propriétés :

	Teneurs en P (%)	NaOH nécessaire pour neutraliser	Azote formé par la neutralisation	Coagulum par la présure
Caséine primitive	0,84	10,75	2,1	Ferme
Caséine α	0,72	10,33	2,0	Ferme
Caséine β	2,32	10,15	1,7	Mou fluide

Si, avec ces chiffres et en nous basant sur les rapports β/α indiqués ci-dessus, nous essayons de reconstituer les teneurs de la caséine primitive, nous trouvons ce qui suit :

Pour un rapport de	Teneur en P	NaOH nécessaire pour neutraliser	Azote libéré par neutralisation
1/5	0,99	10,30	1,95
1/8	0,90	10,31	2,00

Comme on le voit, les chiffres obtenus en partant des teneurs en P, sont supérieurs à ceux de la caséine primitive, tandis que, en partant des autres données, ils sont inférieurs.

Quoiqu'il en soit, l'auteur conclut qu'il s'agit bien de deux corps contenus dans la caséine, le second se rapprochant des globulines. Mais le lait contient aussi de la globuline et de lactalbumine, et l'on ignore si la caséine du commerce a été bien purifiée, et plus généralement, comment elle a été préparée.

Dans un second travail (1933) l'auteur se demande à nouveau s'il ne s'agit pas d'hydrolyse et, pour répondre à cette question, il

reprend le même travail de dissolution dans NH_4Cl , en partant tantôt de caséines du commerce, tantôt de caséines préparées en laboratoire.

Le procédé employé consiste à suspendre la caséine dans NH_4Cl , ajouter NaOH 0,1 n, puis HCl 0,01 n jusqu'à $\text{pH} = 4,8$. Or, voici ce qui se passe :

« Il se produit généralement une précipitation ; si elle n'a pas lieu, on ajoute un excès de HCl jusqu'à $\text{pH} = 4,6$. Il se produit alors toujours une floculation ; on centrifuge, ce qui donne α I ; on filtre ; on lave à l'acétone, puis à l'éther ; le filtrat est additionné d'acétone ; il se trouble et on centrifuge, ce qui donne α II, qu'on lave comme β I. Les eaux mères (contenant β) sont encore additionnées de HCl 0,1 n, ce qui précipite γ ; enfin on ajoute encore de l'acétone aux eaux mères de γ , ce qui donne δ . On purifie les quatre corps par les mêmes procédés. »

α I flocule d'autant plus facilement qu'il est plus pur et cela dès $\text{pH} = 4,8$.

α II précipite avec ou sans addition d'acétone, c'est-à-dire parfois par simple neutralisation au moyen de HCl , et les pertes sont bien plus grandes que pour α I.

β étant aussi soluble dans NH_4Cl , il y a aussi des pertes assez importantes par addition de NCl à $\text{pH} = 3,6$.

La caséine serait donc composée de quatre corps, mais les proportions de ceux-ci ne sont pas constantes, α I variant de 11 à 45%, α II de 5 à 61%, γ de 4 à 11%, δ de 2 à 6% (en chiffres ronds), et l'auteur en tire la conclusion que ces énormes variations confirment qu'il ne s'agit pas d'hydrolyse, car si la caséine était un corps homogène, un traitement toujours le même ne pourrait conduire à des résultats aussi divergeants.

Dans deux des caséines étudiées, l'une tirée du lait, l'autre commerciale, on trouve en particulier la composition suivante (%):

	α I	α II	γ	δ	Pertes
Caséine du lait	58,0	9,0	7,0	4,5	22,0
Caséine commerciale	50,4	28,2	12,9	4,3	2,2

et l'auteur ajoute : « L'accord entre les deux séries de chiffres est suffisamment concordant (!), si on se rappelle les imperfections du procédé de séparation et les pertes lors de la reprécipitation. »

L'auteur avoue d'ailleurs que « cette multiplication des fractions de la caséine est presque un peu inquiétante », ce qui est évident, mais il maintient son affirmation, qu'il s'agit bien de constituants de la caséine et non de produits d'hydrolyse, parce que « les produits obtenus finissent par se comporter comme des corps homogènes... caractérisés chacun par un ensemble de pro-

priétés constantes », et parce que « différentes caséines ont donné « des proportions variables des 4 fractions », et que, s'il s'agissait d'une dégradation de la caséine « au cours d'un processus réalisé « toujours exactement dans les mêmes conditions, le résultat devrait « être constant ».

Il nous semble bien que c'est là un raisonnement par l'absurde, et que, dans ces conditions, on devrait aussi pouvoir dire que, si la caséine est bien formée de ces 4 corps, les quantités fournies par des caséines différentes devraient aussi être constantes, car l'on ne comprend guère qu'il puisse en être autrement ; en effet, il n'y a, nous semble-t-il, aucune raison d'admettre des différences comme celles ci-dessus pour une opération physique aussi simple qu'une solution et de ne pas les admettre pour une opération chimique complexe, telle qu'une hydrolyse. La logique voudrait plutôt le contraire.

Dans deux autres travaux (1939), l'auteur reprend les quatre fractions, les purifie par la même méthode ($\text{NH}_4\text{Cl} + \text{NaOH} + \text{HCl}$) et obtient les quantités suivantes :

α I = 32,8% ; γ = 48,7% ; δ = 3,5% ; pertes + 15%.

α II est disparu sans que l'auteur explique pourquoi, et il n'y a plus que 3 fractions, dont l'une, δ , est identique à la protéose de HAMMARSTEN. L'auteur en conclut que celle-ci n'est pas un produit d'hydrolyse.

L'action de la présure est nulle sur δ et maximum sur α I et γ , en employant une présure Fabre en poudre « pratiquement exempte, au pH d'action de la présure, d'action protéolytique sur le blanc d'œuf *cuit dur* ». Remarquons seulement que ce dernier corps est bien plus difficile à digérer que la caséine et que par suite, ce résultat ne prouve rien en ce qui concerne cette dernière (1).

Enfin, la paracaséine se comporte comme la caséine et est aussi un mélange.

Dans un travail subséquent (1950), E. CHERBULIEZ étudie la transformation de la caséine en paracaséine, en partant de ses précédents travaux et des fractions déjà obtenues α (α I et α II), β , γ , δ .

Parmi ces fractions constituantes de la caséine, seul le groupe α subit une transformation lors de l'action de la présure à un pH compris entre 5,5 et 6,8. Les composants de ce groupe sont scindés chacun en paracaséine α I et α II, dont les sels calciques sont insolubles. De ce fait l'effet de colloïde protecteur de α est supprimé et il y a, en présence d'ions Ca, précipitation à la fois des para-

(1) M. Beau. La présure et la coagulation du lait. Voir dans *Ergebnisse der Enzymforschung*, vol. IV, p. 178, 1935.

caséines α I et α II, ainsi que des caséines β et γ , dont les sels calciques sont normalement insolubles, la caséine δ restant seule en solution.

En somme, cette conclusion est basée sur l'idée que la caséine est le « nœud » du problème : ses sels calciques sont solubles, alors que les sels calciques de α II, β et γ sont insolubles et maintenus en solution (ou plutôt en suspension colloïdale) par la caséine α , qui joue le rôle de « protecteur ». La présure agit exclusivement sur cette dernière et produit sa séparation en deux corps α I et α II ; de ce fait le pouvoir protecteur de la caséine α disparaît et, en présence de sels calciques, α I et α II, β et γ précipitent ensemble.

Toutefois, en ce qui concerne δ , un dernier travail (1953) de l'auteur, conclut en disant qu'il semble probable que la présure n'exerce aucun effet sur elle.

Si nous négligeons cette contradiction, au moins apparente, la théorie ci-dessus est ingénieuse, voire élégante par sa simplicité même, mais il reste à savoir si elle correspond véritablement à la réalité.

En somme, il règne aussi dans ces travaux une grande incertitude, non pas tant sur leur valeur intrinsèque, qui n'est pas douteuse, que sur les conclusions à en tirer. Les trois points faibles de ces conclusions semblent être les suivants :

Les pertes considérables et sans doute inévitables que l'on constate dans les opérations (jusqu'à 50% de la caséine primitive) ;

Le fait que la précipitation de HCl ne se produit pas toujours malgré que l'on opère « exactement dans les mêmes conditions » ;

La composition même des produits obtenus qui, recombinaison par le calcul, ne redonnent pas la caséine primitive.

Par suite, le moins que l'on puisse dire est qu'il reste un doute et que la question de l'homogénéité de la caséine est toujours en suspens.

Mais d'autres auteurs se sont aussi attaqués à ce problème.

*
* *

C'est le cas de divers auteurs américains (1), notamment de R. WARNER qui, dans un premier travail (1944), pour séparer les caséines α et β , emploie des méthodes qui, à son idée, sont « as mild as possible ».

Pour cela il part de lait très frais traité, qu'il maintient constamment dans un local à 2° C. Il précipite la caséine par HCl 0,1 N, lave 6 fois de suite le précipité dans l'eau glacée, le dissout dans

(1) Ces travaux ont été publiés dans le *Journal of the American Chemical Society*, entre 1944 et 1950.

NaOH 0,1 n jusqu'à $pH = 6,5$, reprécipite par HCl, lave le précipité à froid et le traite par la méthode de Linderstrom-Lang ce qui donne les résultats suivants :

	N %	P %	P/N	Cendres	
				théoriques	réelles
Caséines primitives (moyennes) .	15,68	0,86	0,050	1,96	0,37
Caséine α	15,62	0,99	0,063	2,25	0,39
Caséine β	15,53	1,00	0,064	2,87	0,60
Caséine γ	15,53	0,61	0,039	2,88	0,90

Comme d'habitude, les teneurs en azote sont pratiquement identiques ; celles en phosphore diffèrent ; quant aux cendres, il y a une énorme discordance entre les chiffres théoriques et les chiffres pratiquement obtenus, l'auteur attribuant ce fait à une « contamination par des sels minéraux ».

Mais, dit l'auteur, dans la littérature, l'homogénéité des fractions obtenues a été peu démontrée. LINDESTRÖM-LANG notamment conclut que ses fractions ne sont que des mixtures. Dans celles de CHERBULIEZ et de divers autres auteurs, il y a aussi des différences considérables, notamment dans les teneurs en phosphore, en tyrosine, en tryptophane.

L'auteur ajoute que :

1° α et β sont composés, mais un fractionnement de l'un de ces deux composés peut avoir lieu comme résultat du traitement ;

2° Les méthodes employées sont parfois plutôt destructives et peuvent produire une légère hydrolyse des protéines ;

3° Toutes les préparations contiennent un enzyme protéolytique, sauf celles qui ont été exposées à la chaleur ou à un traitement par l'alcool ;

4° α et β ne sont pas électrophorétiquement homogènes à tous les pH ; ce sont cependant des fractions distinctes, dont chacune a été débarrassée de l'autre par les nombreuses précipitations et solutions faites, qui ont abouti à une séparation complète des deux, l'auteur considérant d'ailleurs que le traitement appliqué est « mild ».

Ce qu'il y a de nouveau dans ce travail, c'est l'assertion que la caséine contient un enzyme protéolytique (1). L'auteur le confirme dans un second travail (1945).

(1) Cette assertion n'est pas une nouveauté, car, à la fin du siècle dernier, deux savants américains, *Babcock* et *Russel*, laissant en repos du lait additionné de chloroforme, devant arrêter le développement microbien, avaient constaté une protéolyse de la caséine, qu'ils attribuaient à une enzyme, la galactase. (*XIV^e Annual Report of the Agricultural Experiment Station of Wisconsin*, 1897, et *Zentralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde*, 1900.)

Cet enzyme existe dans toutes les caséines préparées tant dans le commerce qu'au laboratoire, lorsqu'on opère par précipitation au moyen d'un acide. C'est ainsi qu'une solution de caséine dans le borax diminue rapidement de viscosité avec le temps ; simultanément il y a augmentation des produits azotés solubles, le maximum de ces produits ayant lieu à $pH = 8,5$.

En comparant une semblable solution, avec la même solution stérilisée par filtration, on trouve ce qui suit :

Jours	Solution non filtrée Bactéries par cc^3	Moisissures par cm^3	N soluble (%)	Solution filtrée N soluble (%)
0	5.300	0	1,7	1,8
2	80	20	8,6	8,1
4	10	100	18,4	18,0
7	0	130	31,4	31,5

On voit que les quantités d'azote soluble sont exactement les mêmes, que la solution soit stérilisée ou non, c'est-à-dire que cet azote ne provient pas d'une action bactérienne. Mais il pourrait provenir de deux autres causes :

1° De l'action des moisissures, qui non seulement ne disparaissent pas, mais semblent favorisées par le borax ;

2° De l'action de la soude du borax, jouant le rôle d'un enzyme : quand on ajoute du borax à une suspension de caséine dans l'eau, ce sel s'ionise peu à peu, la caséine chassant l'acide borique et libérant la soude avec qui elle se combine pour former un caséinate de soude ; mais la soude mise en liberté a effectivement un pouvoir protéolytique, notamment au $pH = 8,5$ nettement alcalin, auquel on opère.

Il va de soi que, dans ces conditions, l'action de cet enzyme, en concomitance avec celle de la soude, joue chaque fois que l'on traite une caséine (ou paracaséine) quelconque, comme cela a dû être le cas dans tous les travaux que nous venons d'étudier, une hydrolyse peut toujours se produire, dans des conditions et avec des résultats d'ailleurs variables suivant les modes opératoires que l'on applique (pH , température, concentration, etc...), ce qui pourrait éventuellement suffire à expliquer les différences constatées.

On peut alors se demander si cette découverte d'un enzyme protéolytique dans la caséine ne suffit pas à annuler toutes les conclusions à tirer des travaux précédents ; l'irrégularité des résultats semblerait le confirmer.

Une étude spéciale serait en tout cas à reprendre sur cet enzyme, qui, s'il existe dans toutes les caséines, doit pouvoir en être extraite sans ambiguïté.

Il reste encore que nous ne sommes toujours guère plus avancés pour résoudre le problème de l'homogénéité de la caséine.

*
*
*

Divers autres auteurs se sont également occupés de la question, parmi lesquels nous citerons seulement les suivants :

J. GROH (1), partant de l'idée certaine que la caséine est hétérogène, emploie trois modes de fractionnement plus « doux » que les précédents, savoir :

1° Dissolution de la caséine dans une solution aqueuse d'urée à 40%, puis addition d'alcool absolu, ce qui donne de plus en plus de précipités ;

2° Dissolution de la caséine dans du phénol fondu, exempt d'eau, à 70° C., puis addition d'alcool absolu, ce qui donne aussi des précipités successifs ;

3° Dissolution de la caséine dans NH_4 diluée, mais contenant de l'alcool à 70%, puis additionnée de ce même alcool contenant HCl.

Les trois opérations donnent chacune trois fractions successives jusqu'à ce qu'on arrive à $\text{pH} = 4,7$, et dans chacun des trois cas on obtient deux sortes de fractions :

— Une fraction K1, qui a une haute teneur en tyrosine (moyenne 7,6%), en tryptophane (moyenne 1,58) et un pouvoir rotatoire faible (moyenne 91) ;

— Une fraction K2, qui a une faible teneur en tyrosine (moyenne 3,9%), en tryptophane (moyenne 1,1%) et un pouvoir rotatoire élevé (moyenne 129).

K1 et K2 purifiés, par plusieurs précipitations, sont à considérer comme purs, aucun autre composant n'étant apparu.

Les moyennes des teneurs en tyrosine des deux groupes (5,85%) et du pouvoir rotatoire (111°) sont égales à celles de la caséine utilisée, si bien que cette dernière doit être considérée comme formée par moitié par chacun des deux groupes K1 et K2. Du reste, en ne séparant pas les composants, c'est-à-dire en opérant une « précipitation complète », on obtient un produit identique à la caséine utilisée (ce qui est évident a priori), aussi vis-à-vis de la présure.

K2 a les mêmes propriétés que la caséine d'OSBORNE-WAKEMAN (2), ce qui est confirmé par le fait qu'il est bien soluble dans

(1) Ueber die fraktionierung des caseins, *Zeitschrift für Physiologische Chemie*, vol. CCXXVI, p. 32, 1934.

(2) J. Osborne et A. Wakeman. The proteins of milk. Voir, pour ce corps, le *Journal of Biological Chemistry*, vol. XXXIII, p. 7 et 243, 1918.

l'alcool à 70% tiède. Mais d'après ces derniers auteurs, cette protéine ne se trouve qu'en quantités faibles dans la caséine, ayant été obtenue par lavages à l'alcool à 50-70°, de grandes quantités de caséine.

On voit qu'ici il ne s'agit plus du tout des caséines α et β des auteurs précédents et que les conclusions du travail sont très différentes de ces auteurs, ce qui naturellement ne simplifie pas la question.

CONCLUSION

Les travaux qui précèdent sont tous essentiellement basés sur l'emploi de HCl en vue de deux buts : le premier, qui est une solubilisation, devant permettre de démontrer l'hétérogénéité de la caséine ; le second, qui est au contraire, une précipitation de la caséine, le tout dépendant évidemment des conditions ambiantes, c'est-à-dire du pH , de la température, de la concentration et de la caséine et de l'acide, probablement aussi de certaines conditions mécaniques, telles que pression, secouage, etc...

Ces deux buts sont nettement opposés, voire contradictoires ; d'autre part, la caséine étant toujours obtenue à la suite de nombreuses précipitations par HCl suivies d'autant d'élutions par NaOH, une partie plus ou moins importante de la caséine peut déjà se dissoudre pendant ces opérations, si réellement une partie de sa substance est soluble dans HCl ; elle doit perdre aussi une plus ou moins grande partie du phosphore organique qui lui est lié par suite des élutions au moyen de NaOH, perte qu'elle ne regagne pas à la précipitation suivante.

On admet généralement que, dans le lait :

1° La chaux est liée à la caséine sous forme de caséinate de chaux, plus ou moins riche en chaux, la teneur de celle-ci, au pH normal du lait (6,5-6,6) étant de 500 milligrammes de chaux pour 30 grammes de caséine pure, soit 1,66% (1). ;

2° L'acide phosphorique est aussi lié à la caséine sous forme de phosphoryles unis à des peptides tels que la sérine.

En outre, il existe dans le lait du phosphate de chaux bi ou tri-basique.

Si l'on ajoute HCl au lait, deux réactions peuvent théoriquement se produire :

1° L'acide s'unit à la chaux pour donner $CaCl^4$, qui se dissout intégralement ; la caséine est décalcifiée et précipite ; c'est ce qui se produit pratiquement.

2° Mais il doit aussi pouvoir s'unir ensuite aux NH^2 de la caséine, ces radicaux aminés sont de valences alcalines très différentes,

(1) C. Porcher. Le lait au point de vue colloïdal. Lyon, 1929.

plus ou moins faibles en tout cas ; et là, on ignore ce qui se passe exactement, HCl faisant certainement, entre les divers radicaux aminés de la caséine, une sorte de discrimination, dont le résultat final dépend précisément aussi des conditions de l'opération (*pH*, température, concentration des divers produits en présence, etc...), ce qui peut sans doute, dans bien des cas, expliquer les différences de résultats obtenus.

Ce nous paraît être, en particulier, le cas des différences entre les résultats de LINDERSTROM-LANG, CHERBULIEZ et WARNER d'une part, GROH d'autre part, en ce qui concerne la caséine γ , ainsi que le fait qu'il n'est pas absolument certain que les diverses caséines qualifiées α , β , γ obtenues par les différents auteurs, soient exactement les mêmes corps.

Ajoutons à cela que l'action d'un acide fort comme HCl est toujours plus ou moins brutale, étant donné qu'il s'agit là d'un produit chimique violent et extrêmement ionisé.

La conclusion est qu'il paraît nécessaire de trouver des méthodes d'étude « plus douces » et, pour cela, d'abandonner les traitements chimiques, avec acides forts et bases fortes ; on pourrait déjà utiliser des acides organiques beaucoup plus faibles, telles que l'acide acétique et des bases minérales, telles que l'ammoniaque, voire des sels ou des corps organiques neutres ($\text{NH}^4 \text{Cl}$, urée, etc...), comme la chose a été faite par CHERBULIEZ et GROH.

Mais sans doute est-il préférable de remplacer ces traitements chimiques par des traitements physiques ou même, simplement mécaniques. C'est du reste ce qui a été fait ; nous en ferons l'objet d'un article subséquent (1).

**INFLUENCE DU CAILLAGE SUR L'UTILISATION
DIGESTIVE ET SUR LA VALEUR BIOLOGIQUE
DES PROTIDES DU LAIT.
ESSAIS DE SUPPLÉMENTATION DES PROTIDES
DU LAIT, DU CAILLÉ ET DU CAMEMBERT
PAR LA CYSTINE (2)**

par

M^{me} LUCIE RANDOIN, M^{me} COLETTE JOURDAN
et M. JEAN CAUSERET

Au cours de recherches antérieures (3), nous avons montré

(1) *M. G. Mocquot*, qui a bien voulu revoir le présent travail, nous a donné quelques judicieux conseils, dont nous le remercions vivement.

(2) *Comptes rendus Acad. Agr.*, **8**, 304, 1954.

(3) *L. Randoïn et C. Jourdan. Comptes rendus Acad. Agr.*, **38**, 101, 1952. — *L. Randoïn, C. Jourdan et J. Causeret. Annales Technol. (I.N.R.A.)*, à paraître, 1955.