

116. Recherches sur la caséine III¹⁾.

Sur le fractionnement de la caséine et de la paracaséine au chlorure d'ammonium

par Emile Cherbuliez et Jean Jeannerat.

(I. VI. 39.)

Le problème du fractionnement de la caséine a fait de très grands progrès. On a maintenant toute une série de méthodes permettant de montrer la non homogénéité de la caséine, sans faire intervenir des opérations qui risqueraient d'entraîner une dégradation. Dans cet ordre d'idées, les travaux de *Groh*²⁾ semblent particulièrement intéressants. Cet auteur a obtenu des fractions nettement différenciées par certains critères analytiques (teneur en tyrosine et en tryptophane, pouvoir rotatoire), par une dissolution de la caséine dans une solution aqueuse concentrée d'urée, suivie d'une précipitation fractionnée par l'alcool. Ce procédé a donné à *Groh* deux fractions, qu'il a retrouvées d'ailleurs aussi par fractionnement d'une solution de caséine dans le phénol (dissolution dans le phénol à 70°, fractionnement par additions successives d'alcool), ou encore par précipitation fractionnée du caséinate d'ammonium en solution alcoolique de 70 % par de l'acide chlorhydrique dilué.

Ce dernier procédé s'apparente à notre avis le plus à celui que l'un de nous a étudié avec divers collaborateurs³⁾; il consiste essentiellement en la précipitation fractionnée par addition d'un acide, d'une solution aqueuse de caséinate en présence de certains sels neutres, notamment de 5 % de chlorure d'ammonium. Dans les deux cas, la séparation, qui n'est pas réalisable dans de l'eau comme dissolvant, le devient lorsqu'on modifie le dissolvant eau, soit en le remplaçant par de l'alcool à 70 %, soit en le remplaçant par une solution aqueuse de certains sels minéraux.

A. FRACTIONNEMENT DE LA CASÉINE.

Sur l'homogénéité des fractions.

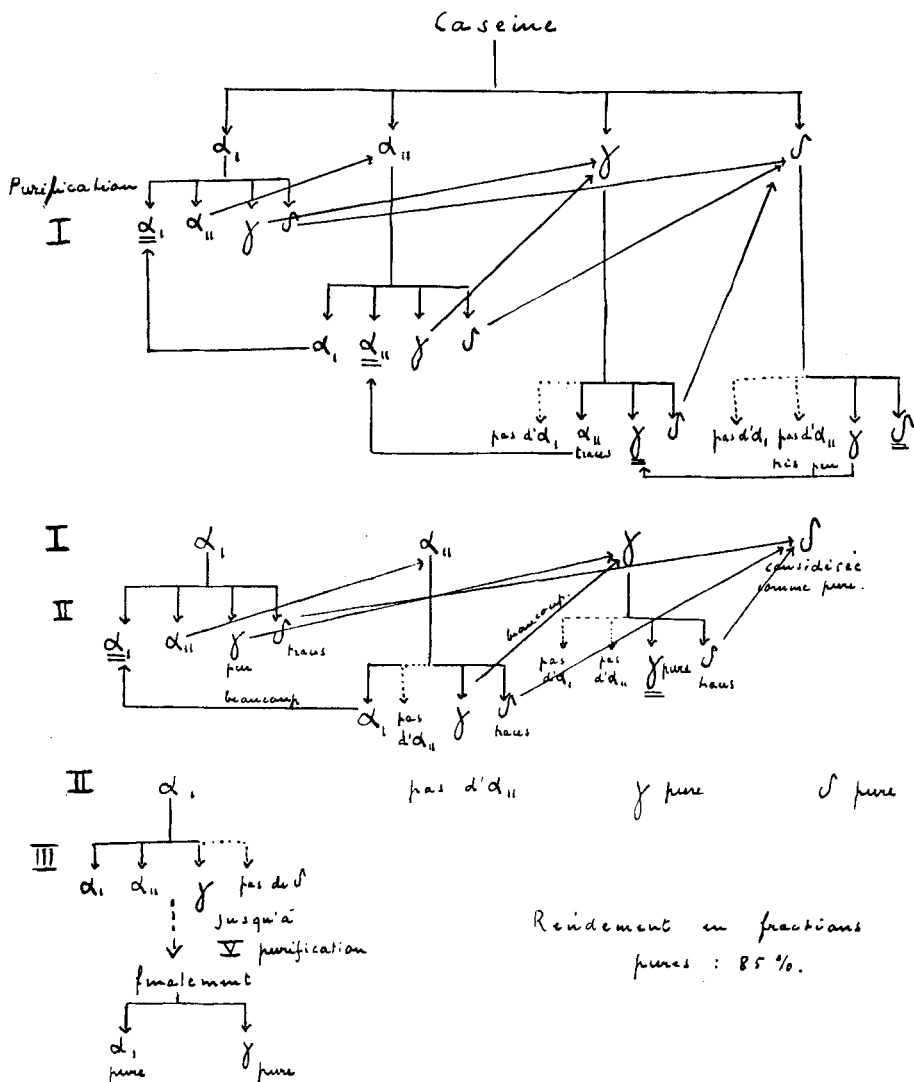
Le procédé au chlorure d'ammonium nous avait donné 4 fractions, désignées provisoirement par α_I , α_{II} , γ et δ . Mais les diverses fractions obtenues n'avaient pas encore été soumises à une purification systématique par répétition de notre processus de fractionnement. Leur homogénéité n'était donc aucunement établie. C'est cette lacune que nous avons comblée, avec le résultat que le nombre

¹⁾ II: *E. Cherbuliez et Fr. Meyer*, *Helv.* **16**, 600 (1933).

²⁾ *Z. physiol. Ch.* **226**, 32 (1934).

³⁾ *Cherbuliez et M. L. Schneider*, *Helv.* **15**, 597 (1932); *Cherbuliez et Meyer*, loc. cit.

des fractions obtenues à l'aide de notre procédé se réduit de quatre à trois, la fraction α_{II} se scindant en α_I et en γ .



Le schéma ci-contre résume la marche des opérations. Il montre que les quatre fractions obtenues directement à partir de la caséine sont toutes relativement peu homogènes (purification I). A la deuxième purification, α_{II} disparaît complètement, pour faire place à α_I et à γ . Quant à δ , cette fraction est d'emblée presque homogène puisqu'elle se dissout à peu près intégralement dans le chlorure d'ammonium et même dans l'eau si on a soin de prendre un produit fraîchement précipité.

La technique suivie a été essentiellement celle décrite dans le précédent mémoire¹⁾. 15 gr. de caséine sont suspendus dans 1140 cm³ de chlorure d'ammonium à 5 % et 90 cm³ de chlorure d'ammonium à 20 % (sel exempt d'ion SO₄''). La dissolution s'opère par addition progressive de 140 cm³ de soude caustique 0,1-n.; p_H final 6,5. On ajoute, toujours en agitant, la quantité équivalente d'acide chlorhydrique décinormal (p_H 4,8), puis encore 5 cm³ pour arriver au p_H 4,6 et précipiter α_I. On centrifuge, lave les culots à l'eau distillée et les conserve dans l'acétone si on ne peut continuer immédiatement le fractionnement. Le liquide de centrifugation donne par addition de 1/5ème de son volume d'acétone la fraction α_{II} traitée comme la précédente. La liqueur portée au p_H 3,8 par addition d'acide chlorhydrique décinormal fournit γ. Pour obtenir δ, on ajoute 4 volumes d'acétone à la liqueur-mère de γ. On peut modifier ici avec avantage le procédé: le p_H optimum de précipitation de δ par l'acétone se trouve être à 5,8; à ce p_H, deux volumes d'acétone suffisent, et la floculation de cette dernière fraction, toujours lente, se fait le mieux si on ajoute d'abord 1 volume d'acétone, puis, après repos d'une nuit, le second.

Pour la purification, chaque fraction est dissoute dans de la soude en présence de chlorure d'ammonium et traitée comme si on avait affaire à de la caséine.

Avec une caséine préparée par nous-mêmes à partir de lait écrémé, nous avons obtenu les rendements suivants:

Caséine α_I 32,8%; caséine γ 48,7%; caséine δ 3,5%; pertes 15%.

Nous ramenons ainsi à *deux* les fractions constituant principalement la caséine, séparées par notre procédé; une comparaison directe, que nous n'avons pas encore pu effectuer, s'impose naturellement avec les 2 fractions de *Groh*.

Fractionnement en présence d'ion Ca⁺⁺.

Notre préparation de caséine contenait encore un peu de calcium (0,24 %). Pour vérifier si la présence de cet ion pouvait influencer sur le résultat obtenu, nous avons effectué une opération en remplaçant la soude caustique par de l'eau de chaux, avec un résultat inchangé; l'obtention de nos fractions est donc indépendante de ce facteur.

5 gr. de caséine suspendus dans 330 cm³ de chlorure d'ammonium à 5 % + 45 cm³ de chlorure d'ammonium à 20 % sont dissous par addition de 100 cm³ d'eau de chaux (titre: 0,835 mgr. CaO/cm³). Le p_H est 6,3. L'addition de la quantité équivalente d'acide (47 cm³ d'acide chlorhydrique 0,1-n.) précipite α_I qu'on centrifuge. Après séparation du précipité, l'addition d'un cinquième du volume d'acé-

¹⁾ loc. cit.; pour plus de détails, v. *J. Jeannerat*, Recherches sur la caséine, thèse N° 976, Genève 1937.

tone précipite α_{II} . Le liquide séparé, amené au p_H 3,8 par 15 cm³ d'acide chlorhydrique 0,1-n., laisse flocculer γ . δ est obtenue dans les conditions déjà déterminées.

Action de la présure.

Cherbuliez et *Meyer* avaient constaté que, de leurs 4 fractions, δ n'était pas modifiée par la présure, α_I et γ étaient coagulées incomplètement, et que α_{II} était précipitée le plus complètement. Nous avons pu confirmer ces résultats en ce sens que l'action de la présure est pratiquement nulle sur δ , et maximum sur le mélange de α_I et de γ , tandis que chacun de ces deux derniers constituants ne subit séparément qu'une coagulation incomplète.

Pour ces essais, nous avons remplacé l'extrait commercial de présure employé précédemment par une poudre de présure fournie gracieusement par la maison *Fabre*, d'Aubervilliers. Cette préparation est pratiquement exempte de pouvoir protéolytique au p_H d'action de la présure et dans nos conditions de travail (ce qui n'était pas le cas de l'extrait): 2 gr. de blanc d'œuf cuit dur, tamisé, suspendus dans 20 cm³ d'eau sont additionnés de 0,6 mgr. de présure et maintenus 30 minutes à 35°. La teneur en azote de la solution filtrée ne dépasse pas celle d'un essai à blanc avec la présure seule.

Pour l'emprésurage, nous avons adopté une technique de *Porcher*¹⁾: un lait artificiel est préparé avec du caséinate et du chlorure (et non du phosphate) de calcium. Une solution de caséine à 3%, obtenue par addition d'au moins 540 mgr. de CaO par litre, est additionnée de 1/100 mol.gr. de chlorure de calcium par litre, soit de 6,7 cm³ Cl₂Ca 0,05-m. par gr. de caséine. Avec nos substances, ces solutions se préparent en dissolvant les diverses fractions, en suspension dans de l'eau, par addition progressive d'eau de chaux en agitant constamment; la solution laiteuse obtenue contenant généralement plus de 540 mgr. CaO par litre, est additionnée d'acide chlorhydrique décimormal jusqu'à obtention du p_H 6 de l'emprésurage, ensuite on ajoute encore le chlorure de calcium nécessaire pour obtenir la quantité voulue de chlorure de calcium. La quantité d'eau de chaux nécessaire varie; elle est plus élevée pour α_I que pour γ (*Ch.* et *M.* l'avaient déjà observé). Il faut avoir soin d'ajouter soit l'acide chlorhydrique, soit le chlorure de calcium très lentement pour éviter des flocculations parfois irréversibles. Les solutions sont portées à 35°, additionnées de 1 mgr. de présure par gr. de substance et filtrées après 15 minutes du coagulum formé. Pour établir le degré de coagulation, on compare l'azote du filtrat à la teneur en azote déterminée dans une partie aliquote de la solution avant l'emprésurage.

¹⁾ *J. Porcher*, Le lait au point de vue colloïdal, Lyon 1930.

Essais d'emprésurage.

Substance	Eau de chaux (0,835 mgr. CaO/l) par gr.	Aspect avant l'emprésurage	Aspect après l'emprésurage	Degré de coagulation en %
α_I	47 cm ³	laiteux	presque solide	80,1
γ	32 cm ³	83,1
δ	50 cm ³	opalescent	opalescent	9,5
40 α_I + 60 γ	45 cm ³	laiteux	solide	90,6
caséine moins δ^1)	40 cm ³	97,8
id. + 5% δ	42 cm ³	95,5

Les chiffres de ce tableau montrent que l'action précipitante de la présure sur δ est pratiquement nulle. α_I et γ sont précipités en majeure partie sous forme de sels calciques.

Comme on ignore la nature des transformations qu'opère la présure sur la caséine, on ne pourrait formuler que des hypothèses pour interpréter nos observations. La présure est un ferment dont le substratum est un protide natif. Il est intéressant de noter que ce ferment ne semble agir que sur des molécules complexes de nature protéique proprement dite, comme les fractions α_I et γ de la caséine, tandis qu'un constituant comme la δ , qui présente les caractères généraux d'une albumose, n'est pas atteint. On trouve là une certaine analogie avec les protéases du type de la pepsine qui n'agissent pas non plus sur les albumoses. Beaucoup d'auteurs ont voulu voir dans l'action de la présure un clivage de la molécule protéique. Ce clivage devrait porter naturellement aussi sur les fractions individuelles α_I et γ lorsqu'elles sont modifiées par la présure. Or, la précipitation des 4/5èmes environ de ces deux fractions n'est pas en elle-même un argument en faveur de cette hypothèse puisque le mélange de α_I et de γ est précipité beaucoup plus complètement. D'autre part, δ , même mélangée aux autres fractions, n'est pas précipitée (dernière ligne du tableau). Nous reviendrons sur ce point dans la note suivant cet article.

B. FRACTIONNEMENT DE LA PARACASÉINE.

On appelle paracaséine un produit de transformation de la caséine formé sous l'influence fermentative de la présure. On ignore encore totalement le mécanisme de cette transformation; jusqu'à présent, on sait seulement que la paracaséine se distingue de la caséine par l'insolubilité de son sel de calcium. Du moment que la caséine n'est pas un produit homogène, mais formé de divers constituants précipitables ensemble par la présure, on peut prévoir que cette

¹⁾ Ensemble des fractions α_I , α_{II} et γ , sans delta, obtenues par un premier fractionnement au chlorure d'ammonium.

paracaséine doit présenter une inhomogénéité semblable à celle de la caséine elle-même. L'expérience a confirmé ces prévisions.

Préparation de paracaséine.

La préparation de paracaséine exempte de calcium ne semble pas avoir été étudiée spécialement. Deux voies s'offrent. Par empré-surage d'une solution de caséinate de calcium, on peut précipiter la paracaséine sous forme de son sel calcique, et la séparer ainsi à coup sûr de la caséine. Mais l'élimination du calcium de ce précipité nécessite des opérations répétées de redissolution et de reprécipitation. On peut encore faire agir la présure sur une solution de caséine en absence d'ions alcalino-terreux, de manière à conserver la paracaséine en solution; en amenant celle-ci au p_H 4,6 après l'action de la présure, on provoque la précipitation d'une paracaséine aussi exempte de calcium que l'était la caséine primitive, mais au risque de la voir souillée de caséine éventuellement non transformée. Nous avons utilisé les deux voies, en obtenant des produits qui se comportaient d'une manière identique au fractionnement subséquent.

a) 50 gr. de caséine sont suspendus dans 650 cm^3 d'eau et dissous dans 650 cm^3 d'eau de chaux (titre: 1,41 mgr. CaO/cm^3), puis ramenés au p_H 6 de coagulation par la présure par addition de 60 cm^3 d'acide chlorhydrique décinormal. La solution est additionnée ensuite de 275 cm^3 de chlorure de calcium 0,05-m. Toutes ces opérations se font par addition très graduelle avec une agitation continue. Le lait parfaitement homogène est porté à 35°, additionné de 25 mgr. de présure et centrifugé après coagulation complète (20 minutes). Le culot est broyé sous de l'eau distillée et lavé à trois reprises par centrifugation avec de l'eau. La masse visqueuse obtenue est suspendue dans 1 litre d'acide chlorhydrique centinormal et agitée pendant quelques heures. Une bonne partie du calcium passe en solution (p_H final environ 4), et le produit devient pulvérulent comme la caséine ordinaire. Après deux répétitions de cette opération, il ne passe presque plus d'ions de calcium en solution. La paracaséine est alors suffisamment débarrassée de calcium pour se dissoudre dans de l'ammoniaque à des p_H inférieurs à 7 (le paracaséinate primitif demande pour sa dissolution un p_H d'environ 9, auquel le protide commence déjà à être dégradé). On la suspend dans 1 litre d'eau et la dissout par addition progressive de 320 cm^3 d'ammoniaque 0,1-n. La dissolution est presque intégrale. La solution du p_H 6,4 est décantée des particules insolubles à ce p_H (sels calciques) et versée dans 18 cm^3 d'acide chlorhydrique 2-n. On note un p_H de 4 qu'on ramène lentement à 4,6 par addition de 50 cm^3 de soude caustique 0,1-n. pour achever la précipitation. Le produit obtenu ainsi contient encore 0,7 % Ca environ. On le suspend de nouveau dans de l'eau

et le dissout au moyen de 270 cm³ d'ammoniaque 0,1-n.; cette solution est versée dans 420 cm³ d'acide chlorhydrique 0,1-n., de manière à faire passer la paracaséine en solution acide. La solution claire obtenue après agitation est ramenée au p_H 4,6 par addition très lente, avec très forte agitation, de 150 cm³ de soude caustique 0,1-n.: teneur en calcium du produit précipité 0,26 %, soit à peu près la teneur de la caséine utilisée (0,24 %). Une répétition de cette opération abaisse la teneur en calcium à 0,19 %.

b) 15 gr. de caséine sont suspendus dans 500 cm³ d'eau et dissous par addition lente de 90 cm³ de soude caustique 0,1-n. (p_H final 7). On revient au p_H 6 par 16 cm³ d'acide chlorhydrique 0,1-n. La solution est portée à 35°, additionnée de 10 mgr. de présure et acidulée après 30 minutes de repos à cette température, par addition de 80 cm³ d'acide chlorhydrique 0,1-n. Un précipité compact se forme. On centrifuge et lave à l'eau distillée. Ce produit (0,27 % Ca) ne se dissout plus du tout dans l'eau de chaux (absence de caséine). On le dissout dans 500 cm³ d'eau avec 110 cm³ d'ammoniaque 0,1-n. (p_H final 6,5). La solution est versée dans 168 cm³ d'acide chlorhydrique 0,1-n. (p_H final 3,2); tout reste en solution; on revient alors au p_H 4,6 par addition de 63 cm³ de soude caustique 0,1-n.: 0,18 % Ca.

Les deux échantillons de paracaséine paraissent identiques. Leurs teneurs en phosphore et en soufre sont normales (0,81 % P et 0,92 S).

Fractionnement.

Le fractionnement, effectué sur des prises de 5 gr. de chacun des deux échantillons de paracaséine selon a) et selon b), est conduit selon notre procédé décrit. La première opération donne pour chacun des deux corps les fractions homologues à celles de la caséine, soit para α_I , para α_{II} , para γ et δ . Par le préfixe para, nous désignons les fractions homologues qui se distinguent par leur insolubilité dans l'eau de chaux des fractions correspondantes de la caséine. La dernière fraction ne se distingue pas de la fraction correspondante de la caséine, aussi la désignons-nous tout simplement par δ . Pour la suite des opérations, les fractions correspondantes sont réunies. Comme pour la caséine, para α_{II} disparaît pour se scinder en para α_I et para γ .

Les rendements en diverses fractions sont à peu près les mêmes pour un échantillon déterminé de caséine et la paracaséine correspondante, sauf pour δ qui est presque absente de la paracaséine:

Substance	α_I (para α_I) %	γ (para γ) %	δ %
Caséine IV . . .	32,8	48,7	3,5
Paracaséine IV .	30,8	53,6	0,7

Comme cela avait déjà été constaté pour la caséine, ces chiffres varient avec les échantillons, sauf pour δ qui ne constitue jamais

qu'une part très faible de la paracaséine; une autre paracaséine nous a donné par exemple: 45,6 % para α_1 ; 38,8 % para γ ; 0,6 % δ .

Tout comme la caséine, la paracaséine est donc un mélange. On y trouve comme homologues des fractions α_1 et γ , et à peu près dans les mêmes proportions que celles-ci, les fractions para α_1 et para γ ; ces dernières sont caractérisées par les mêmes p_H de précipitation en solution aqueuse en présence de 5 % de chlorure d'ammonium, que les fractions correspondantes α_1 et γ de la caséine dont elles se distinguent par leur insolubilité dans l'eau de chaux. Mais à côté de cette insolubilité des sels calciques de para α_1 et para γ , la paracaséine diffère encore de la caséine par le fait qu'elle ne renferme presque pas de δ , fraction qui constitue le 4 % de la caséine. A la lumière de ces faits, on est naturellement amené à l'idée que la transformation de la caséine en paracaséine implique une modification des seules fractions α_1 et γ , la fraction δ subsistant telle quelle en solution aqueuse. Dans la note qui suit, nous examinerons quelques conséquences qui découlent de ces observations.

Laboratoire de Chimie organique et pharmaceutique de l'Université de Genève.

117. Recherches sur la caséine IV¹⁾.

La protéose de *Hammarsten* n'est pas un produit de dégradation de la caséine

par Emile Cherbuliez et Jean Jeannerat.

(1. VI. 39.)

On sait depuis fort longtemps que la coagulation du lait par la présure, telle qu'elle est pratiquée depuis des temps préhistoriques pour la fabrication du fromage, repose sur la transformation fermentative de la caséine du lait en un produit appelé paracaséine. La paracaséine se distingue de la caséine par l'insolubilité de son sel calcique. C'est cette insolubilité qui explique la coagulation du lait sous l'influence de la présure puisque, dans le lait, la caséine est précisément à l'état de caséinate de calcium.

La nature de cette transformation fermentative est encore mal éclairée. *Hammarsten*²⁾ a montré que la solution aqueuse séparée du précipité de paracaséinate de calcium, c'est-à-dire le petit-lait, contenait en faible proportion une matière protéique différente de tous les protides qu'on avait pu retirer du lait. Beaucoup d'auteurs ont alors admis avec lui que, sous l'action de la présure, la molécule de la caséine subissait une scission hydrolytique conduisant à deux

¹⁾ III: *Cherbuliez et Jeannerat*, article précédent, p. 952.

²⁾ *Maly's Jahresberichte*, **4**, 135 (1874).