

146. Recherches sur la caséine VII¹⁾.

Identité des γ -caséines retirées de la caséine et de la paracaséine

par Emile Cherbuliez et Bertrand Wolf.

(11 VI 53)

On sait depuis longtemps que la caséine est un mélange de plusieurs protides. *Mellander*²⁾ a montré par électrophorèse l'existence de 3 constituants, α , β et γ , auxquels s'ajoute encore la δ -caséine³⁾. Le fractionnement de la caséine (voir p. ex. *Cherbuliez & Baudet*⁴⁾) permet effectivement d'en retirer ces 4 protides distincts. D'autre part, la caséine, dont le sel de calcium est soluble, est transformée par le labferment (présure) à un pH d'env. 6,5, en un produit dit paracaséine, caractérisé par l'insolubilité de son sel calcique.

Recherchant la nature de la transformation opérée par l'enzyme, *Baudet*, avec l'un d'entre nous (loc. cit. I), a pu montrer que la caséine α subissait, sous l'influence du labferment, une transformation en une « paracaséine α », caractérisée, comme la paracaséine entière, par l'insolubilité de son sel calcique. La caséine β par contre pouvait être retirée sans modification d'une caséine emprésurée.

Dans le présent mémoire, nous montrons que le constituant γ demeure lui aussi intact après action de la présure. En effet, la γ -caséine extraite de la caséine native, et la γ -caséine extraite de caséine ayant subi l'attaque labique (paracaséine) se sont trouvées identiques.

Nos γ -caséines ont été préparées par précipitation en milieu aquo-alcoolique selon *Hipp* et coll⁵⁾. On obtient ainsi d'abord un produit contenant encore 36 % d' α - et de β -caséine. Pour la purification finale, *Hipp* précipite les α - et β -caséines à froid à pH 4,7, puis retire la γ -caséine de la solution par précipitation à son point isoélectrique au pH 5,8 à 30°. La précipitation à 30° nous ayant fourni un précipité d'aspect gélatineux qui se remet difficilement en solution, nous avons remplacé cette précipitation à chaud par une précipitation acétonique à 0°. Pour séparer la γ -caséine d'une impureté (plus lente à l'électrophorèse) nous avons effectué une précipitation fractionnée avec l'acétone au pH 5,4, à 0° également. La γ -caséine précipite, purifiée, dans la fraction 0–33 % acétonique (solutions à la concentration en protéines de 2 % env.). La fraction 33–66 % acétonique est considérable

¹⁾ *E. Cherbuliez & P. Baudet*, Helv. **33**, 1673 (1950), cité plus loin comme loc. cit. I.

²⁾ *O. Mellander*, Biochem. Z. **300**, 240 (1939).

³⁾ *E. Cherbuliez & J. Jeannerat*, Helv. **22**, 959 (1939).

⁴⁾ *E. Cherbuliez & P. Baudet*, Helv. **33**, 398 (1950), cité plus loin comme loc. cit. II.

⁵⁾ *N. J. Hipp, M. L. Groves, J. H. Custer & T. L. Mc Meekin*, Am. Soc. **72**, 4928 (1950).

ment enrichie en la substance accompagnant la γ -caséine (probablement la δ -caséine; cf. *Cherbuliez & Baudet*, loc. cit. II).

Nous n'avons pu reproduire de façon régulière les résultats obtenus par *Hipp*. Certains extraits éthanoliques, obtenus par nous en plus petite quantité que ne le laisse prévoir la description de *Hipp*, étaient par contre enrichis davantage en γ -caséine. Le cas contraire d'un extrait pauvre en constituant γ , et plus important en poids que la moyenne indiquée par cet auteur, a également été observé.

Le même fractionnement, selon *Hipp*, a été appliqué à la paracaséine, obtenue par emprésurage d'une solution de caséine (sel sodique) selon *Cherbuliez & Baudet*, loc. cit. I.

Avec la solution de paracaséine, on observe lors de l'adjonction de l'éthanol au pH 7,0, la précipitation nette d'un constituant protéinique, alors qu'au contraire, dans le cas de la caséine, l'addition de l'alcool a pour effet de fluidifier la solution, normalement très visqueuse, et de diminuer son opalescence.

Pour nous assurer que le traitement de la caséine et de la paracaséine à l'éthanol à 25° n'avait pas entraîné une dénaturation de nos γ -caséines, nous avons comparé celles-ci à une γ -caséine de caséine extraite sans intervention d'éthanol par un procédé ne recourant qu'à des variations de pH en milieu aqueux et aquo-acétonique à basse température (selon *Cherbuliez & Baudet*, loc. cit. I).

Deux observations nous ont permis d'améliorer les conditions d'obtention de la γ -caséine: 1. Sa séparation est facilitée par une décalcification poussée du caséinate de sodium. Dans ce cas la γ -caséine est retirée du mélange avant la β -caséine, contrairement au fractionnement de *Cherbuliez & Baudet*. On se retrouve dans les conditions de fractionnement observées par ces auteurs sur la paracaséine, où la séparation des différents protides est relativement aisée. – 2. On remarque un abaissement apparent du point de précipitation isoélectrique des constituants de la caséine en présence de sels neutres (ClNa p. ex.); ce phénomène, peu sensible pour les fractions α et β , est par contre très marqué avec la γ -caséine. C'est certainement ce qui a fait attribuer par *Cherbuliez & Baudet* (loc. cit I) à la γ -caséine un point isoélectrique au pH 5,2.

Après purification, nous avons obtenu par ces trois méthodes des γ -caséines en tous points semblables, ayant les caractéristiques indiquées par *Hipp* et coll.: teneur en phosphore = 0,11%; absorption à 280 $m\mu$ = 0,50 (1 g de substance par litre). Nos produits possédaient la même pureté électrophorétique que la γ -caséine de *Hipp*.

Un mélange en quantités égales de γ -caséine, retiré de la caséine, et de γ -caséine extraite de la paracaséine, a montré un seul composant à l'électrophorese.

Ces constatations montrent bien l'identité de la γ -caséine retirée de la caséine et de celle qu'on retire de la paracaséine. Il n'est toutefois

pas exclu qu'une partie de la γ -caséine ait été modifiée par le labferment, puisque les procédés de séparation et d'extraction de la γ -caséine sont loin d'être quantitatifs, et l'apparition dans la paracaséine d'une fraction représentant un produit dérivé de la γ -caséine aurait pu échapper.

Partie expérimentale.

a) *Caséine et paracaséine.* La caséine a été préparée à partir de lait écrémé frais selon Hipp et coll. Pour l'obtention de la paracaséine, la caséine extraite de 10 l de lait est emprésurée comme sel sodique 30 min. à 37° et au pH 6,2 (volume de la solution 2800 cm³), par 10 cm³ de présure Hansen. L'enzyme est ensuite désactivé par chauffage de 5 min. à 80°, et la solution, refroidie aussi rapidement que possible dans un bain d'eau glacée et utilisée directement pour le fractionnement.

b) *Séparation de la γ -caséine.* L'isolement de ce constituant à partir de la caséine a été conduit selon Hipp et coll. Quant à la paracaséine, nous avons utilisé exactement le même procédé; ici on note que lors de l'adjonction de l'éthanol à pH 7, il y a précipitation d'un constituant de la paracaséine, que nous n'avons pas examiné.

Dans le cas de la caséine nous avons obtenu parfois des résultats aberrants dont nous ne nous expliquons pas la cause (voir tableau donnant quelques essais aberrants). Les rendements semblent diminuer lorsque l'on opère à une température plus basse que 25° et la température optimale paraît comprise entre 25 et 30°. Nous n'avons pas fait une étude systématique de ces points. Les valeurs du tableau ont été observées pour le fractionnement de la caséine retirée de 10 l de lait. Pour le calcul des rendements, nous avons admis que cette quantité de caséine était de 280 g.

Tableau.

Premier fractionnement de la caséine à l'éthanol.
Résultats aberrants.

Rendement (%)	Teneur en γ -caséine (%) du produit obtenu	Enrichissement de γ dans le produit obtenu	Remarques
62,3	44	15×	Indications de Hipp
46	42	14×	t < 25°
21,5	60	20×	t > 25°; Précipitation avec trop de CIH
22	21	7×	t < 25; Précipitation avec pas assez de CIH

c) *Purification finale de la γ -caséine.* 4 g d'extrait enrichi en γ -caséine sont dissous en milieux aqueux avec le minimum de NaOH 0,1-n. (volume 300 cm³, pH final 6—6,3), et l' α et la β -caséine sont précipitées à froid par addition de CIH 0,1-n. jusqu'à un pH de 4,7. Ce précipité ayant été éliminé par centrifugation, une pointe de spatule d'acétate de sodium est ajoutée à la solution et son pH est ajusté à 5,8 par addition de NaOH 0,1-n., la solution étant toujours maintenue à 0°. On coule alors en mince filet, dans la solution agitée lentement de façon mécanique, de l'acétone jusqu'à une teneur de 50%. Le précipité séparé par centrifugation contient la presque totalité de la γ -caséine qui était présente dans la solution. Pour redissoudre le précipité, on l'additionne dans le tube à centrifuger d'un peu d'eau et chasse l'acétone par un courant d'air; ensuite on ajoute de l'eau pour porter le volume à 300 cm³. La solution est portée à froid au pH 4,7. On élimine par centrifugation prolongée le trouble présent à ce pH (α et β). La solution limpide est amenée à pH 5,4 par addition de NaOH 0,1-n., additionnée d'une pointe de spatule d'acétate de sodium et précipitée par addition d'acétone jusqu'à une concentration finale de 33%. Le précipité obtenu par centrifugation fournit une γ -caséine pratiquement pure (pureté 98%). Une nouvelle quantité, beaucoup plus faible, de γ -

caséine peut être obtenue en portant à 66% la teneur en acétone de la liqueur aquo-acétonique. Cette fraction est considérablement plus riche en constituant à migration électrophorétique plus lente (δ ?), mais peut être refractionnée à son tour.

d) *Extraction de la fraction γ de la caséine sans emploi d'éthanol.* A 10 l de lait frais écrémé, non pasteurisé, nous avons ajouté sous agitation, 548 cm³ d'oxalate de potassium en solution à 10%. Après un repos de 24 h. à 4° sous toluène (quelques cm³), le lait est séparé par centrifugation de l'oxalate de calcium précipité. L'on recueille un liquide clair, jaune verdâtre comme le lactosérum (pH 6,4—6,5). Par acidification de la liqueur au pH 4,5, à température ordinaire, au moyen de HCl 0,1-n., on obtient un précipité de caséine qui est séparé par filtration sur toile fine. Afin de séparer le lactosérum contaminant la caséine, on effectue 4 lavages du précipité en remettant chaque fois celui-ci en suspension homogène dans l'eau distillée à température ordinaire, en l'y maintenant 20 min. par agitation mécanique, et en filtrant à nouveau sur büchner.

La caséine remise en solution est délipidée par filtration sur Filter-Cel à pH 6. La γ -caséine a été obtenue suivant les indications de *Cherbuliez & Baudet* concernant le fractionnement de la paracaséine. La seule modification que nous ayons apportée est l'adjonction d'un lavage par l'eau distillée pendant 30 min. à 2°, du précipité d' α -caséine obtenu. L'eau de lavage du précipité est riche en γ -caséine (soluble à pH 4,7 en l'absence à peu près complète de NaCl).

e) *Méthodes analytiques.* 1. Les électrophorèses ont été effectuées, soit avec un appareil à optique *Philpot-Svensson*, soit avec un appareil de micro-électrophorèse, sur des solutions dans un tampon véronal-acétate de force ionique de 0,1, resp. au pH 7,5 ou 8,4, dialysées 48 h. contre le tampon, ce dernier étant renouvelé toutes les 12 h., pour les grandes électrophorèses; la dialyse a été effectuée pendant 2 à 12 h. dans des micro-dialyseurs prévus à cet usage, dans le cas des micro-électrophorèses. Dans les micro-électrophorèses, seul le gradient ascendant est visible.

2. Le dosage de l'azote protéique a été réalisé soit par micro-*Kjeldahl*, soit par dosage colorimétrique de la réaction du biuret, selon *Baudet & Giddey*¹⁾.

3. Pour le dosage du phosphore, la solution à désagréger est introduite dans un matras, additionnée de 2 cm³ d'acide perchlorique à 60%, et maintenue à ébullition jusqu'à décoloration et clarification. On ajoute alors env. 10 cm³ d'eau distillée et prolonge l'ébullition encore 1 h. On dose le phosphore présent sur une partie aliquote de la solution portée à 25 cm³, par colorimétrie au bleu de molybdène, selon *Clément de Traz*²⁾.

4. *Absorption UV.*: Déterminées au spectrophotomètre photoélectrique *Beckman DU* à quartz. Les solutions à examiner sont diluées dans un tampon d'électrophorèse à la concentration de 1 g par litre pour la β - et la γ -caséine et de 0,5 g par litre dans le cas de l' α -caséine.

Nous remercions vivement la direction des *Laiteries Réunies* à Genève, qui a bien voulu mettre à notre disposition du lait frais centrifugé à son arrivée.

Nos remerciements s'adressent également à la Maison *A. Spöhr* à Lugano, à laquelle nous sommes redevables d'une quantité importante de peptolab.

SUMMARY.

The purification of γ -casein has been studied. The separation of γ -casein from the other proteins of casein is rendered easier by preliminary decalcification (precipitation of Ca⁺⁺ as oxalate).

γ -casein extracted from either paracasein or natural casein proved to be identical. It seems therefore probable that rennin does not exert any effect on the γ -constituant when it attacks casein.

Laboratoire de Chimie organique et pharmaceutique,
Université de Genève.

¹⁾ *P. Baudet & C. Giddey*, *Helv.* **31**, 1879 (1948).

²⁾ *Clement de Traz*, Thèse 1065, Genève (1943).