

# ISOLEMENT DE L' $\alpha$ -LACTALBUMINE DU LAIT DE VACHE

M. DAUTREVAUX

*Laboratoire de Biochimie pathologique, Faculté de Médecine, Lille.*

Les techniques d'isolement de l' $\alpha$ -lactalbumine du lait de vache décrites dans la littérature sont relativement nombreuses; les fractionnements des protéines du lait de vache selon ASCHAFFENBURG et DREWRY<sup>1</sup> et selon GORDON et SEMMET<sup>2</sup> ne nous ayant donné que des rendements très faibles en  $\alpha$ -lactalbumine, nous avons été amené à étudier un procédé simplifié d'isolement de l' $\alpha$ -lactalbumine avec un rendement intéressant et dans un état de pureté permettant d'envisager une étude chimique.

Tel que nous le pratiquons, l'isolement de l' $\alpha$ -lactalbumine bovine peut se schématiser de la façon suivante (cf. tableau).

1<sup>o</sup> Élimination des caséines par acidification du lait écrémé à pH 4,6 au moyen d'acide chlorhydrique; l' $\alpha$ -lactalbumine du lactosérum obtenu après centrifugation représente 20 à 25 % des protéines totales (estimation par coloration au Noir Amidé des bandes d'électrophorèse sur papier réalisées à pH 8,6).

2<sup>o</sup> Élimination des globulines immunes par précipitation à pH 6 par le sulfate d'ammonium 2,3M (58 % de la saturation); la solution obtenue après centrifugation ne contient plus que les albumines et la lactosidérophiline : ces albumines comprennent essentiellement la sérumalbumine, les  $\beta$ -lactoglobulines et l' $\alpha$ -lactalbumine.

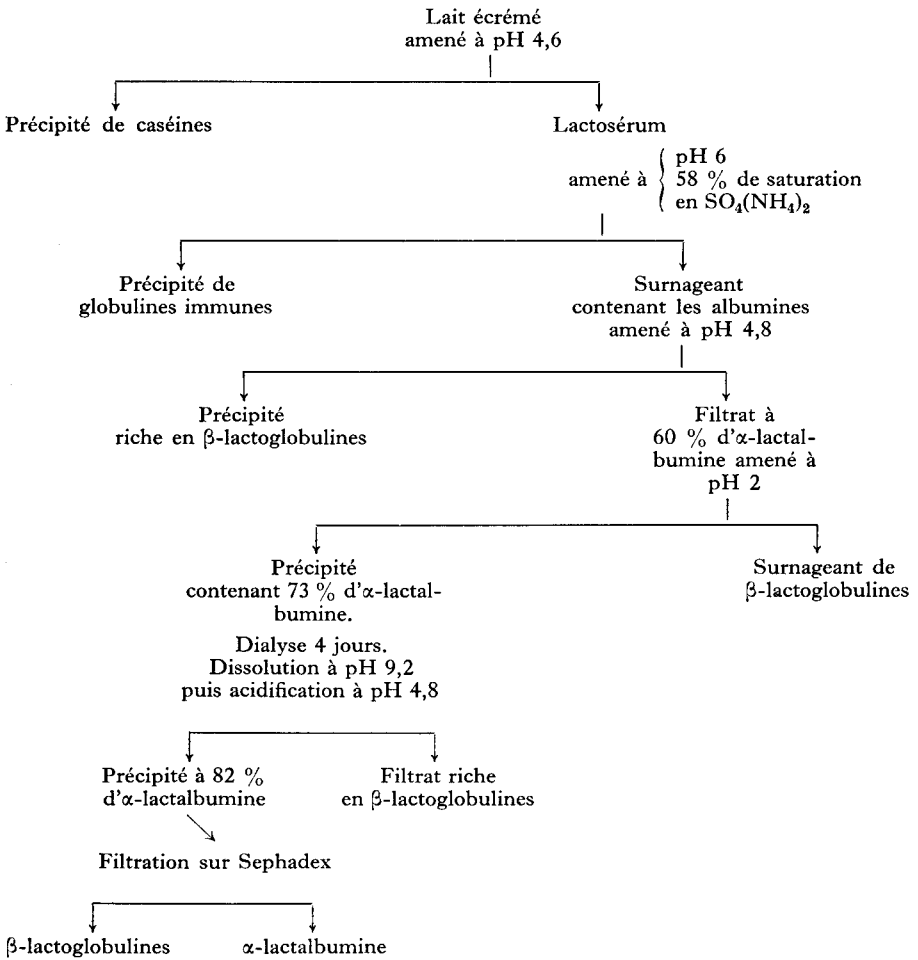
3<sup>o</sup> Enrichissement progressif en  $\alpha$ -lactalbumine par précipitation à pH 4,8 en présence de sulfate d'ammonium 2,3M : une partie des  $\beta$ -lactoglobulines précipite et le surnageant contient environ 60 % d' $\alpha$ -lactalbumine, 30 % de  $\beta$ -lactoglobulines et 10 % de sérumalbumine; l'acidification à pH 2 de ce surnageant précipite la totalité de l' $\alpha$ -lactalbumine et de la sérumalbumine ainsi qu'une partie des  $\beta$ -lactoglobulines. Ce précipité est recueilli, dialysé pendant 4 jours contre de l'eau distillée (rapport 2/1000 environ) avec changement de l'eau distillée deux fois par jour; le précipité ainsi dialysé est remis en solution à pH 9,2 par addition d'ammoniaque N et la solution est ajustée à pH 4,8; le précipité qui se forme contient environ 80 % d' $\alpha$ -lactalbumine et 20 % de  $\beta$ -lactoglobulines. Les conditions de cette précipitation à pH 4,8 en l'absence de sels minéraux sont relativement strictes et expliquent le laborieux travail d'enrichissement qui la précède. Des études que nous avons réalisées, il ressort que la solution des albumines du lait de vache soumise à cette précipitation doit avoir une teneur en protéines voisine de 1 g %

---

1. ASCHAFFENBURG R., DREWRY J., 1957. Improved method for the preparation of crystalline  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha$ -lactalbumin from cow's milk. *Biochem. J.*, **65**, 273-277.

2. GORDON W. G., SEMMETT W. F., 1953. Isolation of crystalline  $\alpha$ -lactalbumin from milk. *J. Amer. Chem. Soc.*, **75**, 328-330.

*Fractionnement des protéines du lait de vache  
en vue de l'isolement de l' $\alpha$ -lactalbumine*



avec une proportion de  $\beta$ -lactoglobulines inférieure à 30 % ; nous avons également constaté que la proportion d' $\alpha$ -lactalbumine du précipité augmentait si on laissait se poursuivre la précipitation durant plusieurs jours à + 4° C : pour une solution initiale à 75 % d' $\alpha$ -lactalbumine contre 15 % de  $\beta$ -lactoglobulines et 10 % de séralbumine, la proportion d' $\alpha$ -lactalbumine par rapport aux protéines totales du précipité passe de 82 % au bout de 12 heures à 93 % au bout de 7 jours ; pour éviter des risques de contamination bactérienne toujours possible, nous ne séparons le précipité de la solution surnageante qu'après un séjour de 4 jours au réfrigérateur.

4° Dans un dernier stade, l' $\alpha$ -lactalbumine est isolée par filtration d'une solution du dernier précipité à pH 4,8 sur une colonne de Sephadex. Nous utilisons une colonne de 3,5 cm de diamètre sur 60 cm de hauteur garnie de Sephadex G75 et équilibrée avec un tampon phosphate 0,1 M de pH 7. Le débit de la colonne est réglé à 12 ml/heure et des fractions de 3 ml sont recueillies au moyen d'un collecteur automatique ; pour chaque fraction, la concentration protéique est évaluée par mesure de la densité optique à 278 m $\mu$ . Il est ainsi possible, avec une reproductibilité quasi-parfaite d'une expérience à l'autre, de traiter 50 à 150 mg du dernier précipité à pH 4,8. Les protéines sont éluées dans l'ordre de leur poids moléculaire décroissant : la séralbumine, qui passe avec le front (toujours en très faible quantité dans le précipité à pH 4,8), puis les  $\beta$ -lactoglobulines et enfin l' $\alpha$ -lactalbumine. Les contrôles électrophorétiques sur papier montrent la parfaite homogénéité des fractions protéiques isolées ; cependant, les contrôles électrophorétiques sur gel d'amidon révèlent une légère contamination de l' $\alpha$ -lactalbumine par des  $\beta$ -lactoglobulines et la protéine « rouge » ; cette contamination n'est d'ailleurs pas surprenante étant donnée la faible taille des molécules à séparer ; une deuxième filtration sur Sephadex G75 réalisée dans les mêmes conditions doit certainement permettre l'obtention d'une préparation rigoureusement homogène.

Un fractionnement ainsi réalisé sur 5 litres de lait écrémé permet d'obtenir, au stade de la précipitation à pH 2, environ 2 g de protéines qui, après dissolution, laissent précipiter à pH 4,8 environ 900 mg d'une préparation contenant environ 90 % d' $\alpha$ -lactalbumine : la purification ultérieure sur Sephadex G75 de ce précipité à pH 4,8 permet de récupérer environ 500 mg d' $\alpha$ -lactalbumine homogène en électrophorèse sur papier. Dans les mêmes conditions, l'isolement des  $\beta$ -lactoglobulines est infiniment plus aisé et on peut les obtenir pratiquement pures dès le stade de la précipitation à pH 2, en présence de sulfate d'ammonium.