

ACTION DE L'ACIDE ACÉTIQUE ET DE L'ACIDÉ TRICHLORACÉTIQUE SUR LA CASÉINE (1)

Ch. ALAIS (2) et P. JOLLÈS

avec la collaboration technique de Nelly BERTHELOT

*Institut de Biochimie, Faculté des Sciences de Paris, Centre d'Orsay, Orsay (Seine-et-Oise)
et Laboratoire de Chimie biologique de la Faculté des Sciences, Paris*

SOMMAIRE

Lorsque l'on précipite différentes caséines de leur solution, en abaissant le pH à 4,6 par addition d'acide acétique, et lorsqu'on les précipite par l'acide trichloracétique à 12 p. 100 de concentration finale, des substances peptidiques restent en solution. Leur proportion dépend de l'espèce de caséine et des conditions de l'expérience. La caséine α est le constituant de la caséine entière de vache le plus sensible à l'action des réactifs acides.

A partir de la caséine α , les substances peptidiques solubles se forment à nouveau au cours d'un deuxième traitement. On peut trouver des analogies entre certaines de ces substances, d'une part, et les produits de la réaction de la présure sur la caséine α d'autre part. Cependant, la faible teneur en glucides des substances solubles dans les réactifs acides et surtout le fait que la caséine α résiduelle subit normalement l'action de la présure, (elle n'a pas été transformée en paracaséine au cours des précédents traitements), montrent que l'on ne peut assimiler l'action de ces réactifs à celle de la présure sur la caséine α originelle.

INTRODUCTION

La caséine est par définition la substance protéique qui précipite lorsqu'on acidifie le lait frais ; la précipitation atteint un maximum à pH 4,6. Le premier auteur qui ait clairement décrit la préparation de la caséine est QUEVENNE (1841) ; il effectuait la précipitation par l'acide acétique. La méthode a été codifiée par HAMMARSTEN (1874), qui utilisait le même acide. On emploie encore aujourd'hui cette

(1) Une partie de ces recherches a été présentée dans une thèse soutenue par l'un de nous (C. ALAIS) devant la Faculté des Sciences de Paris (1962).

(2) Chercheur contractuel de l'Institut national de la Recherche agronomique, C. N. R. Z., Jouy-en-Josas (S.-et-O.).

méthode, en utilisant différents acides organiques (acétique, lactique...) ou minéraux (chlorhydrique, sulfurique...). Quoi qu'il en soit, il y a nécessairement un contact plus ou moins long entre la protéine et un acide, à pH 4,6.

La dégradation de la caséine par les réactifs acides a été envisagée par HAMMARSTEN (1876), pour réfuter l'existence d'espèces protéiques douteuses dans le lait, comme la « lactoprotéine » ou la « galactine ». Récemment BEEBY et NITSCHMANN (1963) ont étudié l'effet de la précipitation de la caséine à pH 4,6, par l'acide chlorhydrique, et ont observé la séparation d'une fraction glycopeptidique.

L'acide trichloracétique (TCA) est le réactif le plus utilisé pour la précipitation des protéines du lait. ROWLAND (1938) a discuté des avantages et des inconvénients de plusieurs réactifs déprotéinisants (acides trichloracétique et phosphotungstique, tungstate de sodium, acétate d'uranyle) et a finalement choisi l'acide trichloracétique à la concentration finale de 12 p. 100. C'est ce même réactif que nous avons utilisé au cours de l'étude de l'action protéolytique de la présure sur diverses caséines (ALAIS *et al.*, 1953 ; ALAIS, 1963) et au cours de la préparation du caséino-glycopeptide (ou « NPN-12 p. 100-TCA ») (ALAIS et JOLLÈS, 1961). Dans la communication précédente, nous avons souligné le fait que la proportion d'azote non protéique (NPN) soluble dans TCA à 12 p. 100, avant l'action de la présure, était loin d'être négligeable, et devait être prise en considération dans l'interprétation des résultats.

Nous exposerons ci-après les résultats de nos recherches sur la libération de substances peptidiques par des réactifs acides agissant sur diverses caséines et principalement sur la caséine α de vache, et nous les interpréterons en tenant compte des propriétés de cette dernière protéine et en particulier de la réaction de la présure.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

Substrats

Les caséines entières du lait des ruminants sont obtenues par précipitation du lait frais et écrémé, à pH 4,6, par HCl N ; le précipité est abondamment lavé à l'eau puis redissous dans NaOH N ; la caséine est reprécipitée de la solution par HCl N, lavée à l'eau, à l'alcool et à l'éther ; la préparation de la caséine humaine exige des précautions particulières qui ont été précédemment décrites (ALAIS et JOLLÈS, 1962).

La caséine α de vache est obtenue par fractionnement de la caséine entière au moyen de l'urée, selon HIPP *et coll.*, (1952) et la caséine α de vache, par fractionnement au moyen de CaCl_2 et de l'éthanol selon MCKENZIE et WAKE (1961).

Méthodes analytiques

Le dosage de l'azote a été effectué par micro-Kjeldhal, dans les solutions de caséine et dans les filtrats obtenus après l'action du réactif acide ; les conditions d'action sont précisées pour chaque expérience. La proportion d'azote non protéique (NPN) formé est exprimée en p. 100 de l'azote de la solution initiale de caséine (N-caséine).

Dans les substances NPN sèches, on a dosé les osamines par la méthode de RONDLE et MORGAN (1955), les sucres réducteurs par la méthode de SCHULTZE *et coll.*, (1958), l'acide sialique par la méthode à l'acide thiobarbiturique de WARREN (1959), après hydrolyse par l'acide sulfurique 0,1 N.

Les acides aminés ont été déterminés au moyen de l'analyseur automatique « Technicon », à partir de 2 mg de substance NPN ayant subi une hydrolyse acide totale (HCl 6 N, 110°, 24 h). Nous avons employé la technique d'éluion de PIEZ et MORRIS (1960).

Les substances NPN sèches ont été obtenues par lyophilisation. Une partie de ces substances a préalablement subi une dialyse prolongée (6 jours).

Examens électrophorétiques

Ils ont été effectués sur bande de papier Whatman n° 1, dans le tampon volatil pyridine-acide acétique-eau (100 : 4 : 900, v/v) à pH 6,5, pendant 2 heures, avec un gradient de potentiel de 15 volts/cm. La révélation a été faite par coloration à la ninhydrine ou au vert de lissamine.

RÉSULTATS

I. — PROPORTION D'AZOTE NON PROTÉIQUE (NPN)
LIBÉRÉ PAR LES RÉACTIFS ACIDES

Nous avons fait agir sur les solutions de caséines, l'acide acétique en quantité juste suffisante pour abaisser le pH de 6,8 à 4,6 et l'acide trichloracétique pour avoir une concentration finale de 2 ou de 12 p. 100. La proportion de NPN, exprimée en p. 100 de l'azote de la caséine, dépend de l'espèce de caséine, du réactif et aussi, quoique moins fortement, de la concentration de la solution protéique.

TABLEAU I

Proportion de NPN avec différentes caséines
(N soluble p. 100 de N-caséine)

Caséines *	A pH 4,6 (avec l'acide acétique N)	Avec l'acide trichloracétique à la concentration finale ** de	
		2 p. 100	12 p. 100 (NPN-O)
<i>Caséine de vache</i>			
Caséine entière	0,85	0,30	0,13
Caséine α	0,75	0,30	0,12
Caséine κ	6,00	2,50	0,75
Caséine entière de brebis	0,70		0,20
Caséine entière de chèvre	0,65		0,17
Caséine humaine entière	6,40		1,80

* Solutions à 1,2-1,5 p. 100 de caséine, à pH 6,8, préparées juste avant l'expérience.

** 1 volume de solution d'acide trichloracétique à 4 ou à 24 p. 100 ajouté à 1 volume de solution de caséine.

Le tableau 1 présente les résultats obtenus à partir de 6 caséines en solutions ayant des concentrations voisines (1,2 à 1,5 p. 100). On voit que la solubilité apparente des caséines entières des ruminants est faible. Par contre la caséine entière humaine et la caséine κ de vache donnent des proportions de NPN relativement élevées, surtout à pH 4,6.

Le NPN soluble dans TCA à 12 p. 100 (nous l'avons précédemment appelé « NPN-O ») représente en moyenne 15 p. 100 du NPN soluble à pH 4,6 avec les caséines de vache, et 28 p. 100 avec les autres caséines. Il y a donc une proportion importante des substances solubles à pH 4,6 qui sont insolubles dans TCA.

La proportion de NPN soluble dans TCA à 12 p. 100 s'accroît au cours du vieillissement de la solution de caséine entière, bien que la conservation ait lieu à basse température (+ 3°) et en présence de toluène (0,05 p. 100) ; c'est ce que montre le tableau 2, pour trois solutions à différentes concentrations.

TABLEAU 2

Variation de la proportion de NPN en fonction du temps
(N soluble p. 100 de N-caséine)

Concentration de la caséine entière	Durée de conservation à + 3°			
	2 h	1 j	3 j	15 j
1 %	0,11	0,15	0,29	0,90
2 %	0,10	—	0,28	0,54
4 %	0,09	0,15	0,25	0,45

II. — ÉTUDE DES SUBSTANCES SOLUBLES, DÉTACHÉES DE LA CASÉINE α
PAR L'ACIDE TRICHLORACÉTIQUE (« NPN-O »),
ET DE L'ACTION DE LA PRÉSURE SUR LA CASÉINE α RÉSIDUELLE

Nous avons fait les expériences suivantes avec la caséine α :

a) Une solution à 2,14 p. 100 de caséine α est additionnée d'un égal volume de TCA à 24 p. 100 (concentration finale 12 p. 100). Le filtrat contient 0,0115 mg N/ml, ce qui représente 0,78 p. 100 de N-caséine.

b) La dialyse de ce filtrat, dans les conditions de la préparation du caséinoglycopeptide, montre que 27,4 p. 100 des substances azotées restent dans le sac de dialyse. Les 3/4 environ de ces substances sont donc éliminés. La partie non dialysable représente 0,214 p. 100 de N-caséine.

c) Le précipité de caséine, obtenu dans la première opération, est lavé puis amené à pH 6,8 et dialysé. On obtient une solution contenant 2 p. 100 de caséine α dénaturée par TCA. Une partie de cette solution, précipitée à nouveau par TCA à 12 p. 100, donne un filtrat dont le contenu en N représente 0,59 p. 100 de N-caséine. Une autre partie, soumise à l'action de la présure, se comporte comme la caséine originelle : elle donne un coagulum et le filtrat trichloracétique, obtenu après 40 mn d'action de la présure (0,03 UP/ml) contient 8,43 p. 100 de N-caséine ; la solution initiale donnait, dans les mêmes conditions 8,75 p. 100.

La dénaturation de la caséine par TCA ne modifie donc pas ses propriétés, en ce qui concerne la réaction de la présure.

Le NPN que l'on sépare du mélange réactionnel, après l'action de la présure sur la caséine κ , par précipitation avec TCA à 12 p. 100 renferme probablement le NPN-O ci-dessus, à côté du caséino-glycopeptide. Mais nous avons constaté qu'une petite partie du NPN traverse la membrane de dialyse.

On peut supposer que les substances dialysables proviennent de la fraction de la caséine qui est soluble dans TCA avant l'action de la présure ; car la faible perte d'azote au cours de la dialyse paraît proportionnelle à la quantité de NPN-O comme le montre le tableau 3. Ainsi, avec la caséine κ , la perte d'azote est plus élevée qu'avec la caséine entière ou la caséine α , mais la quantité de NPN-O est également plus élevée. Dans tous les cas, la proportion d'azote dialysable est un peu inférieure à celle du NPN-O.

TABLEAU 3

Dialyse des substances azotées non protéiques
(NPN-O et NPN-présure)

Substances	p. 100 de N-caséine		p. 100 de NPN-présure	
	NPN-O	NPN-présure	NPN-O	N-dialysable
NPN (12 %) de caséine entière .	0,09	1,75	5	3
NPN (12 %) de caséine α	0,11	1,12	10	6
NPN (12 %) de caséine κ	1,15	10,0	11,5	10

Composition du « NPN-O ».

Nous avons analysé la substance soluble dans l'acide trichloracétique à 12 p. 100 et non dialysable, obtenue à partir de la caséine κ (sans action de la présure). La composition en acides aminés est donnée dans le tableau 4, en p. 100 de substances sèches et en rapports moléculaires, en prenant pour unité (Cys) et Phe.

Les rapports moléculaires sont très différents de ce qu'ils sont dans la caséine κ . Les acides aminés aromatiques sont présents en faible proportion ; il y a deux fois plus de Ileu que de Leu. Le NPN-O paraît avoir une composition en acides aminés intermédiaire entre celle de la caséine et celle du caséino-glycopeptide. On peut supposer que l'acide trichloracétique détache de la caséine un peptide comparable au caséino-glycopeptide. Ce peptide se trouverait dans le filtrat, à côté d'un peu de paracaséine qui apporte dans le mélange : Cys, Tyr et Phe. Sur cette base on peut déduire de la composition du produit initial ce qui reviendrait à la paracaséine ; on obtient ainsi les valeurs données dans le tableau 4. On retrouve certaines caractéristiques du caséino-glycopeptide dans les rapports moléculaires que l'on peut établir sur la base Gly = Leu = 1. Les différences portent principalement sur Pro et Glu et sur Lys qui disparaît. On remarque que la proportion de la partie peptidique est faible dans le NPN-O.

L'examen électrophorétique sur papier rend plausible l'interprétation que nous avons faite de la composition en acides aminés. On observe la présence, dans le NPN-O, d'un composant migrant vers l'anode, comme le caséino-glycopeptide, à côté d'un autre composant peu mobile.

TABLEAU 4

Composition en acides aminés du « NPN-O »
p. 100 de la substance sèche
(r : rapports moléculaires)

	Produit initial		Produit initial après déduction de la paracaséine α		Caséino-glycopeptide * r
	%	r	%	r	
Asp	2,9	9	2,4	3	4
Thr	4,8	16	4,6	7	9
Ser	4,2	16	3,9	6	6
Glu	10,1	27	8,8	17	9
Pro	2,0	7	1,4	2	7
Gly	0,6	3	0,5	1	1
Ala	1,3	6	0,9	2	5
Cys	0,3	1	0,2	0,3	0
Val	3,3	11	3,0	4-5	5
Ileu	2,3	7	1,9	3	5
Leu	1,2	4	0,7	1	1
Tyr	0,7	1-2	0	0	0
Phe	0,4	1	0	0	0
Lys	0,6	1-2	0	0	3
Total	34,7				

* JOLLÈS et coll. (1961).

TABLEAU 5

Composition de la partie glucidique des NPN
p. 100 de la substance sèche

	Sucres neutres	Osamine	Acide sialique *
<i>NPN-O</i>			
1° Traitement avec TCA-12 p. 100	1,20	1,25	1,30
<i>NPN soluble à pH 4,6</i>			
1° Traitement avec CH ₃ COOH (SA-4)	0,72	0,42	0,10
2° Traitement avec CH ₃ COOH (SA-2)	0,58	0,38	0,18
Caséino-glycopeptide α	5,9 à 7,4	5,0 à 7,0	9 à 14,3
Caséine α	1,3 à 1,6	1,2 à 1,8	1,7 à 2,4

* En acide N-acétylneuraminique.

La composition de la partie non-peptidique est indiquée dans le tableau 5. On voit que le NPN-O contient les trois types de glucides trouvés dans le caséino-glycopeptide (ALAIS et JOLLÈS, 1961), mais en proportions beaucoup plus faibles. La somme des résultats analytiques est loin d'atteindre 100 ; nous ignorons la nature de l'indosé.

III. — ÉTUDE DES SUBSTANCES SOLUBLES, DÉTACHÉES DE LA CASÉINE κ AU COURS DE LA PRÉCIPITATION A PH 4,6 PAR L'ACIDE ACÉTIQUE, ET DE L'ACTION DE LA PRÉSURE SUR LA CASÉINE κ RÉSIDUELLE

Nous avons répété, avec l'acide acétique, en quantité juste suffisante pour abaisser à 4,6 le pH de la solution, les expériences faites précédemment avec l'acide trichloracétique. La solution de caséine κ , à la concentration de 1 p. 100, a un pH voisin de 6,7. Il faut environ 0,5 m éq d'acide acétique par gramme de caséine κ pour atteindre pH 4,6 et faire flocculer la protéine. On obtient un premier surnageant limpide, SA-1, séparé par centrifugation ; il contient des substances azotées représentant 6,0 p. 100 de l'azote ou 6,9 p. 100 du poids de la caséine κ originelle. Le premier précipité est redissous dans l'eau et l'on effectue une deuxième précipitation comme ci-dessus. Le deuxième surnageant SA-2 contient des substances azotées qui représentent 3,8 p. 100 de l'azote de la caséine κ précipitée une première fois à pH 4,6 ; ce qui correspond à 4,0 p. 100 de l'azote de la caséine κ originelle, ou 4,7 p. 100 de son poids.

Le chauffage des surnageants SA-1 et SA-2 à 80° pendant 10 mn provoque l'apparition d'un trouble net ; ceci ne se produit ni avec le filtrat trichloracétique contenant le NPN-O, ni avec la solution de caséine κ .

Au cours de la dialyse contre l'eau distillée, on constate que 28 p. 100 seulement de la substance SA-1 traverse la membrane ; cette proportion est donc bien inférieure à celle que l'on observe avec le « NPN-O ».

Le deuxième précipité a une consistance très ferme et se dissout difficilement dans l'eau, à pH 6,7, à moins d'employer un émulsionneur (« Ultra-Turrax »). Sur la solution nous avons fait agir la présure (0,03 U. P./ml) ; la réaction se produit comme avec la caséine κ originelle ; après la flocculation le surnageant contient des substances solubles représentant 18 p. 100 en poids de la caséine traitée, alors que la caséine κ non dénaturée en donne 25 p. 100 en moyenne (BLONDEL et ALAIS, 1964).

Nous avons fait une autre expérience en traitant le deuxième précipité par l'urée 6 M, qui accélère sa dissolution. Après une longue dialyse, pour éliminer complètement l'urée et, éventuellement, des produits de dégradation, nous avons constaté que la présure réagissait normalement sur la caséine κ résiduelle ; après la coagulation, le surnageant contient des substances solubles représentant 33 p. 100 de la caséine traitée.

Les examens électrophorétiques des substances solubles à pH 4,6 (sans dialyse), schématiquement représentées sur la figure 1, montrent que la plus grande partie de la substance réagissant avec la ninhydrine ou avec le vert de lissamine, se trouve concentrée en une tache ayant une très faible mobilité par rapport aux acides aminés neutres. Avec le NPN résultant du deuxième traitement à pH 4,6 on n'observe qu'une

seule tache nette. Dans les deux examens il n'est pas apparu de constituant possédant une assez forte charge négative, comparable au caséino-glycopeptide. Après une dialyse prolongée, le constituant migrant vers la cathode disparaît.

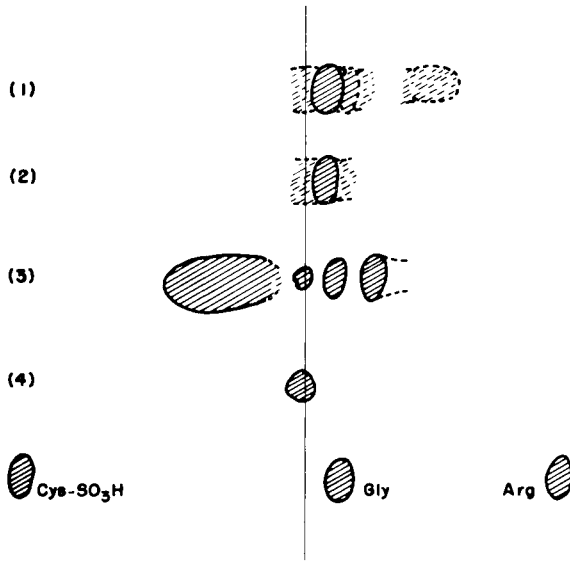


FIG. 1. — Diagrammes d'électrophorèse sur papier (15 v/cm, 2 h, pH 6,5, révélation par la ninhydrine)

- (1) Substances solubles totales à pH 4,6 (SA-1).
- (2) Substances solubles totales à pH 4,6 (SA-2).
- (3) Substances solubles totales formées par la présure après un court temps de réaction sur la caséine α .
- (4) Caséine α .

Composition du « NPN (pH 4,6) »

La composition de la substance soluble à pH 4,6 et non-dialysable est présentée dans les tableaux 5 et 6. Le tableau 5 montre que cette substance contient très peu d'acide sialique, environ 20 fois moins que la caséine α ; la teneur en sucres neutres et en osamine est également très faible. Des valeurs comparables ont été obtenues à partir des substances résultant d'un premier ou d'un deuxième traitement de la caséine α à pH 4,6. A ce point de vue, la substance « NPN (pH 4,6) » est très différente de celle que la présure détache de la caséine α .

Tous les acides aminés de la caséine α sont présents dans le « NPN (pH 4,6) » notamment les acides aminés aromatiques et soufrés, l'arginine et l'histidine ; on sait que le caséino-glycopeptide ne contient pas ces acides aminés. Les rapports moléculaires, calculés sur la base Cys = 1 sont proches de ceux que l'on a déterminés dans la caséine α (JOLLÈS et coll., 1962). Bien que la proportion de la proline soit nettement plus forte et celle des acides aminés aromatiques plus faible dans le NPN que dans la caséine α , il y a une parenté évidente entre ces deux substances. Il est à noter qu'une analyse préliminaire de la substance SA-1, avant dialyse, avait révélé un fort excès des acides aminés basiques sur les acides aminés acides (28/12).

La dialyse élimine un peptide basique, que l'on observe sur l'électrophorogramme. Dans la substance purifiée par dialyse et dans la caséine α ces acides sont dans un rapport voisin (respectivement 25/59 et 22/53).

TABLEAU 6

Composition en acides aminés du « NPN (pH 4,6) »
p. 100 de la substance sèche
(r : rapports moléculaires)

	NPN (pH 4,6)		Caséine *
	p. 100	r	r
Asp	6,55	19	17
Thr	6,66	21	17
Ser	5,53	20	18
Glu	15,86	40	36
Pro	10,00	33	23
Gly	1,69	8	5
Ala	4,42	19	18
Cys	0,78	1	1
Val	4,77	15	13
Met	0,60	2	2
Ileu	4,73	14	14
Leu	4,66	14	14
Tyr	4,73	10	13
Phe	2,90	7	8
Lys	5,37	14	12
His	1,81	4	3
Arg	3,77	7	7
	84,64		

* P. JOLLÈS et coll. (1962).

DISCUSSION

La simple précipitation isoélectrique des caséines n'est pas un traitement anodin ; nos résultats confirment ceux d'autres auteurs, précédemment cités, concernant la libération de substances peptidiques au cours de ce traitement. Nous avons montré qu'une dégradation comparable se produit lorsque l'on traite la caséine par l'acide trichloracétique, dans les conditions utilisées pour l'étude des réactions enzymatiques ; cependant, les substances solubles libérées par l'acide trichloracétique (NPN-O) ont une composition différente de celles qui sont libérées à pH 4,6 par l'acide acétique. Il ne s'agit pas simplement de la solubilité réelle de la protéine dans les réactifs acides, comme le démontrent les résultats analytiques et les examens électro-

phorétiques. Le « NPN-O » contient un peptide acide et non dialysable, comme le caséino-glycopeptide (mais la teneur en glucides du NPN-O est faible) et le « NPN (pH 4,6) » contient un peptide basique dialysable. Cependant, dans cette dernière substance, le constituant dominant est proche de la caséine α par sa composition en acides aminés.

Nos résultats ne nous permettent pas de conclure que les réactifs acides libèrent des fragments solubles en coupant une liaison principale, telle qu'une liaison peptidique. La formation de complexes relativement stables entre une protéine et des polypeptides est connue ; ces complexes peuvent être précipités par les sels et redissous sans décomposition ; c'est ainsi qu'ont été purifiées des hormones (ACHER et *coll.*, 1960) ; elles sont séparées de la protéine support par l'acide trichloracétique à 10 p. 100. La décomposition d'un complexe, avec rupture de liaisons secondaires par les réactifs acides, apporte une explication plausible dans le cas de la caséine entière ; on sait que des substances ayant un point isoélectrique élevé (jusqu'à 8,0) précipitent avec les caséines authentiques (α_s , β , κ) à pH 4,6-4,7. En ce qui concerne la caséine α , il faudrait supposer que de tels complexes résistent au traitement par l'urée 6 M, qui intervient dans la préparation de cette protéine.

La caséine α est le constituant le plus sensible à ces traitements. En considérant les valeurs présentées dans le tableau 1, on peut supposer que le NPN formé à partir de la caséine entière provient uniquement de la fraction α ; d'après les valeurs obtenues avec TCA à 12 p. 100 ou à pH 4,6, la caséine entière contiendrait respectivement 17,5 ou 14 p. 100 de caséine α . Ces proportions sont proches de celles précédemment déduites des études physiques (WAUGH et Von HIPPEL, 1956) et chimiques (ALAIS, 1962). La sensibilité particulière de la caséine α au traitement à pH 4,6 a été récemment observée par MARIER et *coll.*, (1963) ; ils ont montré que de l'acide sialique, sous forme combinée, passait dans la solution tampon d'acétate.

BEEBY et NITSCHMANN (1963), en précipitant la caséine α à pH 4,6, par HCl, ont isolé une substance glycopeptidique qu'ils considèrent comme très proche de celle qui résulte de l'action de la présure ou de l'action de l'urée sur cette caséine. D'autre part, ils considèrent que la caséine α résiduelle, après le traitement à pH 4,6 ou par l'urée, ressemble d'une façon « marquée » à la paracaséine. Nos expériences avec l'acide acétique ont conduit à des résultats différents. Nous essaierons plus tard de savoir si la nature de l'acide utilisé pour la précipitation à pH 4,6 influe sur les résultats ; mais il faut noter la très faible concentration de l'acide ; dans nos expériences, le mélange final était à 0,005 M en acide acétique, pour la première précipitation.

Nos résultats révèlent des différences entre les produits solubles libérés par la présure, d'une part, et par la précipitation à pH 4,6 d'autre part. De plus, après deux traitements successifs à pH 4,6 (ayant détaché près de 12 p. 100 de la substance originelle), la caséine α résiduelle subit encore normalement l'action floculante et protéolytique de la présure (alors que la paracaséine α ne la subit plus) ; il en est de même après le traitement de la caséine α par l'urée. Il faut remarquer enfin que les traitements à pH 4,6 ne détachent qu'une faible proportion des glucides de la caséine α (2,5 p. 100) alors que la présure en détache 75 p. 100 (ALAIS et JOLLÈS 1961).

Il découle de ces résultats que la présure et la précipitation à pH 4,6 n'ont pas la même action sur la caséine α . D'autre part, il ne paraît pas possible

qu'un peptide semblable au caséino-glycopeptide et en proportion comparable puisse être formé aux dépens des substances solubles à pH 4,6. Nos résultats ne sont donc pas en faveur de l'hypothèse de BEEBY et NITSCHMANN (1963), selon laquelle la présure détache, de la caséine α , en premier lieu, une fraction glycopeptidique par coupure d'une liaison secondaire, comme le ferait la précipitation à pH 4,6 ou l'urée, le caséino-glycopeptide étant formé en second lieu par rupture d'une liaison de covalence.

L'action de l'acide trichloracétique sur la caséine α ne peut non plus être assimilée à celle de la présure car, dans le premier cas, la caséine α n'est pas transformée en paracaséine. La proportion de « NPN-O » varie avec les conditions de l'expérience. Nous avons observé qu'elle augmente au cours de la conservation de la caséine entière ; la cause en est probablement la protéase étudiée par WARNER et POLLIS (1945), qui est fortement attachée à ce substrat. Dans une précédente communication (ALAIS, 1963), nous avons relevé des valeurs très variables selon les auteurs, en ce qui concerne la proportion de « NPN-O » avec la caséine α ; il arrive même qu'elle soit supérieure à celle du NPN résultant de l'action propre de la présure, auxquelles le « NPN-O » vient s'ajouter. Dans nos précédentes études sur l'action de la présure, la proportion de « NPN-O » est faible et ne représente finalement que 2 p. 100 du caséino-glycopeptide.

La solubilité apparente de la caséine humaine dans les réactifs acides est beaucoup plus élevée que celle des autres caséines entières. Nous n'avons pas encore étudié la fraction « NPN-O » provenant de la caséine humaine, mais on peut déjà souligner cet écart dans les proportions, qui révèle une nouvelle différence entre cette caséine et celle des ruminants (ALAIS et JOLLÈS, 1962).

Reçu pour publication en mars 1964.

REMERCIEMENTS

Ce travail a bénéficié d'une subvention du Ministère de l'Agriculture des États-Unis (Grant FG-FR-112 ; U. S. Public Law 480).

SUMMARY

ACTION OF ACETIC AND TRICHLOROACETIC ACIDS ON CASEIN

When different caseins are precipitated from solution by lowering the pH to 4.6 by the addition of acetic acid, and when they are precipitated by trichloroacetic acid at a final concentration of 12 p. 100, peptide substances remain in solution. Their proportion depends on the type of casein and the experimental conditions. α -casein is the constituent of whole casein of cow milk which is the most sensitive to the acidic reagents. Casein of human milk has also a relatively high solubility in these reagents. The proportion of these soluble substances in solutions of casein increases with time.

α -casein of cow milk has been studied in detail and the results have been interpreted taking into account the special properties of this protein which is the specific substrate for rennet. The proportion of soluble substances is 6 p. 100 with acetic acid and 0.75 p. 100 with trichloroacetic acid

(12 p. 100 with rennet). These substances formed during a second treatment with the same reagents. In both cases the residual α -casein reacts normally with rennet.

At pH 4.6 a dialysable basic peptide is liberated along with a non-dialysable constituent which has some similarities with α -casein in the molecular ratios of its amino acids. With trichloroacetic acid there is a non-dialysable acidic peptide in solution along with a constituent which migrates little during electrophoresis (at pH 6.5); we have compared them to caseinoglycopeptide and to *para*- α -casens obtained by the action of rennet. In spite of some similarities, the low carbohydrate content of the substances soluble in the acid reagents, and above all the fact that the residual α -casein undergoes the normal reaction with rennet (it has not been changed to *para*-casein during treatment) show that the action of these reagents cannot be compared with to the action of rennet on the original α -casein.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ACHER R., LIGHT A., du VIGNAUD V., 1960. Purification of oxytocin and vasopressin by Way of protein complex. *J. Biol. Chem.*, **233**, 116-120.
- ALAIS C., et al. 1953. Das Lab und seine Wirkung auf das Casein der Milch. *Helv. Chim. Acta*, **36**, 1955-1968.
- ALAIS C., 1956. Étude des substances azotées non protéiques séparées de la caséine sous l'action de la présure. *XIV^e Congr. Intern. Laiterie*, **2**, 823-839.
- ALAIS C., JOLLÈS P., 1961. Étude comparée des caséino-glycopeptides formés par l'action de la présure sur les caséines de Vache, de Brebis et de Chèvre. II. Étude de la partie non peptidique. *Biochim. Biophys. Acta*, **51**, 315-322.
- ALAIS C., JOLLÈS P., 1962. Human casein and its caseino-glycopeptide. *Nature*, **196**, 1098-1099.
- ALAIS C., 1962. Étude de l'action enzymatique de la présure sur la caséine. *Thèse, Paris*.
- ALAIS C., 1963. Étude de la libération de l'azote, du phosphore et de l'acide sialique non protéiques, au cours de l'action de la présure sur la caséine. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **3**, 391-404.
- BEEBY R., NITSCHMANN Hs., 1963. The disruption of the α -casein complex. *J. Dairy Sci.*, **30**, 7-16.
- BLONDEL J., ALAIS C., 1964. (Communication en préparation).
- HAMMARSTEN O., 1874. Über den chemischen Verlauf bei der Gerinnung des Caseins mit Lab. *Maly's J. ber. Tierchem.*, **4**, 135-145.
- HAMMARSTEN O., 1876. Dans *La Science Fromagère*, par BEAU M. et BOURGAIN C., Paris, 1926, p. 15.
- HIPP N. J., et al. 1952. Séparation of α -, β and κ -caseins *J. Dairy Sci.*, **35**, 272-281.
- JOLLÈS P., ALAIS C., JOLLÈS J., 1961. Étude comparée des caséino-glycopeptides formés par action de la présure sur les caséines de Vache, de Brebis et de Chèvre. I. Étude de la partie peptidique. *Biochim. Biophys. Acta*, **51**, 309-314.
- JOLLÈS P., ALAIS C., JOLLÈS J., 1962. Amino-acid composition of α -casein. *Arch. Biochem. Biophys.*, **98**, 56-7.
- MARIER J. R., TESSIER H., ROSE D., 1963. Sialic acid as an index of α -casein content of Bovine Skim-milk. *J. Dairy Sci.*, **46**, 373-379.
- McKENZIE H. A., WAKE R. G., 1961. An improved method for the isolation of α -casein. *Biochim. Biophys. Acta*, **47**, 240-242.
- PIEZ K. A., MORRIS L., 1960. An modified procedure for the automatic analysis of aminoacids. *Anal. Biochem.*, **1**, 187.
- QUEVENNE T. A., 1841. Mémoire sur le lait. *Ann. Hyg. Publ. Paris*.
- RONDLE C. J., MORGAN W. T. J., 1955. The determination of glucosamine and galactosamine. *Biochem. J.*, **61**, 586-590.
- ROWLAND S. J., 1938. The precipitation of the proteins in milk. *J. Dairy Res.*, **9**, 30-38.
- SCHULTZE H. E., SCHMIEDTBERGER R., HAUPT H., 1958. Untersuchungen über die gebundenen Kohlenhydrate. *Biochem. Z.*, **329**, 490-507.
- WARNER R. C., POLLIS E., 1945. On the presence of proteolytic enzyme in casein. *J. amer. Chem. Soc.*, **67**, 529-532.
- WARREN L., 1959. The thiobarbituric acid assay of sialic acid. *J. Biol. Chem.*, **234**, 1971-1975.
- WAUGH D. F., V. HIPPEL P. H., 1956. α -casein and the stabilisation of casein micelles. *J. amer. Chem. Soc.*, **78**, 4576-4582.