

ÉTUDES EN VUE DE DÉTERMINER LES BESOINS EN ACIDES AMINÉS SOUFRÉS.

I. — PRÉPARATION ET UTILISATION DE LA CASÉINE OXYDÉE

Francine GAUDIN-HARDING, Fernande CHATAGNER,
Henriette SUSBIELLE, Ryssalatou AYEVA

avec la collaboration technique de Christiane PORTEMER et Brigitte JOYEUX

*Centre de Recherches sur la Nutrition,
Centre national de la Recherche scientifique, 92-Bellevue,
Laboratoire de Chimie biologique, Paris,-6^e*

SOMMAIRE

La composition en acides aminés de la caséine oxydée préparée selon la technique de TOENNIES modifiée par MILLER a été déterminée après hydrolyse acide au moyen de l'auto-analyseur « Technicon » et comparée à celle de la caséine lactique. Le dosage du tryptophane après hydrolyse alcaline a été effectué séparément. L'oxydation performique entraîne la disparition de la totalité de la méthionine et de la cystine, de la plus grande partie du tryptophane et la destruction partielle de la tyrosine.

Des essais biologiques montrent que la caséine oxydée est impropre à la croissance des rats mais que, convenablement supplémentée, elle permet une croissance équivalente à celle obtenue avec la caséine dévitaminée. Aucun effet toxique de la caséine oxydée n'est observé. Les essais nutritionnels sont effectués chez des rats albinos (*Wistar*) et pie (*Long Evans*.)

INTRODUCTION

Dans les recherches sur la détermination des besoins en acides aminés soufrés, on se heurte à la difficulté de choisir la protéine de base à utiliser. Si l'on emploie une protéine pauvre en acides aminés soufrés telle que la caséine, il faut se placer dans des conditions bien déterminées pour mettre en lumière l'effet bénéfique de l'addition de ces acides aminés et notamment se placer à des taux protéiques peu élevés. Si l'on essaie de résoudre le problème par l'emploi d'un mélange d'acides aminés purs, outre le prix très élevé du mélange, on se heurte à une autre difficulté, la répugnance des animaux à ingérer de tels mélanges.

Il convient donc de disposer d'une protéine de base dont les acides aminés soufrés seront soit détruits, soit rendus indisponibles, les autres amino-acides n'étant que peu touchés. On pourra alors préparer des régimes où l'on fera varier à volonté d'une

part le taux protéique global et d'autre part le taux d'acides aminés soufrés. La caséine oxydée répond bien à ce critère. Quelques auteurs l'ont déjà utilisée pour différents objectifs et cela chez le Rat (BENNET et coll, 1942 ; POMERANZE et coll, 1959) et le Poulet (MILLER et coll, 1965).

BENNET et TOENNIES constatent que l'oxydation performique rend la caséine inapte à la croissance par suite de la destruction du tryptophane, de la transformation de la cystéine en acide cystéique et de la méthionine en méthionine sulfone. La méthionine sulfone produite par fixation de deux atomes d'oxygène n'est pas utilisée à des fins anaboliques (BENNET, 1941; NJAA, 1962) à l'encontre de la méthionine sulfide produite par fixation d'un seul oxygène (BENNET, 1939).

Dans les essais de BENNET et TOENNIES, la supplémentation de la caséine oxydée par du tryptophane, de la cystine et de la méthionine a permis une reprise de la croissance, reprise toutefois moins importante que celle donnée par la caséine initiale non traitée.

Pour notre part nous avons repris cette question en préparant la caséine oxydée selon la méthode de TOENNIES modifiée par MILLER et nous avons analysé plus complètement le produit obtenu pour juger de l'altération éventuelle de tous les acides aminés composant cette protéine. Nous avons ensuite comparé les aptitudes à la croissance, d'une part de la caséine reconstituée à partir de la caséine oxydée et, d'autre part, de la caséine initiale (lactique ou dévitaminée).

PRÉPARATION DE LA CASÉINE OXYDÉE

L'oxydation de la caséine est effectuée par l'acide performique naissant selon la technique de TOENNIES (1942) modifiée par MILLER (1965).

Le procédé expérimental est le suivant :

Prélever 400 g de caséine (qualité lactique des Établissements Byla), la tamiser au tamis 80. Incorporer petit à petit dans deux litres d'acide formique. Agiter continuellement jusqu'à dissolution complète. Ajouter alors 400 ml d'eau oxygénée à 100 volumes et prolonger l'agitation de 2 à 3 minutes. Laisser au repos 1 heure. Ajouter 10 litres d'eau. Refroidir dans un bain froid. Ajouter lentement en agitant de l'ammoniaque concentrée jusqu'à précipitation à pH 4,7 sans laisser la température dépasser 35°. Filtrer sur voile de Tergal dans un grand bûchner. Ajouter 10 litres d'eau pour remettre le précipité en suspension. Laisser reposer et décanter. Laver deux fois à l'eau en remettant le précipité en suspension, repos, décantation, filtration. Remettre en suspension dans 10 litres d'eau. Ajouter de la soude concentrée pour dissoudre le précipité (pH 7 à 8). Précipiter à nouveau à pH 4,6 par de l'acide chlorhydrique. Décanter, filtrer. Remettre en suspension dans l'eau. Décanter. Filtrer. Mettre en suspension dans 1 litre de méthanol en agitant. Filtrer. Laver par un litre de méthanol. Étaler sur des plateaux placés dans une étuve sous vide en présence de silicagel. Après dessiccation complète, broyer le précipité jusqu'à obtention d'une poudre que l'on passe au tamis n° 80. Rendement environ 320 g soit 80 p. 100.

ANALYSE DE LA CASÉINE OXYDÉE COMPARÉE A CELLE DE LA CASÉINE LACTIQUE

100 mg de caséine normale ou oxydée sont additionnés de 4 ml d'acide chlorhydrique 6 N (Merck) et hydrolysés 36 heures en tube scellé à 110°.

Après filtration, l'hydrolysate est concentré à sec au rotavapor et le résidu est repris dans un volume déterminé d'acide chlorhydrique 0,1 N. L'analyse des acides aminés de cette préparation est effectuée à l'auto-analyseur « Technicon » selon la méthode de PIEZ et MORRIS (1961), modifiée par HAMILTON (1963).

L'examen des profils des chromatogrammes fait apparaître certaines différences qui sont représentées sur les figures 1 et 2 : il y a disparition totale de la méthionine et de la cystéine dans l'échantillon de caséine oxydée, où l'on observe par contre la présence d'acide cystéique et de méthionine

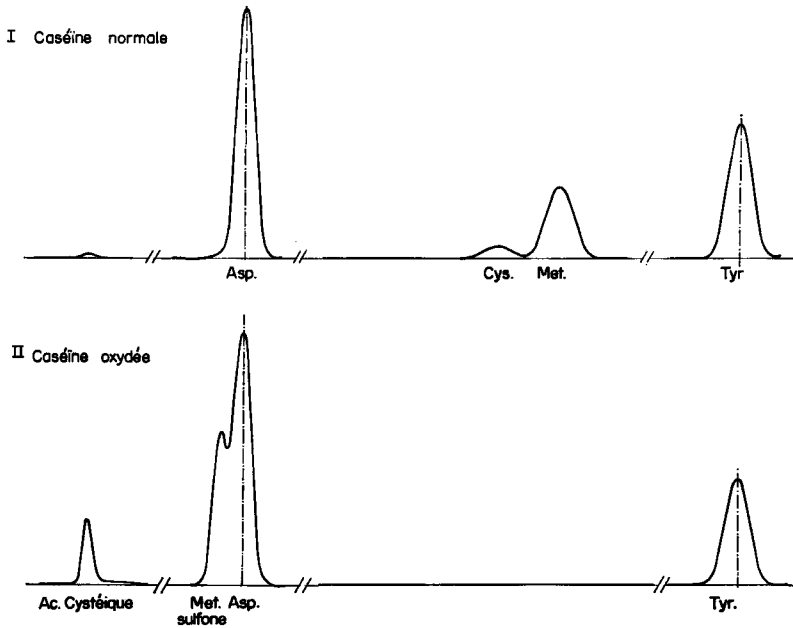


FIG. 1 et 2. — Analyses comparées de la caséine normale et oxydée. Parties caractéristiques des profils de chromatogrammes

TABLEAU I

Teneur en acides aminés de la caséine normale (A) et de la caséine oxydée (B)

Les résultats sont exprimés en μ mole de chaque acide aminé/g caséine ; pour la caséine normale, la valeur indiquée correspond à la moyenne de deux déterminations (résultats très homogènes) ; pour la caséine oxydée, à la moyenne de 5 déterminations.

	A	B
Acide cystéique	—	35
Aspartique	245	270
Thréonine	175	163
Sérine	230	233
Acide glutanique	755	758
Proline	400	412
Glycocolle	121	123
Alanine	166	166
Valine	240	266
Cystéine	16	—
Méthionine	69	—
Isoleucine	175	177
Leucine	345	356
Tyrosine	129	103
Phénylalanine	149	149
Lysine	300	274
Histidine	93	90
Arginine	100	100

sulfone. L'analyse quantitative des acides aminés (tabl. 1) montre qu'il n'y a pas de différences appréciables entre les teneurs de la plupart des acides aminés dans des préparations, contenant une même quantité sous forme d'azote de caséine non oxydée et de caséine oxydée. Toutefois la tyrosine est diminuée d'environ 20 p. 100 dans la caséine oxydée ; en effet on trouve 1,42 μ mole de tyrosine dans un hydrolysate, contenant 1 mg d'azote, de caséine non oxydée alors que le chiffre correspondant est de 1,12 μ mole pour une préparation de caséine oxydée.

Le tryptophane est dosé après hydrolyse alcaline par une méthode chimique (détermination du noyau indolique, ECKERT, 1943). La caséine lactique contient 1 p. 100 de tryptophane soit 1,22 p. 100 rapporté à 16 g d'azote et la caséine oxydée 0,24 p. 100 soit 0,29 p. 100 rapporté à 16 g d'azote.

ESSAIS SUR ANIMAUX

Deux séries d'essais biologiques sont poursuivies pendant une période de 16 ou 21 jours sur de jeunes rats peu après le sevrage. Ces animaux sont pesés régulièrement. Le premier essai porte sur deux lots de six rats *Long Evans* (3 σ et 3 φ) d'un poids moyen de 74,6 g, un lot recevant le régime de base I, l'autre successivement les régimes II et III. Le deuxième essai porte sur deux groupes de six rats σ de race *Wistar CF* d'un poids moyen de 49,5 g, l'un recevant le régime III l'autre le régime IV.

Le régime I a la constitution suivante en mg par kg de régime :

Caséine lactique	100
Glycocolle.....	3
Huile d'arachide	100
Cellulose	20
Mélange salin	40
Mélange vitaminique complet	10
Amidon.....	637
Saccharose	100

Le régime II est analogue au régime I avec remplacement de la caséine lactique par de la caséine oxydée et supplémentation par du L-tryptophane (1,2 p. 1000) et de la tyrosine (1 p. 1000). Le taux isoazoté est conservé en jouant sur le taux de glycocolle.

Le régime III est analogue au régime II avec supplémentation en DL-méthionine (3 p. 1000) et cystine (0,4 p. 1000), de façon à reconstituer au mieux la caséine.

Le régime IV est semblable au régime I avec remplacement de la caséine lactique par de la caséine dévitaminée et supplémentation en L-tryptophane (0,6 p. 1000). Ce deuxième régime témoin a été constitué car nous avons pensé que la caséine dévitaminée qui a subi au cours de sa préparation l'action successive de soude et d'acide dilué correspondait mieux au témoin que la caséine lactique pour l'étude des effets de l'oxydation. Une petite quantité de tryptophane est ajoutée pour contrebalancer une destruction partielle au cours de la préparation.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les variations de poids des animaux pendant la période expérimentale sont représentées par les courbes des figures 3 et 4.

Les résultats du premier essai (fig. 3) montrent que si l'apport protéique est constitué uniquement de caséine oxydée supplémentée en tryptophane et tyrosine mais non en acides aminés soufrés, on constate une chute de poids importante (13,7 g en 9 jours). La supplémentation en cystine et méthionine permet une reprise de poids spectaculaire (18,4 g en 7 jours).

Les résultats du deuxième essai (fig. 4) montrent que la croissance n'est pas très différente que le régime soit constitué de caséine dévitaminée supplémentée en tryptophane (IV) ou de caséine reconstituée à partir de caséine oxydée (III). C'est

ainsi que pendant la période expérimentale de 21 jours les rats recevant le régime IV à la caséine dévitaminée prennent en moyenne 35,6 g et ceux recevant le régime III à la caséine oxydée dûment supplémentée 39,8 g. La différence d'accroissement de poids entre les deux groupes n'est toutefois pas significative (analyse des variances.)

Dans les essais nutritionnels de BENNET et TOENNIES (1942) la caséine reconstituée à partir de caséine oxydée restait inférieure à la caséine dévitaminée. Ce n'est pas le cas dans nos essais.

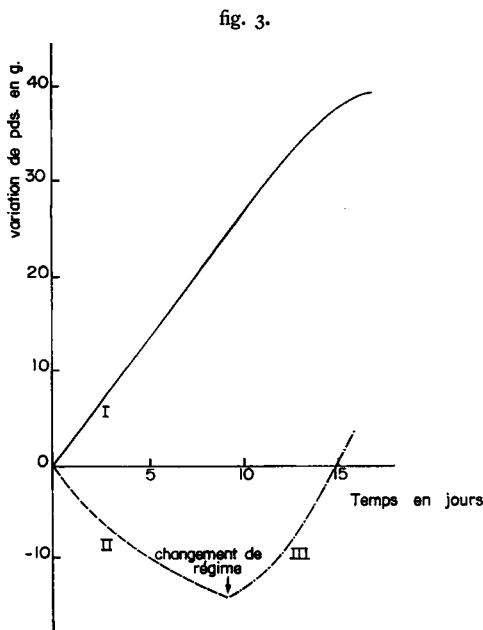


FIG. 3. — Variations de poids corporel de rats Long Evans soumis aux régimes I, II, III

- régime I-caséine lactique
- - - régime II-caséine oxydée + tyrosine + tryptophane
- · - · régime III = régime II + cystine + méthionine

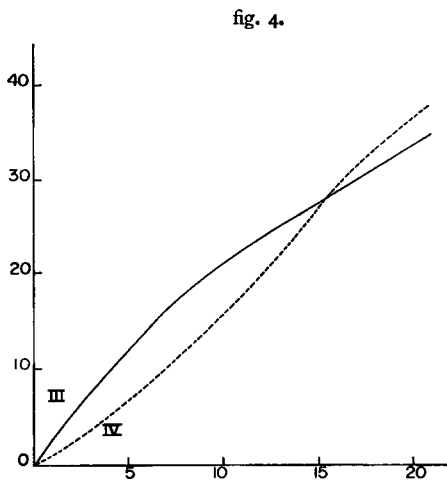


FIG. 4. — Variations de poids corporel de rats Wistar soumis aux régimes III et IV

- - - Régime III caséine oxydée + tryptophane tyrosine cystine méthionine
- Régime IV caséine dévitaminée + tryptophane

En fin d'expérience, les rats de tous les groupes sont sacrifiés et autopsiés ; aucune anomalie n'a été révélée après examen visuel des organes.

CONCLUSIONS

Au moins pour des essais de courte durée chez deux types de rats (*Albinos Wistar et Pie Long Evans*) il ne semble pas qu'il y ait d'objection à l'utilisation de la caséine oxydée pour la constitution de régimes alimentaires. Cette protéine peut servir de base à la constitution de toute une gamme de régimes où l'on fait varier à volonté taux protéique global et teneur en acides aminés soufrés.

Cette mise au point était nécessaire à la poursuite de nos recherches qui portent sur les besoins en acides aminés soufrés chez les rats normaux ou atrichis et cela au cours de la croissance et de la gestation.

Reçu pour publication en mars 1967.

SUMMARY

INVESTIGATIONS TOWARDS THE DETERMINATION OF SULPHUR AMINO-ACID REQUIREMENTS OF THE GROWING RAT

I. PREPARATION AND USE OF OXIDIZED CASEIN

Casein was oxidized by hydrogen peroxide in formic acid-medium, according to TOENNIES' method modified by MILLER.

The amino-acid composition was estimated after acid hydrolysis by an ion-exchange method, using a technicon auto-analysor. Tryptophane content was estimated after alkaline hydrolysis by a chemical method.

100 per cent methionine and cystine were oxidized; 76 per cent tryptophane (indol ring estimation) and 20 per cent tyrosine were destroyed.

Biological assays on *Wistar* and *Long Evans* rats showed that oxidised casein with the addition of tryptophane and tyrosine as a sole source of protein provokes a weight decrease. Oxidised casein with the addition of tryptophane, tyrosine, cystine and methionine is a suitable protein for the growth of young animals. Vitamin free casein with the addition of tryptophane gives similar results. No sign of toxicity due to oxidised casein was observed.

It is concluded that oxidised casein with the addition of tryptophane and tyrosine is a suitable protein for studies dealing with sulphur amino requirements, at least as far as growth of young rats is concerned.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BENNET M. A., 1939. Metabolism of sulphur. The replacibility of DL-methionine in the diet of albino rat with its partially oxidised derivative DL-methionine sulphoxyde. *J. biol. Chem.*, **33**, 1794-1797.
- BENNET M. A., 1941. The replacibility of DL-methionine in the diet of the albino rat with DL-methionine sulfone and DL-methionine sulfonium chloride. *J. biol. Chem.*, **141**, 573-578.
- BENNET M. A., TOENNIES G., 1942. Nutritional assay of casein modified by the action of hydrogen peroxide and formic acid. *J. biol. Chem.*, **145**, 671-677.
- ECKERT H. W., 1943. A new microcolorimetric method for the determination of tryptophane. *J. biol. Chem.*, **148**, 205.
- HAMILTON P. B., 1963. Ion exchange chromatography of amino acids. A single column, high resolving fully automatic procedure. *Anal. Chem.*, **35**, 2055-2064.
- MILLER E. L., CARPENTER K. J., MORGAN C. B., BOYNE A. W., 1965. Availability of sulphur amino acids in protein foods. 2. Assesment of available methionine by chick and microbiological assays. *Brit. J. Nutrit.*, **19**, 249-267.
- NJAA I. R., 1962. Utilization of methionine sulphoxide and methionine sulphone by the young rat. *Brit. J. Nutrit.*, **16**, 571-577.
- PIEZ M. A., MORRIS L., 1961. A modified procedure for the automatic analysis of amino-acids. *Anal. Biochem.*, **1**, 187.
- POMERANZE J., PILIERO S. J., MEDECI P. T., PLACHTA A., 1959. Deficiency diets in young growing rats. *Proc. Soc. exper. Biol. Med.*, **100**, 207-210.
- TOENNIES G., 1942. The oxidative conversion of casein into protein free of methionine and tryptophane. *J. biol. Chem.*, **145**, 667-671.