

Dégradation thermique des caséines α_s et β de vache

IV. — Substances peptidiques libérées. Propriétés activatrices de la croissance des bactéries lactiques

par D. LORIENT, P. BRACQUART et C. ALAIS

Laboratoire de Biochimie Appliquée, Université de Nancy I
54037 Nancy Cedex

Summary. Heat degradation of α_{s1} and β cow caseins. IV. Peptide release. Properties stimulating the growth of lactic bacteria.

In order to ascertain the process of heat degradation of α_{s1} and β caseins (release of peptides, splitting of peptide bonds), released peptides are isolated and purified and their amino acid composition determined.

The stimulating effect of purified peptides on the growth of *Streptococcus thermophilus* is studied.

Peptides with low molecular weight contain a smaller quantity of aromatic amino acids and a larger quantity of hydroxyl amino acids and phosphorus than the original caseins. Tryptophan remains in the insoluble part at pH 4.6.

Stimulating peptides always have a molecular weight ranging from 1 000 to 10 000 ; small peptides are often inhibitors. More than 50 peptides extracted from α_{s1} casein have been located in the amino acid sequence of the molecule ; the central hydrophilic part of the molecule (Gly₄₅-Met₆₀) releases the greatest number of peptides. Split peptide bonds are often located near the carboxylic groups of Leu and Ser and near the amino groups of Gly and Lys.

Heating also causes deamidation and dephosphorylation of casein. Thus, the compositions of the peptides obtained, determined after acid hydrolysis, are similar but have different electrophoretic behavior. Their stimulating effect increases along with the basicity and the presence of some amino acids (histidine, glutamic acid, methionine) or the absence of others (aspartic acid, isoleucine).

The purification stages usually decrease the stimulating effect of peptides. Indeed, complex mixtures of peptides and amino acids are more likely to produce a good source of amino acids for biosynthesis.

Introduction.

Dans deux précédentes communications (Lorient et Alais, 1970, 1974), nous avons étudié l'action des traitements thermiques sur les propriétés physico-chimiques des caséines α_s et β . Leur dégradation s'accompagne de ruptures de liaisons peptidiques en nombre faible avec libération de peptides dont la nature, le nombre et les propriétés

vont être précisées ici. Des peptides ont été précédemment isolés après chauffage de la caséine ou du lait ; Nakanishi et Itoh (1967) en ont étudié deux, Lahav *et al.* (1971) ont purifié un glycopeptide basique doué de propriétés antibiotiques. Peu d'études ont été faites sur la dégradation des constituants séparés de la caséine ; Alais *et al.* (1967) ont isolé de la caséine χ chauffée un glycopeptide dont la composition est proche de celle du caséinoglycopeptide provenant de l'action de la chymosine ; une étude similaire sur le lait chauffé, effectuée par Hindle et Wheelock (1970) a confirmé ces résultats.

L'étude de ces peptides a pour but de préciser le mécanisme de la dégradation ; cependant, il est intéressant de constater que certaines de ces substances sont douées d'un pouvoir activateur de croissance des bactéries lactiques ; l'étude de telles propriétés qui est en cours, permettrait peut-être d'expliquer en partie la raison pour laquelle le lait chauffé est un meilleur milieu de culture pour les bactéries lactiques que le lait cru.

Matériel et méthodes.

Caséines.

Les caséines α_s et β sont obtenues par précipitations fractionnées en présence d'urée selon Thompson et Kiddy (1964) pour la caséine α_s et selon Aschaffenburg (1963) pour la caséine β , ou par chromatographie sur DEAE cellulose selon Mercier *et al.* (1968).

Les solutions aqueuses de ces caséines, à 2 p. 100 et à pH 6,8 sont chauffées à 120 °C durant 20 mn dans les conditions décrites précédemment (Lorient et Alais, 1970).

Fractionnement des peptides.

Après le chauffage, un fractionnement préliminaire est effectué de deux manières :

- substances solubles et insolubles à pH 4,6, point isoélectrique des caséines ;
- ultrafiltration par passages successifs sur membranes Diaflo de type PM 30, PM 10, UM 2 et UM 05 permettant un classement des peptides dans une gamme de masses molaires (30 000, 10 000, 1 000, 500).

Un fractionnement plus poussé a été effectué par chromatographie sur colonne :

- chromatographie sur DEAE-cellulose des substances insolubles à pH 4,6 ou de masse moléculaire apparente supérieure à 30 000 : 1 g de substance redissoute à pH 8,6 dans une solution tampon TRIS 0,1 M, HCl, est adsorbé sur une colonne de 2 \times 50 cm ; l'élution est faite par un gradient linéaire de NaCl ;
- chromatographie sur Dowex AG 50 W \times 2 des autres substances, selon Schroeder (1962) : 0,4 g dissous à pH 2 est passé sur une colonne 2 \times 100 cm équilibrée à pH 3,1 par une solution tampon pyridine-acide acétique, 0,2 M en pyridine ; l'élution est faite par un gradient de molarité en pyridine (0,2 M à 2 M) et de pH (pH 3,1 à pH 5,0).

Les peptides élués sont détectés par absorption à 280 nm et par la réaction à la ninhydrine après hydrolyse alcaline (certains peptides n'absorbent pas dans l'UV).

La purification finale a été obtenue de deux manières :

— électrophorèse à haute tension, sur papier Whatman 3 MM à pH 3,6 pendant 45 mn à 35 V/cm ;

— chromatographie sur papier Whatman 3 MM avec le mélange butanol-acide acétique-eau (4/1/5) durant 14 h ; après repérage par coloration à la ninhydrine de bandes témoins, les peptides sont élués par l'acide acétique à 30 p. 100 (v/v).

Les éluats sont séchés directement dans le cas de tampons volatils ou après dessalage par électrodialyse dans le cas des autres tampons.

Méthodes analytiques.

Les dosages d'azote sont effectués par microkjeldahl. Le phosphore est déterminé après minéralisation selon la méthode de Delsal et Manhoury (1958).

La composition en acides aminés est déterminée après hydrolyse acide (HCl 6 N, 110 °C, 24 h) à l'aide d'un autoanalyseur « Technicon ».

Les acides aminés C-terminaux sont identifiés après digestion par la carboxypeptidase A traitée au DIFP, à pH 8,5 et 40 °C durant 30 mn et 2 h, par chromatographie en couche mince puis dosés par l'autoanalyseur.

Les acides aminés N-terminaux sont identifiés par dansylation selon Woods et Wang (1967).

Mesure de la stimulation de la croissance de Streptococcus thermophilus.

Elle est effectuée selon la technique dérivée de celle de Desmazeaud (1972) : 350 ml de lait (poudre « Spray » en solution à 10 p. 100) chauffés à 90 °C pendant 30 mn sontensemencés avec 10 ml d'une culture de 14 h à 42 °C de *Streptococcus thermophilus*. Après mélange, le lait est réparti par fractions de 1 ml dans des tubes 65 × 12 mn contenant 0,1 ml de la solution de peptides à 0,8 p. 100 dans l'eau distillée ou 0,1 ml d'eau distillée pour les témoins. Après 5 h d'incubation à 42 °C, la quantité d'acide lactique produite est titrée potentiométriquement par une solution de soude N/50 ; le pouvoir stimulant est exprimé par la relation :

$$A = \frac{\text{g d'acide lactique produit en présence de peptides}}{\text{g d'acide lactique produit en présence d'eau}} \times 100$$

si $A > 100$: activation,

$A < 100$: inhibition.

Résultats.

1. — Fractionnement des substances libérées par ultrafiltration.

L'ultrafiltration a été effectuée à deux valeurs du pH : 7,0 et 12,0 ; une troisième série a été faite à pH 12 en présence d'urée 7M, c'est-à-dire en milieu très dissociant. Les schémas de la figure 1 donnent une idée de la répartition, selon leur taille, des

substances se trouvant dans les solutions de caséine α_{S1} et de caséine β après un chauffage de 20 mn à 120 °C. On a dosé le phosphore dans toutes les fractions ; l'azote a été dosé dans celles qui ne contiennent pas d'urée, car l'élimination totale de ce réactif d'une solution de peptides est délicate.

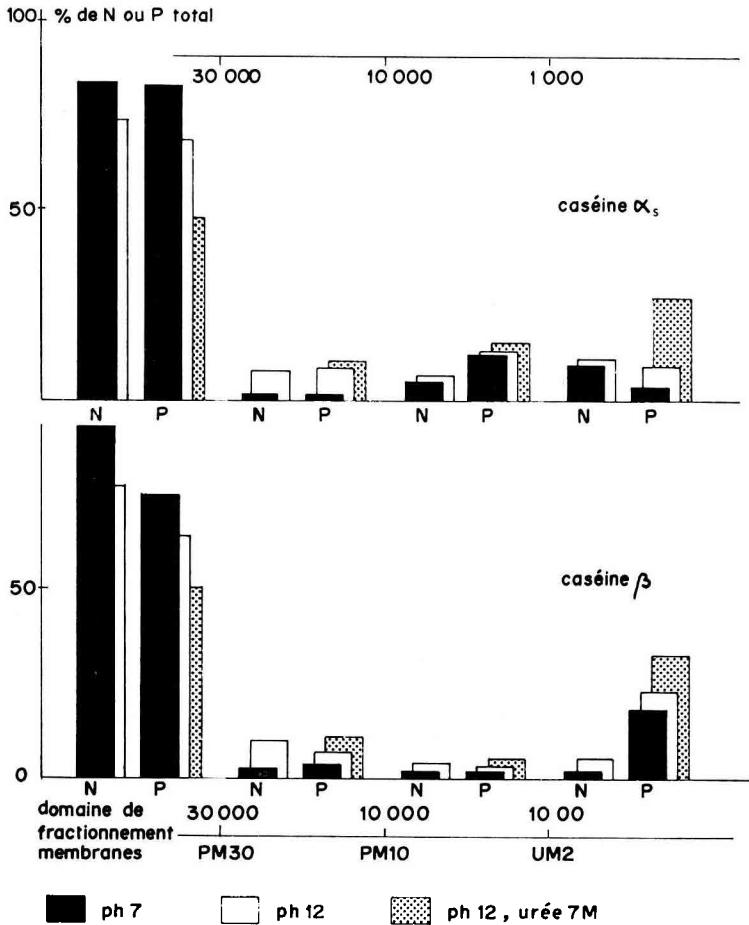


FIG. 1. — Fractionnement des substances azotées (N) et phosphorées (P) par ultrafiltration sur membranes DIAFLO (Amicon) PM 30, PM 10, UM 2.

A pH neutre et sans agent dissociant, le fractionnement est freiné ; la fraction correspondant à une masse molaire apparente supérieure à 30 000 représente autour de 90 p. 100 de l'azote de la caséine et un peu moins pour le phosphore. A pH 12 et sans urée ces proportions diminuent sensiblement ; en présence d'urée il n'y a plus que la moitié du phosphore dans cette fraction de substances de grande masse molaire ; le phosphore se retrouve surtout dans la fraction inférieure à 1 000. Ceci confirme nos

précédents résultats selon lesquels le phosphore issu de la dégradation thermique pouvait se trouver sous forme peptidique (Lorient et Alais, 1970).

2. — Acides aminés libérés par le chauffage.

Le tableau 1 montre que ce type de dégradation ne provoque pas une libération importante d'acides aminés. Seuls, Thr, Ser, Gly, Ala, Val, Ile, Leu sont libérés en quantités appréciables de la caséine α_{s1} par l'action du chauffage ; les acides aminés soufrés, aromatiques et basiques sont absents.

La caséine entière chauffée libère des quantités plus importantes de Asp et Glu mais moins de sérine. Toutefois, pour les caséines α_{s1} et entière, la leucine et la sérine représentent plus de 40 p. 100 des résidus libérés au cours du chauffage. Nous savons que la caséine β libère peu d'azote non protéique (Lorient et Alais, 1970) ; cependant, c'est elle qui libère le plus d'acides aminés (autant d'acides aminés aromatiques que de leucine, isoleucine et valine).

3. — Peptides isolés par chromatographie.

a) Fractionnement des substances insolubles à pH 4,6.

La figure 2 montre que les substances précipitées après chauffage des caséines α_{s1} et β sont hétérogènes. Cette observation a été confirmée par des examens électrophorétiques et filtration sur gel de Sephadex (résultats non présentés ici). La libération de petits peptides de la chaîne protéique entraîne l'apparition de plusieurs fractions distinctes précipitables à pH 4,6 et ayant un comportement électrophorétique proche de celui de la caséine initiale malgré un léger effet de traînée.

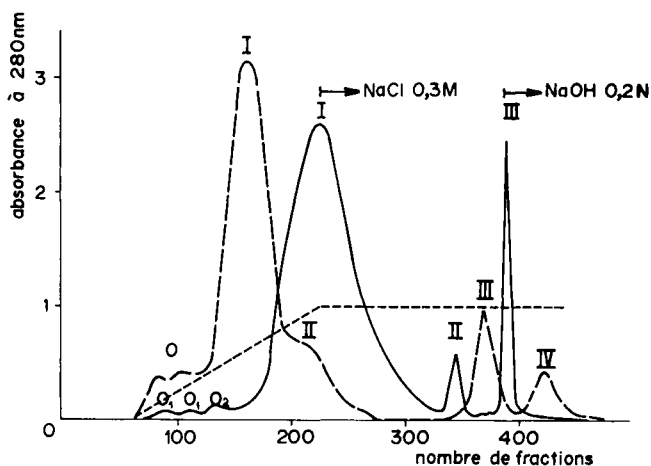


FIG. 2. — Diagramme d'éluion des peptides libérés des caséines par le chauffage (120 °C, 20 mn) et insolubles à pH 4,6.

Chromatographie sur colonne de DEAE Cellulose (Whatmann DE 22) 50 cm \times 2,5 cm. Elution par tampon TRIS-HCl 0,1 N, pH 8,6. Gradient en NaCl de 0 à 0,3 M puis éluion par NaCl 0,3 M et NaOH 0,2 N. Fractions de 10 ml débit 60 ml/h. Pics repérés par des chiffres romains.

Caséines α_{s1} ——— Caséine β - - - - -.

TABLEAU 1

Composition des caséines et proportion des acides aminés libérés des caséines par le chauffage (120°C — 20 mn)

	Caséine α_{S1}			Caséine entière			Caséine β		
	Hydrolyse totale g/100 g	Ac. aminés libérés g/100 g (*)	p. 100 de libération (**)	Hydrolyse totale g/100 g	Ac. aminés libérés g/100 g (*)	p. 100 de libération	Hydrolyse totale g/100 g	Ac. aminés libérés g/100 g (*)	p. 100 de libération
Asp	7,8	0,06	0,21	7,1	0,04		5,05	traces	
Thr	2,8	0,19	0,3	4,3	0,06	0,07	4,26	0,4	0,33
Ser	5,61			5,8	0,06	0,05	5,75	0,5	0,3
Glu	20,46			22,4	0,08		23,63	0,35	traces
Pro	7,95			11,3			15,34	0,15	traces
Gly	2,27	0,08	0,35	1,9	0,04	0,1	1,43	0,1	0,25
Ala	2,88	0,07	0,2	2,9	0,02	0,03	1,70	0,4	0,8
Cys	0			0,3					
Val	4,30	0,07	0,16	6,4	0,07	0,06	7,16	0,45	0,22
Met	2,56			2,7			3,04	0,4	0,46
Ile	4,23	0,11	0,26	6	0,04	0,035	3,51	0,55	0,55
Leu	8,42	0,21	0,23	9,1	0,12	0,065	10,08	1,5	0,52
Tyr	6,44			5,2			3,07	0,5	0,55
Phe	4,45			4,9			4,65	0,8	0,6
Lys	9,76	0,09	0,09	7,8	0,08	0,05	6,85	0,35	0,18
His	2,89			2,9			3	0,1	0,12
Arg	4,06			3,7			2,64	0,3	0,4
Azote non protéique (p. 100) libéré (fraction < 1 000)		9,4			5				3,5

(*) Résultats rapportés aux substances de PM apparent < 1 000 (p. 100 de la caséine initiale).

(**) Résultats rapportés à la quantité initiale de chaque acide aminé dans la caséine, les substances de PM apparent < 1 000 représentant respectivement 9,4 p. 100, 5 p. 100 et 3,5 p. 100 des caséines α_{S1} , entière et β .
La glutamine, l'asparagine et la phosphosérine n'ont pas été déterminées.

b) Fractionnement des substances solubles à pH 4,6.

Dans tous les cas, ces substances forment un mélange très complexe comme le montre la figure 3. Très peu de fractions isolées sur résine sont homogènes lorsqu'elles sont soumises à un fingerprinting. Une purification par chromatographie sur papier ou électrophorèse à haute tension de ces fractions issues de la caséine α_{s1} a permis d'isoler de nombreux peptides dont la composition en acides aminés (tabl. 4) montre qu'ils ont souvent une masse molaire voisine de 3 500.

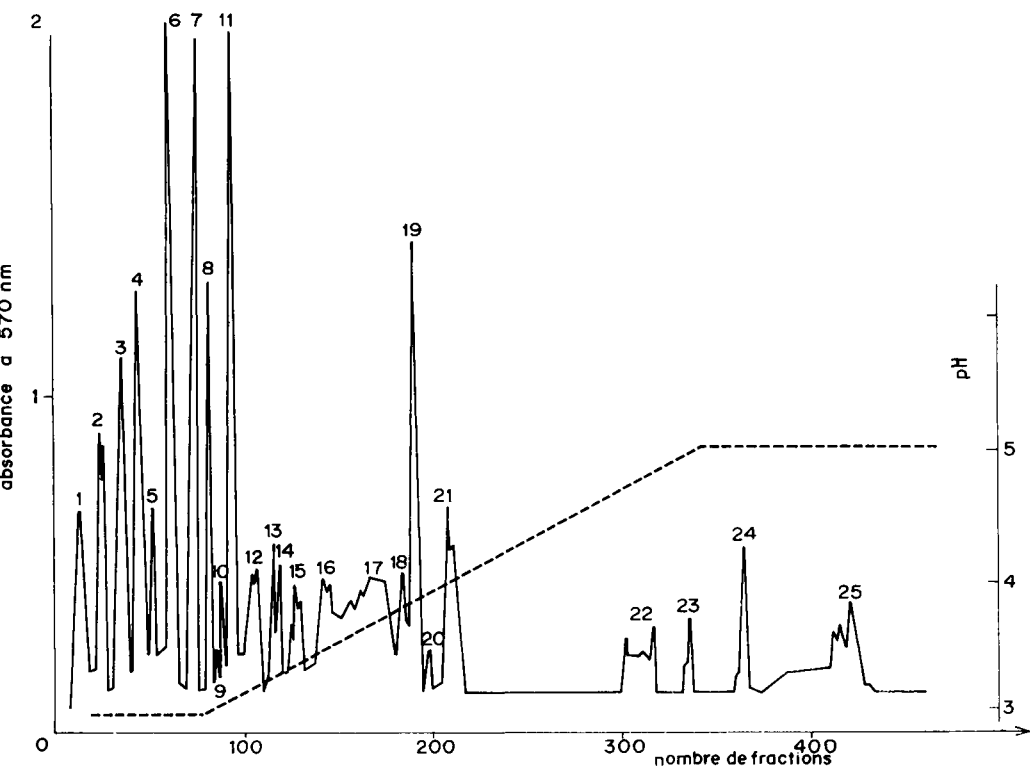


FIG. 3. — Diagramme d'éluion des peptides libérés de la caséine α_{s1} par le chauffage et solubles à pH 4,6. Chromatographie sur colonne de Dowex AG 50 W \times 2 200-400 mesh, 100 \times 2 cm. Elution par le tampon d'équilibrage (pyridine 0,2 M-acide acétique pH, 3,1), puis par un gradient linéaire en pyridine (0,2 à 2 M) et en pH (3,1 à 5) et enfin par le tampon (pyridine 4 M-acide acétique pH 5,2). Fractions de 10 ml ; débit 40 ml/h ; température 45 °C. Pics repérés par des chiffres arabes.

Le rendement de chaque fraction est très faible (tabl. 2). Les fractions les plus abondantes comme α_{s117} et β_{17} ne représentent respectivement que 17 p. 100 et 12 p. 100 de l'azote soluble à pH 4,6 et moins de 2 p. 100 de la caséine initiale. Le « fingerprint » de la figure 4 démontre la présence d'au moins 40 peptides solubles à pH 4,7 libérés par la caséine α_{s1} ; pour la caséine β , ce nombre est encore plus élevé, la masse totale des substances restant faible. Bien que l'étude de ces fractions

ait été entreprise simultanément pour les caséines α_{S1} et β , nous aborderons surtout dans la suite de l'exposé le cas de la caséine α_{S1} , des résultats semblables ayant été obtenus pour les 2 caséines.

TABLEAU 2

Activité stimulante de la croissance de Streptococcus thermophilus des substances peptidiques issues de la dégradation thermique des caséines α_{S1} et β

Fractions	caséine α_{S1}		caséine β	
	Rendement (*)	Activation (**) ou inhibition	Rendement (*)	Activation (**) ou inhibition
<i>Fractions insolubles à pH 4,6</i>				
Subst. totale	100 (91,6)	120	100 (95)	110
O ₁	2,0 (1,8)	135	14,4 (13,4)	168
O ₂	3,6 (3,3)	104		
I	90 (82,4)	110	73 (68)	114
II	2,75 (2,5)	170	6,1 (5,7)	123
III	1,6 (1,5)	163	5,2 (4,9)	157
IV			1,4 (1,3)	141
<i>Fractions solubles à pH 4,6</i>				
Subst. totale	100 (9,4)	152	100 (5)	115
1	7	122	1,6	
2	2,6	114		
3	3	117	6,9	
4	5,5	130	3,3	82
5	4,2	89	3	70
6	1,1	89	1,2	28
7	1,6	123	0,5	
8	0,9	79	0,6	
9	0,9	83	1	82
10	4,1	80	1	
11	9	99	5,9	17
12	5	73	4,2	11
13	1,6	97	1,2	
14	1,5	96	3,7	
15	4,7	43	6,5	
16	7,5	55	1	
17	17	61	12,2	15
18	6	113	3,7	0
19	1,2	112	4,2	128
20			2,2	
21	3,1	125		160
22	4,7	100	1,2	
23	1,3	124	1,8	90
24	2,3	132	2,2	108
25	1,4	149	0,8	
26			2,5	136
27			1,2	
28			0,6	
29			13,5	90
30			5,2	70
31			6,3	64
32			3,2	

(*) Rendement exprimé par rapport à la masse soluble ou insoluble à pH 4,6 ; entre parenthèses, rendement exprimé par rapport à la masse de caséine initiale.

(**) Témoin : 100 ; un nombre supérieur indique une activation, un nombre inférieur, une inhibition.

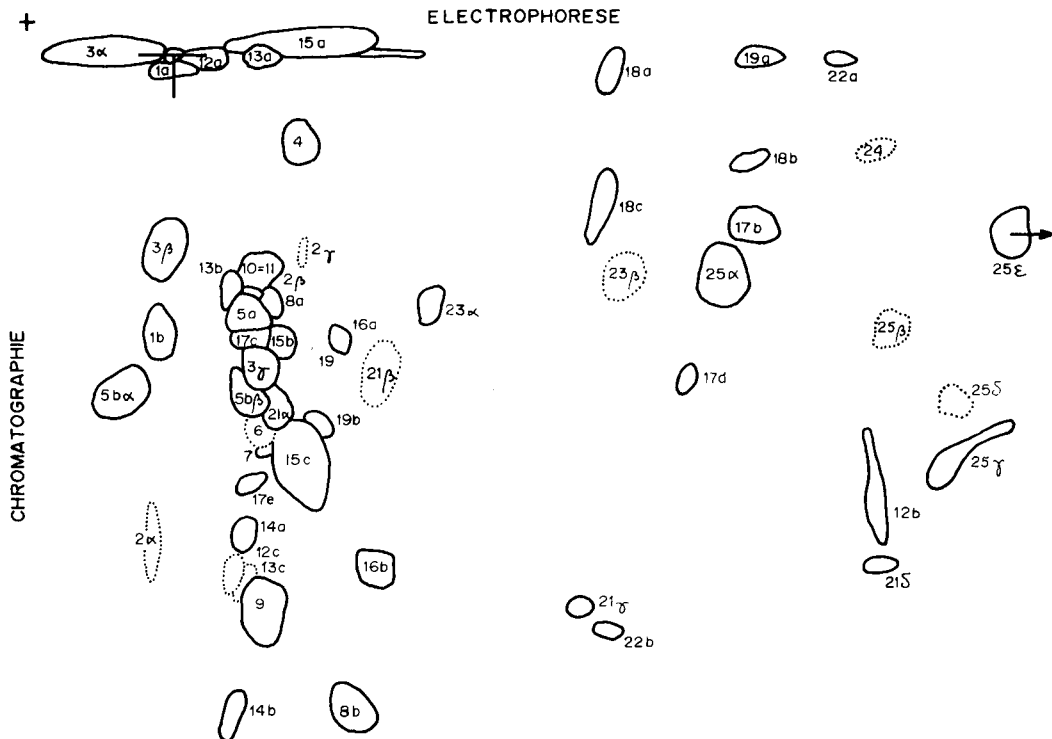


FIG. 4. — Carte peptidique des substances solubles à pH 4,6 issues du chauffage de la caséine α_{s1} .
Electrophorèse en tampon de pH 3,6 ; champ électrique 60 V/cm ; durée 45 mn. Fractions repérées par des lettres grecques. Chromatographie en tampon butanol-acide acétique-eau (4/2/1)
Fractions repérées par des lettres minuscules.

4. — Composition en acides aminés des peptides isolés par chromatographie de la caséine α_{s1} chauffée.

La composition des produits issus des premiers fractionnements est donnée dans le tableau 3. Les substances insolubles à pH 4,6, qui en représentent la plus grande partie (environ 90 p. 100) ont une composition voisine de celle de la caséine d'origine. Les substances solubles à pH 4,6 et dans l'acide trichloracétique sont enrichies en Asp, Thr, Ser, Pro, Arg et fortement appauvries en aromatiques. Les différences entre les trois fractions obtenues par chromatographie de la partie insoluble sont peu importantes. Par contre, l'ultrafiltration sépare quatre fractions présentant des différences marquées ; notamment celle qui rassemble les petites molécules ($< 1\ 000$) a une composition très particulière, avec beaucoup de Arg et Pro (qui forment l'extrémité N-terminale de la caséine α_{s1}) et peu ou pas de Glu, Met, Tyr et Lys.

La plupart des fractions solubles issues de la caséine α_{s1} et séparées par fingerprinting ont pu être analysées (tabl. 4). De nombreux peptides isolés contiennent de 20 à 40 résidus d'acides aminés ce qui représente une masse moléculaire moyenne comprise entre 3 000 et 5 000. Leur composition est souvent caractérisée par une

TABLEAU 3
Composition des substances libérées de la caséine α_{s1} pour le chauffage et obtenues par différents fractionnements (résidu pour 100)

	Caséine d'origine	Substances insolubles à pH 4,6	Substances insolubles chromatographiées			Substances solubles à pH 4,6	Substances solubles dans TCA 12 p. 100	Ultrafiltration sur membranes Diaflo			
								30 000	10.000-30.000	1 000-10 000	1 000
			I	II	III						
Asp	8,3	7,5	7,6	9,4	8,3	9,9	8,9	7,6	8,8	8,9	4,1
Thr	3,3	3,6	4,3	6,1	5,4	7,1	6,5	3,8	4,4	5,8	5,5
Ser	6	6,5	7,3	7,9	5,2	8,7	7,9	6,0	8,2	7,9	8,9
Glu	20,4	21,2	16,4	17,9	19	20,1	20,1	17,6	19,3	16,9	6,5
Pro	8,5	8,2	8,4	7,8	8,8	9,4	14,4	9,7	8,2	10,1	23,3
Gly	4,2	4,2	4,3	4,3	4,3	3,1	2,7	4,1	4,6	5,9	5,2
Ala	4,5	5,2	4,7	5,5	6	3,7	3,4	5,1	4,7	4,0	3,6
Val	5,2	5,6	5,7	6,1	6,8	4,7	3,0	5,7	6,3	5,9	3,7
Met	2,4	2,2	2,5	2,1	2,1	2,9	traces	2,7	2,7	3,2	1,6
Ile	4,5	4,7	5,8	5,5	5,0	5,3	6,3	5,5	6,6	5,7	3,6
Leu	7,9	8,2	8,9	8,5	9,0	5,1	3,8	9,1	7,5	7,9	7,0
Tyr	5	5,3	5,9	3,9	5,2	1,1	0	5,4	2,4	1,8	0
Phe	5,2	3,9	4,6	3,6	4,1	2,2	0,7	4,1	4,0	3,6	3,4
Lys	9,4	8,5	7,4	6,2	5,9	8,6	4,4	7,9	7,7	7,7	2,8
His	2,6	2,1	2,6	2,0	1,9	1,8	0	1,9	1,8	2,2	0
Arg	3,3	3	3,7	3,0	3,0	6,2	3,7	3,3	2,5	2,6	20,8
Trp		+	+	+	+	0	0	+	0	0	0
Phosphore (p. 100)	1,05	1,04	0,5	0,9	1,23	2,5	4,5	0,6	4,5	—	6,8

grande richesse en acides aminés polaires acides et par l'absence très fréquente de Tyr, Phe, His, Arg et Trp. On ne retrouve l'arginine en abondance que dans un dipeptide (25 β) ; c'est sans doute sous cette forme que l'arginine se trouve dans la fraction ultrafiltrable sur membrane UM 2 (PM < 1 000) puisqu'on ne la retrouve pas sous forme libre. La mise en évidence qualitative du tryptophane a montré que cet acide aminé n'est présent que dans la fraction 21 γ et dans les fractions insolubles à pH 4,6 et de masse molaire élevée ; cependant, comme il se dégrade facilement, sa mise en évidence n'est pas très sensible dans les produits de dégradation. Dans certaines fractions purifiées on retrouve de fortes concentrations de glyco-colle, de proline et d'acide aspartique ce qui ne permet pas de faire coïncider la composition en acides aminés de ces peptides avec un élément de structure connu de la caséine α_{s1} ; ayant vérifié que ces acides aminés n'étaient pas sous forme libre, nous n'avons pu expliquer ces anomalies de composition.

5. — Localisation des peptides solubles de la caséine α_{s1} .

Une très grande partie des peptides solubles à pH 4,6 et provenant du chauffage de la caséine α_{s1} a pu être localisée dans la séquence de la molécule établie par Mercier *et al.* (1971). Nous avons utilisé pour cela la composition du peptide et le résidu N terminal en cas d'ambiguïté. Dans certains cas, la localisation n'a été possible qu'en tenant compte d'une destruction assez importante de la sérine et de la lysine (au plus égale à 20 p. 100) et d'une augmentation régulière, au cours du chauffage, de la teneur des caséines en glyco-colle et en alanine, observée également par plusieurs auteurs (Nakanishi et Itoh, 1967 ; Osner et Johnson, 1974). Enfin, on a souvent mis en évidence la présence de glyco-colle et de leucine sous forme libre et on a déduit leur valeur de celle des acides aminés correspondants des peptides. Le tableau 4 montre que la très grande majorité des peptides solubles provient de la partie riche en acides aminés polaires et acides (acide glutamique, sérine et acide aspartique) comprise entre les résidus 29 et 75. Dans cette partie de la molécule, certains peptides ne diffèrent que de quelques résidus :

- le peptide 2 α (36-59) contient les peptides 2 β , 17 c et 21 δa (36-53) qui eux-mêmes contiennent le fragment 23 β (37-53) ;
- le peptide 6 (37-57) contient le peptide 7 (37-54) ;
- les peptides 3 γ (26-54), 21 β (27-54) et 10 ou 11 (29-54) ont des compositions très voisines. Il en va de même pour les 3 peptides 12 b (105-116), 13 b (105-118) et 12 c (105-120).

Parfois, plusieurs peptides identiques par leur composition en acides aminés migrent différemment en électrophorèse ; il en est ainsi pour les peptides 2 β , 17 c et 21 δa qui correspondent au fragment (36-53) mais qui sont probablement plus ou moins déphosphorylés ou désamidés.

Peu de peptides proviennent de la partie C terminale ; en effet, la plupart sont pauvres en acides aminés aromatiques ; seuls, quelques peptides de faible taille moléculaire peuvent y être localisés et ils contiennent souvent de la tyrosine, du glyco-colle et de la proline (5 a β , 15 b, 15 c, 17 c, 19 b, 21 γa). Nous avons trouvé très peu de peptides provenant de la partie N terminale bien que le dipeptide Arg-Pro soit très abondant dans la fraction 25 β .

TABLEAU 4
Composition en acides aminés et localisation des peptides solubles à pH 4,6 libérés de la caséine α_{s1} par chauffage
(moles d'acides aminés/mole de peptide)

Acides aminés	Peptides													
	1 a	1 b	2 α	2 β	2 γ	3 α a b	3 β	3 γ	4	5 α α β	6	7	8 a	8 b
Asp	2,8 (3)	1,3 (1)	2,7 (4)	2,8 (3)	—	4,8 (4)	3,5 (4)	2,8 (3)	1,0 (1)	4,0 (4)	3,9 (4)	2,6 (3)	2,5 (3)	1,8 (2)
Thr	1,6 (1)	—	1,1 (1)	1,1 (1)	—	2,4 (1)	1,7 (1)	1,7 (1)	—	2,1 (1)	1,3 (1)	1,2 (1)	1,1 (1)	—
Ser	3,8 (4)	0,7	3,0 (3)	2,5 (3)	—	4,8 (5)	2,7 (3)	2,2 (3)	0,4	5,1 (5)	2,9 (3)	2,2 (3)	3,1 (3)	—
Glu	7,9 (8)	2,7 (3)	6,1 (6)	4,1 (4)	2,1 (2)	9,5 (10)	6,0 (6)	5,5 (6)	3,5 (5)	8,2 (8)	5,3 (5)	4,2 (4)	4,8 (5)	3,5 (4)
Pro	1,1 (1)	0,8 (1)	0,8	0,5	—	2,1 (2)	0,3	2,0 (2)	2,0 (1)	1,1 (1)	0,6	0,5	1,2	2,8 (2)
Gly	—	1,7 (1)	1,3 (1)	1,5 (1)	—	1,4 (2)	1,2 (1)	2,1 (2)	2,4 (2)	2,0 (1)	2,0 (1)	1,7 (1)	1,5 (1)	3,1 (1)
Ala	1,9 (2)	1,0 (1)	1,5 (1)	1,1 (1)	—	2,8 (2)	1,4 (1)	1,7 (2)	1,2 (1)	1,8 (2)	1,0 (1)	1,0 (1)	1,2 (1)	1,1
Val	1,1 (1)	1,1 (1)	1,0 (1)	1,0 (1)	—	2,1 (2)	1,4 (1)	1,5 (2)	1,1 (1)	1,6 (1)	1,1 (1)	1,3 (1)	1,0 (1)	1,1 (1)
Met	+ (2)	+ (1)	+ (1)	—	—	1,7 (2)	+ (2)	0,6 (1)	0,6 (1)	1,5 (2)	+ (1)	+ (1)	+ (1)	—
Ile	2,4 (3)	1,2 (1)	2,1 (2)	1,2 (1)	—	4,0 (3)	2,1 (2)	0,9 (1)	2,1 (2)	2,2 (2)	1,9 (2)	1,4 (1)	1,1 (1)	0,95 (1)
Leu	0,4	0,8 (1)	0,9 (1)	0,9 (1)	—	1,7 (1)	1,0 (1)	1,0 (1)	1,1 (1)	1,0 (1)	1,3 (1)	1,1 (1)	1,1 (1)	1,6 (2)
Tyr	—	—	—	—	1,0 (1)	0,3	—	—	—	—	—	—	—	—
Phe	—	—	—	0,4	0,8 (1)	1,5 (2)	0,4	0,9 (2)	—	—	—	—	—	—
Lys	0,8 (1)	0,8 (1)	2,9 (3)	1,1 (2)	—	2,5 (4)	1,4 (3)	1,3 (3)	0,7 (1)	2,1 (4)	0,9 (1)	0,7 (1)	0,9 (1)	0,8 (1)
His	—	—	—	—	—	—	—	—	0,5 (1)	1,1 (1)	—	—	—	0,4 (1)
Arg	—	—	—	—	1,05 (1)	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Trp	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Acide aminé	n. i.	n. i.	Lys	Lys	Arg	Ala Thr	Lys	Ala	n. i.	n. i.	n. i.	n. i.	Val	Pro
N terminal	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Fragment	49-74	132-143	36-59	36-53	151-155	26-66 174-176	36-60	26-54	126-142	37-66 170-171	37-57	37-54	37-55	5-19
Pouvoir stimulant	107	70	114	92	—	100	128	117	130	90	90	123	80	80

n. i. : non identifié.

TABLEAU 4 (suite)

Acides aminés	Peptides												
	10	11	12 a α β	12 b α β	12 c α β	13 b	13 c	14 b	15 a	15 b	15 c	16 b α β	17 c α β
Asp	2,7 (3)	2,7 (3)	2,2 (2)	1,1 (1)	2,0 (1)	1,6 (1)	2,3 (2)	1,2 (1)	1,2 (1)	1,04 (1)	3,2 (4)	2,8 (3)	3,0 (3)
Thr	1,1 (1)	1,1 (1)	1,0 (1)	—	—	0,1	0,6	—	—	—	2,0 (2)	0,6 (1)	1,3 (1)
Ser	2,5 (3)	2,9 (3)	2,1 (2)	0,95 (1)	1,0 (1)	0,5 (1)	1,5 (2)	0,5 (1)	—	1,8 (2)	3,7 (4)	1,6 (3)	2,5 (3)
Glu	5,4 (6)	5,8 (6)	4,5 (5)	2,2 (2)	3,2 (4)	3,5 (4)	5,4 (6)	2,2 (2)	1,0 (1)	0,7 (1)	3,8 (3)	4,7 (5)	4,3 (4)
Pro	1,0 (1)	1,5 (1)	0,8 (1)	2,1 (2)	1,9 (2)	2,4 (2)	3,1 (2)	1,6 (1)	—	—	2,3 (4)	2,4 (3)	1,3 (1)
Gly	1,9 (2)	1,8 (2)	1,3 (1)	0,9 (1)	1,2 (1)	0,2	2,1 (2)	0,3	—	1,2 (1)	1,3 (2)	3,6 (2)	2,3 (1)
Ala	1,3 (1)	0,95 (1)	—	1,0 (1)	0,8 (1)	1,9 (1)	1,2 (2)	0,9 (1)	—	—	—	0,8 (1)	1,0 (1)
Val	1,8 (2)	1,9 (2)	1,1 (1)	0,7 (2)	1,3 (2)	1,2 (2)	1,5 (2)	—	—	—	—	1,4 (2)	1,1 (1)
Met	0,9 (1)	1,0 (1)	1,1 (1)	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—
Ile	1,9 (1)	2,3 (1)	1,3 (1)	1,9 (1)	1,4 (1)	1,9 (1)	2,0 (2)	—	—	—	2,3 (2)	1,9 (1)	1,5 (1)
Leu	1,1 (1)	1,5 (1)	0,8 (1)	1,7 (1)	2,5 (2)	1,2 (1)	2,0 (1)	—	—	—	1,3 (1)	2,0 (1)	1,2 (1)
Tyr	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Phe	1,0 (1)	0,6 (1)	0,4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Lys	1,8 (3)	2,0 (3)	1,1 (1)	1,3 (1)	1,0 (1)	0,6 (1)	0,8 (2)	—	—	—	0,8 (1)	0,8 (1)	—
His	—	—	0,3	—	—	—	1,2 (2)	—	—	—	1,05 (1)	0,9 (3)	1,8 (2)
Arg	—	—	—	—	—	—	0,4 (1)	—	—	—	—	—	—
Trp	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—
Acide aminé. N terminal	n. i.	Pro.	Pro Gly	Lys Gly	Lys Gly	n. i.	Pro	Pro	Asn	Gly	Pro	n. i.	Lys Pro
Fragment	29-54	29-54	45-59 168-169 197-198	105-116 10-11	105-120 162-163	105-118	113-139	113-118	17-18 38-39	187-191	168-193	26-51 126-127	36-53 185-187
Pouvoir stimulant	90	98	73	73	102	106	96	43	110				

n. i. : non identifié.

TABLEAU 4 (suite)

Acides aminés	Peptides												
	17 d	18 a	18 b	18 c	19 b α β	21 β	21 γ a b	21 δ a b	22 b	23 α	23 β	25 β	25 γ
Asp.....	—	4,4 (4)	1,7 (2)	2,4 (2)	—	2,5 (3)	3,7 (4)	2,6 (3)	1,7 (1)	1,2 (1)	2,0 (3)	—	1,2 (1)
Thr.....	—	0,9 (1)	—	1,7 (2)	—	2,0 (1)	4,2 (4)	1,1 (1)	—	0,8 (1)	1,1 (1)	—	0,9 (1)
Ser.....	—	2,8 (3)	—	2,2 (2)	1,0 (1)	2,5 (3)	4,4 (4)	3,1 (3)	1,0 (1)	2,4 (2)	3,2 (3)	—	2,1 (2)
Glu.....	1,0 (1)	7,1 (7)	1,1 (1)	2,6 (2)	—	5,8 (6)	6,2 (3)	4,1 (4)	3,6 (4)	3,0 (3)	3,9 (4)	—	2,3 (3)
Pro.....	—	—	—	2,0 (2)	1,0 (1)	2,0 (2)	4,5 (4)	1,0 (1)	1,6 (1)	—	—	1,2 (1)	—
Gly.....	1,05 (1)	2,3 (2)	—	1,4 (1)	2,0 (2)	2,2 (2)	2,9 (2)	2,5 (1)	2,4 (2)	1,2 (1)	1,1 (1)	—	1,5 (1)
Ala.....	—	1,2 (1)	—	—	—	1,0 (1)	0,8 (1)	1,7 (1)	1,7 (1)	1,0 (1)	0,9 (1)	—	1,2 (1)
Val.....	—	0,8 (1)	—	—	—	1,4 (2)	1,3 (1)	1,3 (1)	1,3 (1)	—	1,0 (1)	—	—
Mef.....	—	—	—	0,8 (1)	—	0,7 (1)	—	—	—	—	—	—	—
Ile.....	—	—	—	1,2 (1)	—	1,3 (1)	3,2 (2)	1,2 (1)	2,3 (2)	—	0,9 (1)	—	—
Leu.....	—	0,6 (1)	—	1,2 (1)	—	1,2 (1)	3,1 (1)	1,9 (1)	0,8 (1)	—	0,9 (1)	—	—
Tyr.....	—	1,0 (1)	—	—	3,0 (1) (2)	—	0,3 (1)	—	—	—	—	—	—
Phe.....	—	—	—	0,2	—	1,5 (2)	0,6 (1)	—	—	—	—	—	—
Lys.....	—	1,5 (2)	—	0,7 (1)	—	3,1 (3)	1,7 (1)	1,5 (2)	1,8 (2)	—	0,9 (1)	—	—
His.....	—	—	—	—	—	—	0,3	(1) 0,5 (1)	1,5 (2)	—	—	—	—
Arg.....	—	—	—	—	—	—	—	—	1,1 (1)	—	—	1,0 (1)	—
Trp.....	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Acide aminé N terminal	n. i.	n. i.	n. i.	Pro	n. i.	n. i.	Gly Ile	Lys Gly	Arg	n. i.	Val	Arg	Gly
Fragment	125-126	33-56	17-19	183-198	159-161 93-94	27-54	170-199 6-16	36-53 10-12	119-139	45-53	37-53	1-2	45-53
Pouvoir stimulant	109	—	113	—	112	118	100	150	100	102	92	86	122

n. i. : non identifié.

Enfin, certains peptides n'ont pu être localisés bien qu'ils paraissent purs sur les fingerprints (5 b, 9, 13 a, 14 a, 16 a, 17 a, 17 e, 17 f, 19 a, 20, 21, 22 a, 24, 25 α) ; leur faible sensibilité à la ninhydrine pourrait peut-être expliquer une purification incomplète.

6. — Acides aminés terminaux apparus au cours de la dégradation.

Le tableau 5 présente une interprétation des ruptures de liaisons appréciables soit expérimentalement soit par déduction de la localisation des peptides libérés par la caséine α_{s1} (fig. 5).

TABLEAU 5

Acides aminés terminaux apparus au cours du chauffage de la caséine α_{s1}

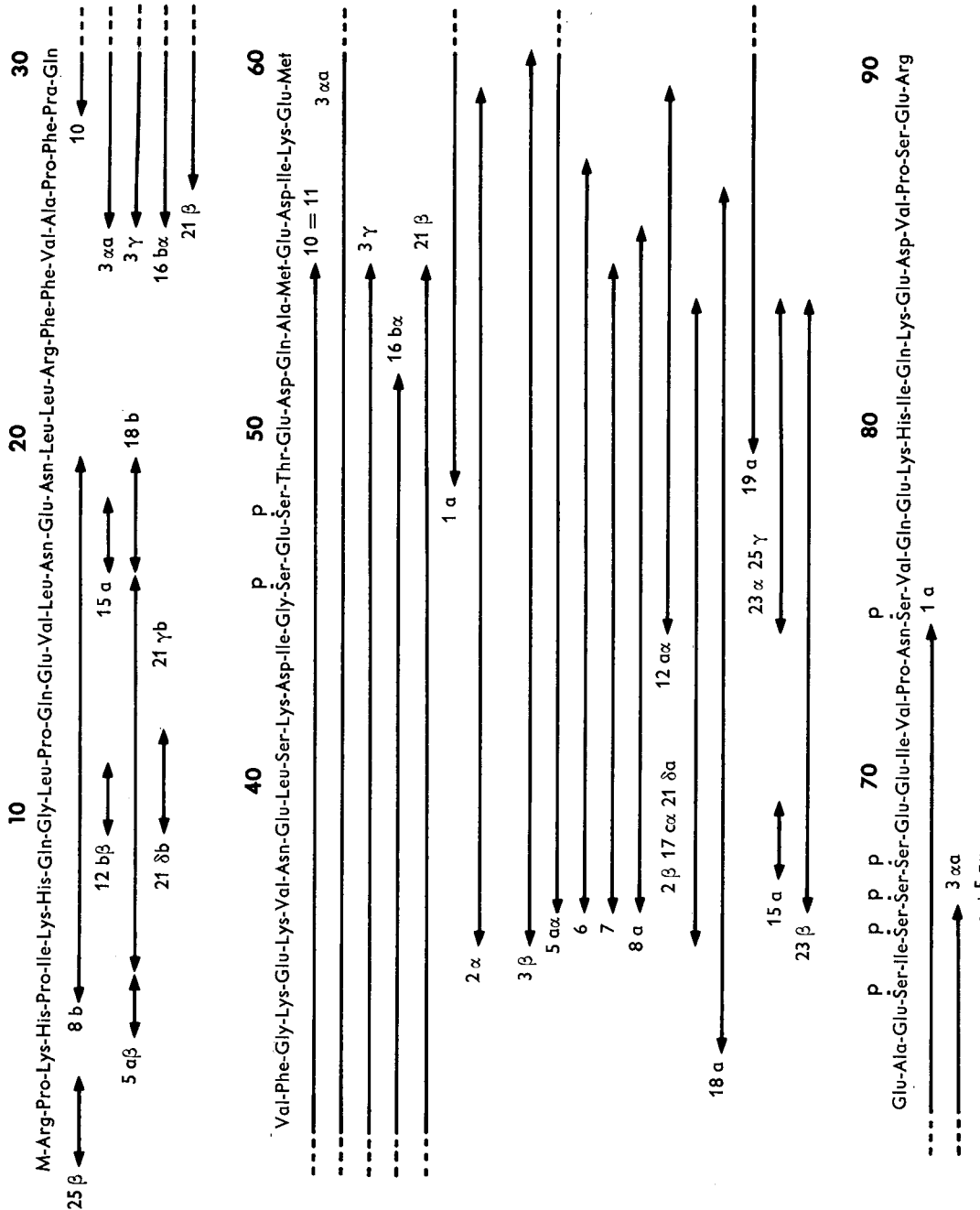
Acides aminés	Nombre de résidus par moles	Données expérimentales		Données déduites des peptides localisées dans la molécule	
		Augmentation des acides aminés C terminaux (*)	Acides aminés N terminaux dans les peptides solubles (**)	Nombre de résidus en position C terminale	Nombre de résidus en position N terminale
Asx ...	15		2	7	3
Thr ...	5	0,03	2	1	2
Ser ...	16	0,07		4	
Glx ...	39		3	6	2
Pro ...	17		10	3	10
Gly ...	9		16	2	10
Ala ...	9		3	7	3
Val ...	11	0,06	5		5
Met ...	5			5	
Ile ...	11	0,01	1	2	1
Leu ...	17	0,36		7	
Tyr ...	10	0,06	1	1	1
Phe ...	8	0,03			
Lys ...	14		9	1	7
His ...	5		1		
Arg ...	6		3		3
Trp ...	2			1	

(*) Résidus par mole de caséine apparus après chauffage par action de la carboxypeptidase A.

(**) Résidus N terminaux identifiés après dansylation et hydrolyse : dans les fractions solubles à pH 4,6 et isolés par chromatographie sur Dowex 50 WX2 (résidus pour 56 peptides).

Deux acides aminés apparaissent le plus souvent par action de la carboxypeptidase A sur les solutions chauffées : la sérine et la leucine.

D'après la nature des peptides solubles à pH 4,6 et localisés dans la molécule de caséine α_{s1} , 4 liaisons sur 16 pour la sérine et 7 liaisons sur 17 pour la leucine, qui impliquent le groupe carboxyle de ces deux acides aminés, peuvent être hydrolysées. D'autres extrémités C terminales apparaissent après chauffage ; il en est ainsi pour l'alanine et l'acide glutamique qui n'avaient pu être mis en évidence précédemment, la carboxypeptidase A libérant mal ces acides aminés.



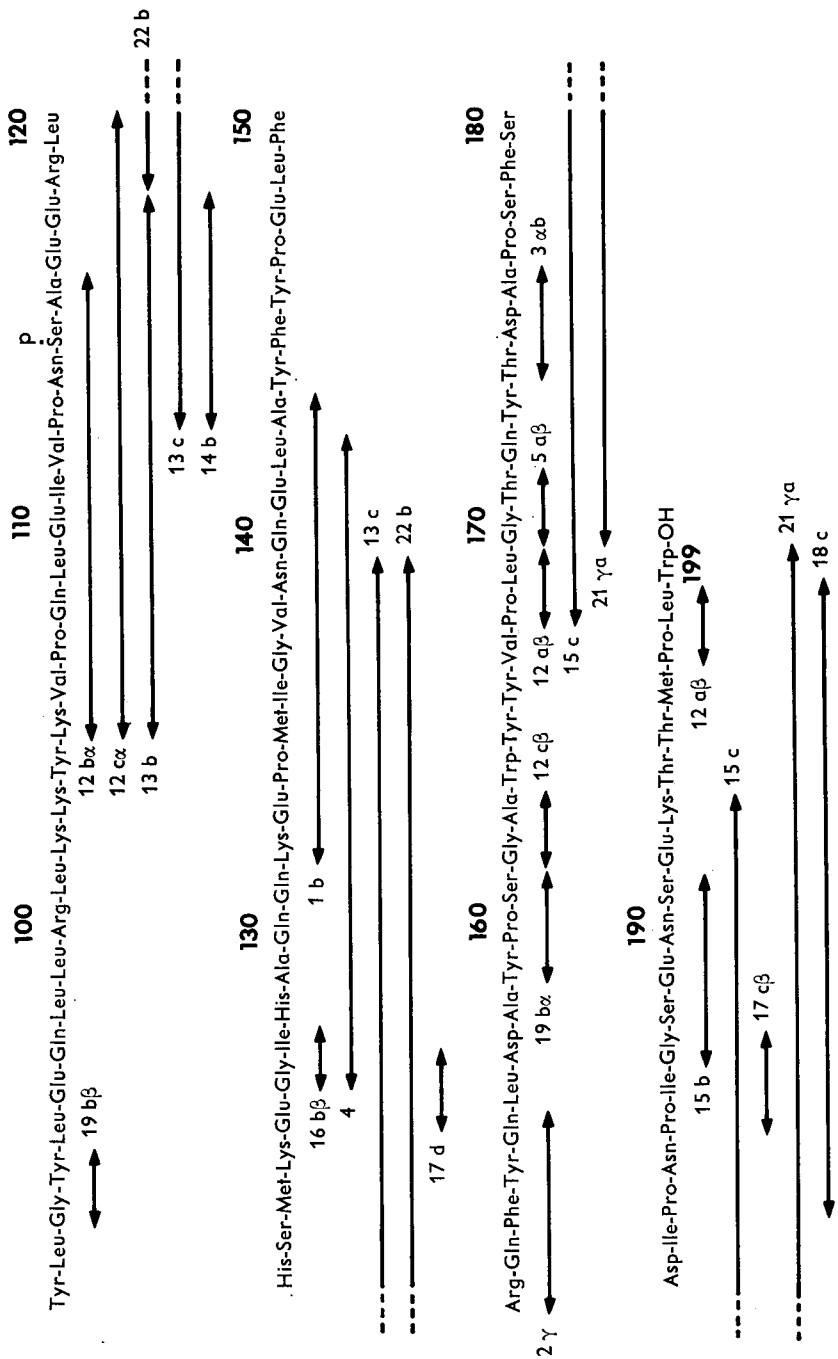


FIG. 5. — Séquence de la caséine α_{s1} selon Mercier *et al.* (1972) et ruptures de liaisons peptidiques les plus probables au cours d'un chauffage à 120 °C durant 20 mn à pH 6,8. Les petits peptides des fractions 12 a, 12 b, 12 c, 13 a, 13 b, 13 c, 14 a, 14 b, 15 a, 15 b, 15 c, 16 a, 16 b, 16 c, 17 a, 17 b, 17 c, 17 d, 18 a, 18 b, 18 c, 19 a, 19 b, 19 c, 21 a, 21 b, 21 c, 21 d, ont été identifiés différemment par chromatographie en couche mince.

On observe également une grande diversité des acides aminés N terminaux apparus dans les solutions chauffées. Cependant, le tableau 5 indique que pour les peptides solubles la rupture des liaisons se fait surtout au niveau du groupe amide du glycocolle (presque toutes les liaisons impliquant son groupe amidé), de la proline (au moins 10 liaisons rompues sur 17), de l'arginine (au moins 3 liaisons rompues sur 6). De plus, des essais sur les substances insolubles à pH 4,6 non mentionnés ici, indiquent la présence de nombreux acides aminés N terminaux tels que Arg, Pro, Glx, Asx, Gly, Leu et Val.

La figure 5 illustre la localisation des peptides solubles dans la molécule et indique aussi les ruptures de liaisons les plus fréquentes parmi lesquelles : Leu—Pro, Leu—Asn,

Ile—Gly,	Glu—Arg,	Ser—Gly,	Leu—Gly	et Met—Pro																
44	45	118	119	161	162	169	170	196	197											

Des ruptures de liaisons adjacentes peuvent expliquer la libération de certains acides aminés libres tels que Ser, Gly, Leu et Lys.

7. — Propriétés stimulantes de la croissance de *Streptococcus thermophilus*.

Peu de substances solubles à pH 4,6 sont activatrices alors que des fractions insolubles isolées par chromatographie sur DEAE cellulose puis par filtration sur Gel ont toutes une activité supérieure à 120 (tabl. 2 et 4) ; seule, la fraction I qui doit représenter la caséine initiale peu dégradée est peu active. Les substances activatrices ne semblent pas se trouver parmi les peptides de faible taille moléculaire (masse molaire apparente inférieure à 1 000) ou dans les substances non ultrafiltrables à pH 7 sur membranes PM 30 (PM 30 000). Les substances les plus actives semblent avoir une masse molaire comprise entre 1 000 et 10 000.

L'étude de l'activité des peptides solubles issus de la caséine α_{s1} chauffée nous permet de faire plusieurs constatations :

— Il semble que l'activité croît avec la basicité du peptide. Deux exemples peuvent être cités : les peptides 2 β , 17 c, 21 $\delta\alpha$ issus du fragment (36-53) dont les activités respectives sont 92, 110 et 150 et les 2 peptides 23 α et 25 γ issus du fragment (45-53) et dont les activités sont de 102 et 122.

— Deux peptides de basicité voisine mais issus de 2 fragments ne différant que par un résidu Lysine ont une activité différente : le peptide 23 β (37-53) a une activité inférieure ($A = 92$) à celle du peptide 21 $\delta\alpha$ (36-53).

— La méthionine semble également jouer un rôle activateur car l'activité de la fraction 7 ($A = 123$) est supérieure à celle de 23 β ($A = 92$).

— L'acide glutamique joue aussi un rôle activateur car l'activité de 13 b ($A = 102$) est nettement supérieure à celle de 12 b ($A = 73$) qui contient 2 résidus glutamyle contigus en moins.

Nous avons également remarqué qu'avant purification certaines substances sont actives mais qu'au fur et à mesure que le degré de pureté augmente, le pouvoir activateur tend à disparaître ; ainsi la masse globale de substances solubles à pH 4,6 a une activité de 150 alors que la plupart des fractions issues de ces substances sont inactives, peu actives ou même inhibitrices, de même que la fraction 25 ($A = 150$) est

plus active que les fractions 25 α (A = 130), 25 β (A = 86) et 25 γ (A = 122) qui en sont issues.

On peut aussi constater que les peptides qui renferment peu d'acides aminés (15 a, 15 b, 25 β) sont inhibiteurs ou peu activateurs surtout si, comme dans la fraction 15, il y a prédominance d'un acide aminé (ici l'acide aspartique).

Ces deux phénomènes doivent traduire le fait qu'une bactérie a plus de chance de trouver les acides aminés nécessaires à sa croissance dans un mélange complexe de peptides que dans un seul purifié.

Discussion.

Dans un travail antérieur (Lorient et Alais, 1974) nous avons montré que la dégradation des caséines par la chaleur (120 °C, 20 mn) impliquait la rupture d'un très petit nombre de liaisons peptidiques par molécule alors que les propriétés électriques, optiques, électrophorétiques étaient très sensiblement modifiées. Un nombre moyen de ruptures aussi faible (1 à 2 par molécule selon les caséines) pouvait laisser supposer que les peptides libérés étaient en nombre également réduit si comme dans certaines hydrolyses enzymatiques, il y avait eu spécificité de rupture. Or, le très grand nombre de substances peptidiques libérées provenant aussi bien de la caséine α_{s1} (64 peptides solubles à pH 4,6 identifiés) que de la caséine β , ainsi que le faible rendement d'obtention de celles-ci montrent que la rupture des liaisons peptidiques par la chaleur à pH 6,8 doit être très peu spécifique et le plus souvent partielle.

Pendant, la rupture des liaisons ne s'opère pas tout à fait au hasard ; les substances libérées de faible masse moléculaire sont généralement plus pauvres en acides aminés aromatiques et plus riches en acides aminés hydroxylés que la caséine initiale. De plus, les acides aminés N et C terminaux apparaissent au cours du chauffage avec des fréquences très différentes ; il semble que certaines liaisons peptidiques telles que Leu—Arg, Leu—Gly, Leu—Ser, Leu—Glu, Leu—Pro, Ser—Gly, Ser—Glu, Leu—Lys, Ser—Lys soient plus sensibles au chauffage que les autres.

Les acides aminés libres retrouvés dans les solutions chauffées sont également ceux que l'on retrouve le plus fréquemment aux extrémités des chaînes peptidiques c'est-à-dire Ser, Gly, Leu et Lys.

Dans le cas de la caséine α_{s1} un grand nombre de peptides solubles à pH 4,6 proviennent de la partie centrale hydrophile (résidus 45 à 55, 64 à 69) et de certaines zones contenant de nombreux résidus polaires telles que 5-19, 105-120, 168-176 et 184-193.

L'abondance du phosphore dans les peptides solubles à pH 4,6 et de faible taille molaire confirme bien la fragilité de cette zone de la molécule. Le tryptophane reste, quant à lui, toujours situé dans la partie C terminale en grande partie insoluble à pH 4,6 et libérant des peptides de grande taille moléculaire. On observe toutefois des ruptures de faible rendement aux extrémités de la molécule ce qui explique la libération à partir de l'extrémité N terminale de petits peptides riches en Arg et Pro. Bien que la plupart des peptides isolés et purifiés aient pu être localisés dans la séquence de la caséine α_{s1} établie par Mercier *et al.* (1971), quelques-uns ne représentent pas un élément de structure connu. Cette anomalie ne pourrait s'expli-

quer, comme l'ont fait certains auteurs (Bjarnason et Carpenter, 1970), que par la formation d'une association de peptides due à une réaction de transamidation entre le groupe amide libre de l'asparagine ou de la glutamine et un groupe ϵNH_2 de la lysine ou αNH_2 d'un autre acide aminé libre ou N terminal.

L'anomalie peut s'expliquer aussi par les modifications subies par les acides aminés (Nakanishi et Itoh, 1967 ; Osner et Johnson, 1974) : diminution de la sérine, de la thréonine, de la lysine et de l'isoleucine, augmentation du glycolle, de l'alanine, ce qui rend parfois la localisation des peptides imprécise. Mentionnons aussi la possibilité de formation de lysinoalanine qui résiste fortement à l'hydrolyse ce qui diminue les valeurs de lysine et de sérine.

Les propriétés stimulantes des peptides sur la croissance des bactéries lactiques sont connues depuis longtemps (Sandine *et al.*, 1956 ; Baudet *et al.*, 1960) ; la nature de certains peptides a été mieux précisée récemment (Desmazeaud et Hermier, 1972). Les substances libérées de la caséine par le chauffage étant de nature peptidique, présentent aussi des propriétés activatrices ou inhibitrices de la croissance de *Streptococcus thermophilus* et peuvent sans doute expliquer en partie l'amélioration de la croissance de ces bactéries par chauffage du lait et observée par plusieurs auteurs (Auclair et Portmann, 1955, 1958). On peut associer ces propriétés à différents paramètres : masse molaire, composition en acides aminés, glucides et phosphore, séquence... Le fractionnement sur membranes Diaflo et sur Séphadex G15 a montré que les peptides dont la masse molaire est comprise entre 1 000 et 10 000 sont les plus actifs ; cela concorde avec les résultats de Desmazeaud et Hermier (1972) qui indique une masse molaire de 1 500 pour les peptides activateurs de *Streptococcus thermophilus* provenant de la dégradation de la caséine par une protéase microbienne. La composition en acides aminés joue également un grand rôle puisque nous avons constaté que les peptides les plus activateurs sont ceux dont la composition est la mieux équilibrée (substances de grande masse molaire insolubles à pH 4,6) alors que les propriétés inhibitrices semblent correspondre à l'absence ou à l'abondance dans le peptide d'un ou plusieurs acides aminés. Desmazeaud (1972) a noté le rôle activateur de l'histidine et le rôle inhibiteur de la sérine alors que de notre côté nous avons constaté de plus le rôle activateur de l'acide glutamique. Cependant, la forme sous laquelle se trouvent les acides aminés paraît importante puisque pour une composition identique de l'hydrolysât, l'activité est plus grande pour les peptides basiques dont les résidus Glu et Asp sont amidés. Des travaux en cours ont également confirmé le rôle inhibiteur de l'acide aspartique et de l'isoleucine.

Ainsi, ces acides aminés jouent un rôle aussi bien sous forme libre que sous forme combinée mais il conviendra de préciser leurs actions réciproques.

Accepté en octobre 1976.

Remerciements. — Nous remercions vivement Monsieur B. Ribadeau-Dumas pour ses précieux conseils.

Références

- ALAIS C., KIGER N., JOLLES P., 1967. Action of heat on cow χ casein. Heat caseino-glycopeptide. *J. Dairy Sci.*, **50**, 1738-1743.
- ASCHAFFENBURG R., 1963. Preparation of β -casein by a modified urea fraction method. *J. Dairy Res.*, **30**, 259-260.
- AUCLAIR J. E., PORTMANN A., 1955. Influence du chauffage du lait sur le développement des bactéries. I. — Croissance des bactéries lactiques dans des laits chauffés à des températures variables. *Ann. Techn. agric.*, **4**, 121-131.
- AUCLAIR J. E., PORTMANN A., 1958. Influence du chauffage du lait sur le développement des bactéries. II. — Effet stimulant du lait autoclavé sur la croissance de *Lactobacillus lactis*. Rôle de l'acide formique. *Ann. Techn. agric.*, **7**, 129-150.
- BAUDET P., ROSSLER R., CHERBULIEZ E., 1960. Streptogénines de la caséine. *Helv. Chim. Acta*, **43**, 1795-1825.
- BJARNASON J., CARPENTER K. J., 1950. Mechanisms of heat damage in proteins. II. — Chemical changes in pure proteins. *Br. J. Nutr.*, **24**, 313-329.
- DELSAL J. L., MANHOURI H., 1958. Etude comparative des dosages colorimétriques du phosphore, IV. — Dosage de l'orthophosphate en présence d'ester phosphorique. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **40**, 1623-1630.
- DESMAZEAUD M. J., HERMIER J. H., 1972. Isolement et détermination de la composition qualitative de peptides issus de la caséine, stimulant la croissance de *Streptococcus thermophilus*. *Eur. J. Biochem.*, **28**, 190-198.
- FREIMUTH U., SCHLÉGEL B., GAHNER R., NOTZOLD H., 1974. Formation of lysinoalanine in alkali treated milk proteins. *Nahrung*, **18**, K₅-K₈.
- HINDLE E. J., WHEELOCK, J. V., 1970. The release of peptides and glycopeptides by the action of heat on cow's milk. *J. Dairy Res.*, **37**, 397-405.
- LAHAV E., EDELSTEN D., SODE-MOGENSEN M. T., SOFER E., 1971. Properties of basic glycopeptides released from cow milk protein by heat. *Milchwissenschaft*, **26**, 489-495.
- LORIENT D., ALAIS C., 1970. Dégradation thermique des caséines α_s et β de vache. I. — Facteurs de variations de la dégradation, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **52**, 915-926.
- LORIENT D., ALAIS C., 1974. Dégradation thermique des caséines α_s et β de vache. II. — Modifications des propriétés physico-chimiques. *Biochimie*, **56**, 667-673.
- MERCIER J. C., MAUBOIS J. L., POZNANSKI S., RIBADEAU-DUMAS B., 1968. Fractionnement préparatif des caséines de vache et de brebis par chromatographie sur DEAE Cellulose en milieu urée et 2-mercapto-éthanol. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **50**, 521-530.
- MERCIER J. C., GROSCLAUDE F., RIBADEAU-DUMAS B., 1971. Structure primaire de la caséine α_{s1} bovine. *Eur. J. Biochem.*, **23**, 41-51.
- NAKANISHI T., ITOH T., 1967. Studies on the changes of the milk casein by various treatments. IV. — Changes of the casein solution by heat treatment. *J. Agric. Chem. Soc. Japan*, **41**, 130-134.
- OSNER R. C., JOHNSON R. M., 1974. Nutritional and chemical changes in heated casein. I. — Preliminary study of solubility, gel filtration pattern and amino-acid pattern. *J. Fd Technol.*, **9**, 301-308.
- SANDINE W. E., SPECK M. L., AURAND L. W., 1956. Identification of constituent amino acids in a peptide stimulatory for lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.*, **39**, 1532-1541.
- SCHROEDER W. A., JONES R. I., CORMICK J., Mc CALLA K., 1962. Chromatographic separation of peptides on Ion Exchanges resins. Separation of peptides from enzymatic hydrolysates of the α , β and γ chains of human hemoglobins. *Anal. Chem.*, **34**, 1570-1576.
- THOMPSON M. P., KIDDY C. A., 1964. Genetic polymorphism in caseins of cow's milk. III. — Isolation and properties of α_{s1} -caseins A, B and C. *J. Dairy Sci.*, **47**, 626-632.
- WOODS K. R., WANG K. T., 1967. Separation of dansylaminoacids by polyamide layer chromatography. *Biochim. Biophys. Acta*, **133**, 369-370.
-