



## RECHERCHES SUR LA CASÉINE II

E. Cherbuliez, Fr. Meyer.

### ► To cite this version:

E. Cherbuliez, Fr. Meyer.. RECHERCHES SUR LA CASÉINE II. Le Lait, 1934, 14 (132), pp.132-145. <hal-00895145>

**HAL Id: hal-00895145**

**<https://hal.science/hal-00895145v1>**

Submitted on 11 May 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization

- [14] G. C. SUPPLEE, G. E. FLANIGAN, O. J. KAHLENBERG et A. F. HESS. *Jour. Biol. Chem.*, 1931, **91**, 773.
- [15] H. STEENBOCK, E. B. HART, C. A. HOPPERT et A. BLACK. *Jour. Biol. Chem.*, 1925, **66**, 441.
- [16] A. L. N. DINGEE. *Jour. Phys. Therap.*, 1930, **48**, 229.
- [17] R. J. FOSBINDER, F. DANIELS et H. STEENBOCK. *Jour. Am. Chem. Soc.*, 1928, **50**, 923.
- [18] S. K. KON, F. DANIELS et H. STEENBOCK. *Jour. Am. Chem. Soc.*, 1928, **50**, 2573.
- [19] A. L. MARSHAL et A. KNUDSON. *Jour. Am. Chem. Soc.*, 1930, **52**, 2304.
- [20] G. H. MAUGHAN. *Am. Jour. Physiol.*, 1928, **85**, 392.
- [21] M. J. DORCAS. *Jour. Ind. and Eng. Chem.*, 1930, **22**, 1244.
- [22] C. E. GREIDER. *Jour. Ind. and Eng. Chem.*, 1931, **23**, 508.
- [23] W. W. COBLENTZ, M. J. DORCAS et C. W. HUGHES. *Bur. of Standards Science Paper No. 539*, 19 novembre 1926.
- [24] H. C. RENTSCHLER. *Jour. Am. Inst. Elec. Eng.*, 1930, **49**, 113.
- [25] H. STEENBOCK et A. BLACK. *Jour. Biol. Chem.*, 1925, **64**, 263.
- [26] H. C. SHERMAN et A. M. PAPPENHEIMER. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 1920-1921, **18**, 193.

## RECHERCHES SUR LA CASÉINE II(1)

par

E. CHERBULIEZ et FR. MEYER.

Dans un précédent mémoire (2), M<sup>lle</sup> SCHNEIDER, avec l'un de nous, a montré l'existence, dans la caséine du lait de vache, d'au moins deux corps (ou groupes de corps) différents, et a mis ainsi en évidence la non-homogénéité de ce protide. Le procédé de séparation de CHERBULIEZ et SCHNEIDER repose sur l'extraction de la caséine totale par une solution aqueuse de chlorure d'ammonium à 5 % ; la majeure partie de la caséine est insoluble dans ce dissolvant (nous avons désigné provisoirement cette fraction de la caséine par  $\alpha$ ) ; une partie (un sixième environ) se dissout dans la solution saline et peut en être reprécipitée par de l'acétone (cette dernière fraction étant désignée par  $\beta$ ). Les deux fractions  $\alpha$  et  $\beta$  ont été caractérisées non seulement par leurs solubilités, mais encore par leur composition centésimale et leur comportement vis-à-vis de la présure, ce qui permet de les distinguer nettement l'une de l'autre. En outre, CHERBULIEZ et SCHNEIDER ont discuté la question de savoir si le traitement mis en œuvre pourrait entraîner un clivage de la molécule du ou des protides employés ; ils sont

(1) Reproduit de *Helvetica Chimica Acta* **16**, 600 (1933), avec l'autorisation de la Rédaction.

(2) E. CHERBULIEZ et M. L. SCHNEIDER, *Helv.*, **15**, 597 (1932), reproduit dans *Le Lait* **13**, 264 (1933).

arrivés à la conclusion qu'il s'agit bien de la séparation de deux corps préexistants et non d'un début de désagrégation de la caséine.

Ces premiers résultats sont encore très incomplets. Il y a d'abord le point fondamental sur lequel il y a lieu d'insister : le traitement par le chlorure d'ammonium dilué produit-il une séparation, et non un clivage, comme C. et S. l'affirment, ou bien y a-t-il clivage et non séparation ? On se demandera ensuite si les deux fractions  $\alpha$  et  $\beta$  sont, elles, homogènes, et si les proportions des différents constituants de ce qu'on appelle caséine du lait de vache sont *constantes ou non*. Dans le présent mémoire, nous répondrons, par nos résultats expérimentaux, à ces deux dernières questions ; et nous trouverons dans nos résultats de nouveaux arguments en faveur de l'idée d'une simple séparation de constituants préexistants et non d'un clivage.

#### I. UNE NOUVELLE MÉTHODE DE FRACTIONNEMENT DE LA CASÉINE.

— a) **Généralités.** — L'extraction de la caséine  $\beta$  (soluble dans le chlorure d'ammonium à 5 %) de la caséine totale, par simple suspension de cette dernière dans la solution saline, risque fort d'être incomplète, et le résidu insoluble, la caséine  $\alpha$ , pourrait fort bien contenir encore une certaine proportion de  $\beta$ . C'est pour nous en assurer que nous avons repris les essais de séparation des caséines  $\alpha$  et  $\beta$  par précipitation de la caséine d'une solution dans de la soude caustique très diluée en présence de chlorure d'ammonium.

Ces essais ont montré non seulement que la caséine  $\alpha$  de C. et S. retenait encore une certaine quantité (jusqu'à environ 10 %) de substance soluble dans le chlorure d'ammonium à 5 %, mais encore que la fraction  $\alpha$  était formée elle-même de deux constituants,  $\alpha I$  et  $\alpha II$ . Ces deux fractions peuvent être séparées grâce à la plus grande tendance à la floculation de la solution de  $\alpha I$  : lorsque cette fraction est présente en proportion relativement élevée, elle est précipitée d'une solution de « caséine » dans de la soude caustique 0,01-n, en présence de 5 % de chlorure d'ammonium, lorsqu'on a ajouté la quantité d'acide chlorhydrique équivalente à la soude caustique employée (le pH de la solution est alors de 4,8) ; lorsque cette première fraction est accompagnée de beaucoup de la seconde ( $\alpha II$ ), la précipitation ne se fait qu'à un pH plus faible, à 4,6 ;  $\alpha II$  est précipitée de cette solution par addition de 10 à 20 % d'acétone. Cette séparation n'est pas quantitative ; le précipité de  $\alpha I$  entraîne facilement une certaine quantité de  $\alpha II$  et, inversement,  $\alpha II$  retient toujours un peu de la fraction  $\alpha I$  en solution. Ces phénomènes compliquent l'étude de la séparation des différents constituants de la caséine, ceci d'autant plus que les proportions relatives des fractions dans la « caséine » ne sont pas constantes. Ces faits expliquent également les résultats négatifs que C. et S. ont obtenu en voulant reprécipiter de leur « caséine » la fraction «  $\alpha$  » par neutralisation

exacte d'une solution dans de la soude caustique en présence de chlorure d'ammonium ; ils n'ont observé aucune précipitation dans ces conditions, parce que leur caséine était très riche en  $\alpha_{II}$ .

Quant à la fraction  $\beta$ , soluble dans le chlorure d'ammonium dilué, nous allons montrer qu'elle n'est point homogène non plus : lorsqu'on porte la solution de «  $\beta$  » (qu'elle contienne 10 à 20 % d'acétone ou non) au pH 3,6, il y a précipitation d'une partie seulement de la substance dissoute ( $\gamma$ ) ; le reste ( $\delta$ ) peut en être précipité par addition de 4 volumes d'acétone.

Cette multiplication des fractions de la caséine est presque un peu inquiétante ; on se demandera à bon droit si cette séparation de fractions est bien réelle ou si elle n'est pas le résultat d'une altération progressive de la caséine au cours du traitement, ou bien encore s'il s'agit tout simplement de mélanges en proportions variables de deux constituants. Nous croyons pouvoir écarter ces hypothèses. En soumettant nos fractions à nouveau aux opérations de séparation, les produits obtenus finissent par se comporter comme des corps homogènes — cette vérification a été faite pour les fractions  $\alpha_I$ ,  $\alpha_{II}$  et  $\gamma$  — qui sont caractérisés chacun par un ensemble de propriétés constantes. Un second argument, de grand poids selon nous, en faveur de la notion de la préexistence de nos fractions, repose sur le fait que différentes caséines nous ont donné des proportions variables de nos quatre fractions : s'il y avait un phénomène de dégradation d'une matière première déterminée, au cours d'un processus réalisé toujours exactement dans les mêmes conditions, le résultat devrait être constant.

**b) Description du procédé.** — Ce qui suit est la description d'un procédé qui résulte de nombreux tâtonnements qu'il est inutile de rappeler ici et au sujet desquels on trouvera des indications détaillées dans la thèse de M. Fr. MEYER (1).

5 gr. de caséine sont suspendus dans 380 cm<sup>3</sup> de chlorure d'ammonium (2) à 5 % + 30 cm<sup>3</sup> NH<sub>4</sub>Cl 20 %. Pour dissoudre la caséine, on ajoute lentement à la suspension agitée mécaniquement 45 cm<sup>3</sup> de soude caustique décimale, par portions de 5 cm<sup>3</sup> d'abord, les derniers 10 cm<sup>3</sup> par portions de 1 cm<sup>3</sup>. A la solution opalescente obtenue et agitée toujours, on ajoute ensuite lentement 45 cm<sup>3</sup> d'acide chlorhydrique décimormal. A ce moment, la solution a un pH de 4,8. Il se produit généralement une précipitation ; si cette précipitation fait défaut, on ajoute encore de l'acide décimormal par portions de 0,5 cm<sup>3</sup> jusqu'au pH 4,6. Il se produit alors toujours une floculation. On centrifuge la liqueur et obtient ainsi la frac-

(1) Nouvelles recherches sur la caséine, thèse n° 927, Genève 1933.

(2) Sur la nécessité d'employer un sel très pur, notamment exempt de sulfate, voir C. et S., *Le Lait*, loc. cit., p. 271.

tion  $\alpha I$ . Le dépôt est jeté sur un filtre, lavé à l'acétone à 80 %, puis traité, pendant plusieurs heures chaque fois, par de l'acétone, puis par de l'éther dans un appareil *Soxhlet* modifié (1).

La solution décantée de  $\alpha I$  (un peu moins de 500 cm<sup>3</sup>) est additionnée de un cinquième de son volume environ (100 cm<sup>3</sup>) d'acétone (exempte d'alcool méthylique). La solution se trouble fortement ; elle est centrifugée et fournit ainsi la fraction  $\alpha II$  qui est lavée et traitée comme  $\alpha I$ .

Les eaux-mères obtenues sont additionnées de 12 cm<sup>3</sup> 5 d'acide chlorhydrique décinormal : la caséine  $\gamma$  est précipitée et séparée par centrifugation, etc.

Les eaux-mères de  $\gamma$  sont additionnées de 2 litres d'acétone. La solution se trouble ; après 24 heures de repos, on décante et filtre le précipité de la fraction  $\delta$ . Les fractions  $\gamma$  et  $\delta$  sont lavées à l'acétone à 80 % et traitées à l'acétone et à l'éther comme la fraction  $\alpha I$ .

Pour purifier les fractions, on les redissout et on les reprécipite, comme lors de la première séparation d'une solution dans environ 100 parties de dissolvant. Les fractions  $\alpha I$  et  $\alpha II$  seront donc suspendues dans du chlorure d'ammonium dilué, dissoutes par addition de soude caustique décinormale, etc. La fraction  $\gamma$  est reprise tout simplement dans du chlorure d'ammonium à 5 % par agitation mécanique pendant quelques heures ; si la solution obtenue est trouble, elle est centrifugée ; la liqueur décantée est ensuite acidulée par addition de 25 cm<sup>3</sup> d'acide décinormal par litre de solution, etc. La fraction  $\delta$  n'a pas été reprécipitée.

**c) Les variations du pH au cours de la séparation.** — L'étude des variations du pH au cours des opérations est importante à deux points de vue. Il est tout d'abord d'importance capitale d'éviter tout pH supérieur à 7 à cause de l'instabilité de la caséine dès que la réaction du milieu cesse d'être acide. En outre, la séparation des fractions est réalisée avant tout par une variation du pH ; il importe donc d'en connaître la marche.

Nous avons déterminé les pH par voie colorimétrique (selon KOLTHOFF (2)). Comme ces déterminations ne sont que relatives, nous croyons utile d'indiquer exactement nos conditions de travail :

Solutions-tampons : ClH 0,1-n. — biphthalate de potassium 0,1-n. pH 3,4-3,8

NaOH 0,1-n. — biphthalate de potassium 0,1-n. pH 4,0-5,8

NaOH 0,1-n. — PO<sup>4</sup>H<sup>2</sup>K 0,1-n. pH 6,0-7,4

(1) Voir C. et S., loc. cit., p. 271, sur la nécessité de ce traitement et l'appareil. — La modification de l'appareil consiste en ceci : la partie inférieure du *Soxhlet* est prolongée de manière à plonger dans le liquide d'extraction et à empêcher ainsi l'arrivée directe des vapeurs du dissolvant ; un tube supplémentaire fait passer les vapeurs dans le haut du réfrigérant, de sorte que l'extraction se fait à la température ordinaire, avec un distillat refroidi.

(2) L'emploi des indicateurs colorés, Paris 1926.



Intervalle de  $pH$  entre deux solutions : 0,2

Indicateurs : solutions alcooliques à 0,04 % de :

bleu de bromophénol ...	$pH$ 3,4-4,4	10 gouttes	} pour 5 cm <sup>3</sup>
rouge méthyle .....	$pH$ 4,6-5,6	2 gouttes	
pourpre de bromocrésol..	$pH$ 5,8-6,2	10 gouttes	
bleu de bromothymol ...	$pH$ 6,4-7,4	10 gouttes	

Pour compenser le trouble des solutions, on superpose, dans des éprouvettes de même diamètre, à la solution à examiner une éprouvette avec de l'eau, à la solution-tampon colorée une éprouvette avec la solution de caséine non colorée. Précision : 0,1; la comparaison est délicate surtout pour les solutions très troubles entre 4,4 et 5,0.

#### *Dissolution, et séparation de $\alpha I$ et $\alpha II$ .*

A titre d'exemple, nous donnerons dans un tableau la marche du  $pH$  au cours d'une opération faite avec 2 gr. de caséine suspendus dans 130 cm<sup>3</sup> de chlorure d'ammonium à 5 % + 20 cm<sup>3</sup> de solution à 20 % :

Dissolution		Précipitation de $\alpha I$		
cm <sup>3</sup> NaOH 0,1-n. f = 0,825	$pH$	cm <sup>3</sup> ClH 0,1-n.	$pH$	Aspect de la solution
0	4,8	0	6,5	limpide
5	5,3	5	6,2	limpide
10	5,6	10	5,9	limpide
15	5,9	15	5,4	limpide
20	6,1	20	5,2	légèrement trouble
25	6,2	22	4,8	fortement trouble
26	6,3	23	4,8	suspension laiteuse
27	6,3	24	4,7	floculation
28	6,4	25	4,6	précipitation
29	6,4	addition de 20 cm <sup>3</sup> d'acétone : $\alpha II$		précipitation
30	6,5			

Ce tableau montre d'abord qu'au cours de la dissolution, le  $pH$  ne dépasse pas 6,5; la solution reste donc toujours acide. Le tableau montre ensuite que, dans ce cas particulier, la précipitation de  $\alpha I$ , débutant au  $pH$  4,8, ne se fait complètement qu'au  $pH$  4,6.

#### *Séparation de $\gamma$ et $\delta$ .*

Elle repose sur l'effet de la variation du  $pH$ , mis en évidence par l'exemple suivant.

Une solution de  $\gamma + \delta$  a été préparée par extraction de 5 gr. de caséine par 500 cm<sup>3</sup> de chlorure d'ammonium + 50 cm<sup>3</sup> d'acétone. La présence d'acétone dans une proportion de 10 à 20 % facilite l'obtention d'une solution filtrable de  $\gamma + \delta$ , sans diminuer la quantité de produit extrait, comme nous l'ont montré une série d'essais faits *ad hoc*. Ceci est certainement à mettre en relation avec l'action précipitante de ces quantités d'acétone sur la fraction  $\alpha II$ . La solution ainsi obtenue

correspond à ce qu'on obtient au cours du processus de séparation, après précipitation de  $\alpha I$  et  $\alpha II$ , à la faible teneur en chlorure de sodium près (0,05 %) de cette dernière solution.

A des prises de 25 cm<sup>3</sup> de la solution obtenue, on ajoute des quantités variables, inférieures à 5 cm<sup>3</sup>, d'acide chlorhydrique centinormal; on filtre après 6 heures et ajoute au filtrat de l'acide centinormal de manière à parfaire 5 cm<sup>3</sup> d'acide.

ClH 0,01-n. cm <sup>3</sup>	Apparence			Filtrat	
	immédiate	après 1 h.	après 6 h.	ClH 0,01-n., cm <sup>3</sup>	apparence après 6 h.
1	limpide	limpide	limpide	+ 4	floculation
2	trouble lég.	trouble net	floc. lég.	+ 3	trouble
3	trouble net	floculation	dépôt floc.	+ 2	peu troublé
4	trouble fort	floculation	dépôt floc.	+ 1	limpide
5	floculation	floc. compl.	sédim.	+ 0	limpide

Après l'addition de 4 cm<sup>3</sup> d'acide chlorhydrique 0,01-n. pour 25 cm<sup>3</sup>, une nouvelle addition d'acide ne détermine plus de précipitation dans les eaux mères. Mais comme la floculation n'est rapide que lorsqu'on dépasse cette quantité d'acide, nous avons travaillé toujours avec un excès d'acide, soit 5 cm<sup>3</sup> d'acide centinormal pour 25 cm<sup>3</sup>, ou 25 cm<sup>3</sup> d'acide décínormal par litre. Avec cette quantité d'acide, on atteint dans la règle un pH de 3,6 à 3,4.

La solution acidulée, filtrée de  $\gamma$ , dépose finalement la fraction  $\delta$  après addition de 4 volumes d'acétone. Cette grande quantité d'acétone est nécessaire, comme nous l'ont montré des essais faits par addition à un volume de liqueur mère de  $\gamma$ , de 1 à 5 volumes d'acétone. Une précipitation très faible commence à se former dès le premier volume d'acétone, mais ce n'est qu'après addition de 4 volumes d'acétone qu'une nouvelle addition du dissolvant organique ne détermine plus de précipitation dans le filtrat.

**II. ÉTUDE DE LA CASÉINE ET DE SES FRACTIONS. — a) Les fractions.** — Les fractions obtenues d'après le procédé qu'on vient de lire sont purifiées par reprécipitation.

En reprécipitant  $\alpha I$ , on constate que cette substance floccule d'autant plus facilement au cours de la neutralisation qu'elle est plus pure. Tandis que dans la caséine totale,  $\alpha I$  n'est précipité de la solution dans de la soude caustique chloro-ammoniée que lorsque la totalité de l'acide correspondant à l'alcali est introduite (pH 4,8), ou même quelquefois seulement lorsque le pH est amené à 4,6, le produit tel qu'il est obtenu par une première séparation précipite toujours par neutralisation exacte de la soude caustique employée. Lorsque  $\alpha I$  est très pur, sa précipitation commence presque dès le début de l'addition d'acide, et s'achève au fur et à mesure de son introduction dans la solution. Les pertes lors de la reprécipi-

tation d'une fraction  $\alpha I$  pure sont minimales ; cette fraction est donc très peu soluble dans le chlorure d'ammonium à 5 %.

La fraction  $\alpha II$  est reprécipitée par neutralisation de sa solution dans de la soude caustique chloro-ammoniée et addition d'un cinquième du volume d'acétone. Dans certaines conditions que nous n'avons pas pu préciser, la précipitation de fractions  $\alpha II$  très pures s'est faite par simple neutralisation, comme pour  $\alpha I$ . Les pertes lors de la reprécipitation (toujours d'une solution dans 100 parties de dissolvant) sont beaucoup plus élevées (20 à 30 %) que pour  $\alpha I$ .

La fraction  $\gamma$  est aussi relativement soluble dans le chlorure d'ammonium à 5 % au pH 3,6, de sorte que sa reprécipitation par acidulation de la solution chloro-ammoniée par 2 cm<sup>3</sup> 5 d'acide décimal pour 100 cm<sup>3</sup> entraîne également des pertes assez importantes.

*Composition centésimale des fractions (1).*

Fraction	C	H	N	P	S
$\alpha I$ .....	50,4	7,4	15,2	0,65	0,78
$\alpha II$ .....	52,5	7,0	14,9	0,55	0,70
$\gamma$ .....	51,4	7,0	15,7	0,69	0,51
$\delta$ .....	52,5	6,8	15,1	1,93	0,26

Les valeurs pour C et H ont été obtenues par combustion (macrométhode) en nacelle dans un tube chargé d'oxyde de cuivre et de chromate de plomb. La combustion doit être conduite très lentement, et sans oxygène au début (formation de gaz nitreux). La calcination finale dans un courant d'oxygène doit être assez longue pour assurer une oxydation complète du charbon englobé dans l'acide métaphosphorique formé. La fraction  $\delta$ , riche en phosphore, a été mélangée à de la magnésie calcinée. Les valeurs obtenues pour C et H ne sont pas très satisfaisantes — pour nos différents échantillons de caséine, nous avons trouvé des valeurs oscillant entre 51,2 et 53,5 % C et 6,4 et 7,0 % H — mais comme dans l'état actuel de la question la pureté et l'homogénéité de nos quatre fractions ne sauraient être affirmées, nous avons considéré comme inutile d'obtenir des valeurs définitives déjà maintenant.

L'azote a été dosé par KJELDAHL.

Pour le dosage du phosphore, du soufre et du calcium, voir notre note dans *Helv. Chim. Acta* 16, 613, 1933. La teneur en calcium a été négligeable.

Toutes les substances, assez hygroscopiques, ont été séchées à poids constant dans le vide de la trompe à eau, à 70° (3 heures).

Pour vérifier si les différentes fractions étaient souillées par du chlorure d'ammonium, nous avons fait des dosages de l'azote ammonium : on dissout 0 gr. 5 de substance dans 5 cm<sup>3</sup> d'eau de chaux, ajoute 100 cm<sup>3</sup> d'eau et 0 gr. 5 de magnésie

(1) Pour plus de détails concernant la partie analytique, voir la thèse déjà citée de FR. MEYER.



calcinée, et fait passer dans la suspension, sous pression réduite, pendant 2 heures, un courant d'air qui entraîne l'azote ammonium présent. L'ammoniac est retenu dans de l'acide sulfurique décínormal, et titré. La caséine ainsi que les fractions  $\alpha I$  et  $\gamma$  se sont montrées exemptes d'azote ammonium ; dans  $\alpha I$  et  $\delta$  nous avons trouvé 0,14 et 0,07 %. Ce sont là de très faibles quantités.

Nous avons dosé également le chlore (ionisé) : environ 0 gr. 1 de substance est dissous dans 10 cm<sup>3</sup> d'eau et 2 à 3 cm<sup>3</sup> de soude caustique décínormale. On acidule par 5 cm<sup>3</sup> d'acide nitrique à 25 %, ajoute 20 cm<sup>3</sup> de nitrate d'argent décínormal, filtre et titre l'excès d'argent par le rhodanate. Les résultats n'étaient pas tout à fait constants. La caséine était naturellement exempte de chlore,  $\alpha I$  et  $\alpha II$  en contenaient quelquefois (un échantillon de  $\alpha I$  a donné 1,3 % de chlore !);  $\gamma$  et  $\delta$  par contre en contenaient régulièrement : 2,28 % pour  $\gamma$  et 0,84 % pour  $\delta$ . Sans que nous ayons étudié ce point de plus près, il nous semble probable que ces deux dernières fractions sont obtenues à l'état de sels dans notre procédé.

**Les produits d'hydrolyse.** — Pour caractériser les substances retirées de la caséine, nous avons appliqué à leurs produits d'hydrolyse chlorhydrique le procédé d'analyse mis au point par LINDERS-TRÖM-LANG (1) précisément dans une étude sur la caséine. Voici les résultats obtenus avec des prises d'environ 3 gr. La fraction  $\delta$  n'a pas été examinée, par suite de manque de matériel.

Produit	N humique %	N amm. %	N. argin. %	Milli-équivalents par gramme subst.		
				groupes carbox.	groupes basiques	excédent des gr. basiques
Caséine I (2) .....	0,15	1,61	2,50	9,39	10,76	+ 1,37
$\alpha I$ .....	0,11	1,05	2,18	9,23	10,62	+ 1,39
$\alpha II$ .....	0,07	0,39	1,43	8,43	9,54	+ 1,11
$\gamma$ .....	0,16	1,77	0,12	8,96	8,62	— 0,34

Ce qui ressort de plus frappant de ces chiffres, c'est la diminution de la teneur en arginine, en allant de  $\alpha I$  à  $\gamma$ , et de même la diminution parallèle de l'excédent des fonctions basiques sur les fonctions acides. La précision de ces chiffres n'est du reste pas très grande, comme le montre par exemple la comparaison du chiffre pour l'azote arginique de la caséine, à celui des trois fractions examinées.

Les chiffres pour l'équivalent à la neutralisation à la phénolphtaléine et l'azote formol n'ont rien de très caractéristique.

**Teneur en tryptophane.** — Nous avons procédé comme suit, selon KOMM et BÖHRINGER (3) : 0 gr. 05 de substance sont suspendus

(1) C. R. trav. Lab. Carlsberg, **17**, n° 9 (1929).

(2) Les différents échantillons de caséine employés sont désignés par des chiffres romains.

(3) Z. physiol. Ch., **124**, 287 (1922).

dans 5 cm<sup>3</sup> d'eau. On ajoute 5 cm<sup>3</sup> ClH 15 % contenant 0,012 % d'aldéhyde formique, et finalement 10 cm<sup>3</sup> d'acide sulfurique concentré, en deux portions. L'addition de l'acide sulfurique provoque un échauffement assez considérable, qui s'accompagne de dégagement de gaz chlorhydrique, et au cours duquel la substance se dissout rapidement. En présence de protides contenant du tryptophane, il se produit une coloration bleu-violet plus ou moins intense. Après le refroidissement spontané, on compare la coloration obtenue à celle produite avec 5 cm<sup>3</sup> de solution de tryptophane pur à 0,02 %.

Voici nos résultats :

Produit	Caséine III	$\alpha$ I	$\alpha$ II	$\gamma$	$\delta$
Teneur en tryptophane, % . . . . .	1,5	0,5 (1)	2,2	0,5	0,2

De nouveau, ces chiffres ne peuvent servir qu'à titre d'orientation; ils permettent cependant de distinguer très nettement les quatre fractions obtenues.

Selon nos observations, la couleur obtenue avec la caséine et ses fractions est d'une nuance quelquefois assez différente de la nuance bleue donnée par le tryptophane pur, ce qui rend la comparaison colorimétrique parfois très difficile. Les spectres d'absorption des différentes solutions ne montrent pas de grandes différences (relevés photographiques); la solution obtenue avec le tryptophane pur présente une bande lumineuse unique avec un minimum d'extinction à 5.500 Å. L'absorption dans le rouge est plus forte que pour les solutions obtenues avec les autres substances, chez lesquelles le minimum est plus ou moins déplacé, jusque vers 5.300 Å.

Malgré ses imperfections, cette méthode nous a rendu de très grands services, à cause de la facilité et de la rapidité de son exécution.

**La coagulation par la présure.** — C. et S. avaient déjà constaté une différence marquée dans le comportement de leurs fractions  $\alpha$  et  $\beta$  vis-à-vis de la présure. Nous avons repris l'étude de nos corps par la même technique.

0 gr. 15 de substance sont dissous dans 4 cm<sup>3</sup> 9 d'eau de chaux, puis additionnés lentement et en agitant de 0 cm<sup>3</sup> 58 d'acide phosphorique 1/15-m. Dans certains cas (fraction  $\alpha$ I et mélanges riches en  $\alpha$ I), cette quantité d'eau de chaux ne suffit pas pour la dissolution; il faut l'augmenter alors, et augmenter naturellement proportionnellement la quantité d'acide phosphorique ajouté ensuite. On ajoute finalement trois gouttes d'un extrait commercial de présure, porte pendant 10 minutes à 40°, laisse refroidir, contrôle l'apparence du coagulum et dose l'azote restant en solution.

(1) Il n'est pas facile d'obtenir une fraction très pauvre en tryptophane; le produit obtenu par une seule opération de séparation en contient généralement beaucoup plus, jusqu'à 1 %.

Pour la détermination de l'azote restant en solution, nous avons filtré le coagulum après repos d'une nuit et dosé l'azote dans une partie aliquote du filtrat. Notre présure commerciale contenait probablement encore de la pepsine, ce qui expliquerait la quantité relativement élevée d'azote trouvé en solution, après une nuit, même dans le cas d'une coagulation très complète.

La fraction  $\alpha I$  exige pour sa dissolution le double de la quantité d'eau de chaux nécessaire pour la dissolution des autres fractions.

Subst.	Ca(OH) <sup>2</sup> cm <sup>3</sup>	Apparence de la sol.		Coagulation	% de N total resté en sol.
		avant add. de PO <sup>4</sup> H <sup>3</sup>	après		
$\alpha I$ .....	9,8	limpide	laiteux	coag. part.	24,8
$\alpha II$ .....	4,9	limpide	floc.	solide	9,4
$\gamma$ .....	4,9	opalese.	laiteux	peu coag.	46,6
$\delta$ .....	4,9	limpide	limpide	pas coag.	77,9
50 $\alpha I$ , 50 $\alpha II$ ..	6,65			demi-sol.	—
20 $\alpha I$ , 80 $\alpha II$ ..	4,9			solide	—
10 $\delta$ , 90 $\alpha II$ ..	4,9			presque sol.	—

La coagulation de  $\alpha$  par la présure est toujours très incomplète, même avec une quantité d'acide phosphorique supérieure à celle qui correspond à l'eau de chaux employée, et avec une plus grande quantité de présure. Le coagulum est trop mou pour qu'on puisse retourner l'éprouvette.

$\alpha II$  se dissout facilement dans la quantité prévue d'eau de chaux, mais l'addition de l'acide phosphorique produit toujours une floculation partielle ; par action de la présure, il y a prise complète.

La solution de  $\gamma$  dans l'eau de chaux est fortement opalescente, ce qui ne se produit qu'avec cette fraction. L'addition de présure détermine la formation d'une espèce de gelée qui ne remplit qu'une partie du volume du liquide ; la solution filtrée est toujours opalescente.

$\delta$  finalement se dissout facilement et ne présente que peu à peu l'apparition d'un certain trouble.

On a nettement l'impression que c'est avant tout la fraction  $\alpha II$  qui est le porteur de la réaction de coagulation par la présure. Nous avons constaté du reste, pour  $\alpha II$ , qu'il y avait un certain parallélisme entre la coagulabilité par la présure et l'intensité de la réaction au tryptophane (qui dénote, selon nous, la présence de  $\alpha II$ ). Nous n'avons pas encore pu examiner une fraction  $\alpha I$  ne contenant sûrement plus de  $\alpha II$ . Des observations faites avec des mélanges de

différentes fractions (voir dernières lignes du tableau) confirment l'hypothèse que  $\alpha_{II}$  est avant tout le porteur de la réaction à la présure.

**b) La caséine. — Variabilité de la composition de la caséine.** — Ce qui précède met en évidence, non seulement que la caséine n'est pas un corps homogène — beaucoup d'auteurs sont déjà arrivés à cette conclusion — mais qu'elle est en réalité un mélange très complexe d'au moins quatre substances (ou groupes de substances) différentes. Quelle est la proportion de ces quatre substances dans la caséine ? Le résultat intéressant de l'application de notre procédé de séparation à toute une série de caséines de provenance différente (désignées par des chiffres romains), est que ces proportions ne sont pas constantes.

*Composition de quelques caséines.*

Substance	$\alpha_I$	$\alpha_{II}$	$\gamma$	$\delta$	Humidité	Pertes
Caséine II .....	11,0	60,8	4,9	5,6	11,0	6,3
Caséine III .....	51,8	5,1	7,0	1,7	12,0	—
Caséine III par extr. ..	—	—	5,3	3,5	—	13,6
Caséine IV .....	44,7	25,0	11,4	3,8	11,4	3,7
Caséine V .....	15,9	52,2	3,7	4,2	12,1	11,9
Caséine VI .....	12,4	43,5	?	4,0	12,3	27,3

Les caséines II et III étaient des produits commerciaux « caséine pure selon HAMMARSTEN » de la maison Schering-Kahlbaum.

Les caséines IV, V et VI ont été préparées par nous-mêmes.

*Préparation des caséines.* — Le lait (1) est additionné de 3 volumes d'eau, puis lentement, avec une forte agitation, de la quantité d'acide chlorhydrique décimormal nécessaire pour une floculation complète. La caséine IV provient de lait écrémé ordinaire (rendement : 2,64 %), V d'un lait dit spécial, écrémé par repos de deux heures à 25-30° (rendement : 2,68 %), VI d'un autre échantillon du même lait spécial, précipité sans écrémage. Les produits bruts sont séparés des eaux mères par décantation et centrifugation ; ensuite ils sont triturés dans un mortier et décantés deux fois avec beaucoup d'acétone à 80 %, puis avec de l'éther ; finalement ils sont traités au Soxhlet modifié par l'acétone, puis par l'éther. Le précipité de caséine VI, qui contenait la totalité de la matière grasse, a été débarrassé tout d'abord de la majeure partie de la graisse par une trituration du produit humide avec de l'éther, suivie du traitement indiqué pour IV et V.

Les données du tableau ont été obtenues par une seule opération de fractionnement ; la séparation de  $\alpha_I$  et de  $\alpha_{II}$  en particulier

(1) Nous saisissons cette occasion pour réitérer nos remerciements aux *Laiteries Réunies* à Genève, à l'obligeance desquelles nous devons nos échantillons de lait.

n'est pas complète. Les chiffres montrent néanmoins de très fortes variations qui dépassent de beaucoup les incertitudes inhérentes à notre procédé de séparation. Les très grands écarts obtenus dans l'analyse non seulement de produits commerciaux, mais encore de caséines préparées par nous-mêmes dans des conditions exactement déterminées et toujours les mêmes, sont de notre avis des arguments d'un très grand poids contre l'hypothèse d'une désagrégation de la caséine au cours des opérations de séparation. Il est difficile d'imaginer comment, à partir d'un corps défini et homogène, un traitement toujours le même pourrait conduire, dans des conditions aussi identiques que possible, à des résultats si divergents.

#### Préparation directe des quatre fractions à partir du lait.

— Si les fractions que nous retirons de la caséine s'y trouvent préformées et à l'état de simple mélange, il doit être possible de les obtenir directement à partir du lait, sans que l'on soit obligé d'en retirer d'abord le produit que nous appelons caséine. Le traitement du lait en présence de chlorure d'ammonium par de l'acide et de l'acétone, selon les indications générales données plus haut pour le fractionnement de la caséine, nous a donné en effet les quatre fractions prévues. Nous les appellerons A I, A II,  $\gamma$  et  $\delta$ . Ceci doit marquer que les deux premières fractions correspondent bien plus ou moins aux constituants  $\alpha$ I et  $\alpha$ II de la caséine, mais que ceux-ci y sont encore très incomplètement séparés l'un de l'autre ; les fractions  $\gamma$  et  $\delta$  par contre sont obtenues à peu près dans le même degré de pureté qu'à partir de la caséine (sauf  $\delta$ , qui est souillée probablement de lactalbumine ou lactoglobuline).

Nous avons dilué 300 cm<sup>3</sup> de lait écrémé (à partir duquel la caséine IV avait été préparée) par 600 cm<sup>3</sup> d'eau contenant 45 gr. de chlorure d'ammonium. Un essai sur une prise a montré que ce liquide s'éclaircit d'abord par addition d'acide, se trouble au pH 5,4, commence à précipiter à partir de 5,0, mais n'est nettement floculé qu'au pH 4,2. Les conditions de précipitation semblent donc être un peu différentes dans le lait de ce qu'elles sont dans des solutions de « caséine » pure. Le total du liquide (900 cm<sup>3</sup>) a été précipité par 229 cm<sup>3</sup> d'acide chlorhydrique décimal.

Rendement en caséine A I, dégraissée et séchée comme d'habitude : 4 gr. 02 = 1,34 %.

Par addition de 230 cm<sup>3</sup> d'acétone au liquide décanté de A I (environ 1.100 cm<sup>3</sup>), on obtient 4 gr. 76 = 1,59 % de A II.

Par addition de 50 cm<sup>3</sup> d'acide décimal, on précipite 0 gr. 37 = 0,12 % de  $\gamma$ .

Par addition de quatre volumes d'acétone, on obtient 0 gr. 44 = 0,15 % de  $\delta$ .  
Total des fractions caséiniques : 3,2 % (obtenu par précipitation simple à partir de ce même lait : 2,64 % de caséine).

Par distillation de l'acétone au bain-marie, les eaux mères de  $\delta$  fournissent encore 1 gr. 04 (= 0,34 %) d'un produit qui est probablement de la lactalbumine (teneur normale dans le lait : 0,3 à 0,5 %).



Purifiées par reprecipitation, les fractions A I et A II fournissent :

A I :  $\alpha$ I 77 %,  $\alpha$ II 2,5 %, pertes 20,5 % ;

A II :  $\alpha$ I 57 %,  $\alpha$ II 16 %,  $\gamma$  6 %, pertes 21 %.

Comparons maintenant les résultats de la séparation directe des fractions à celle du fractionnement de la caséine IV, retirée de ce même lait.

*Composition de la caséine IV.*

	$\alpha$ I	$\alpha$ II	$\gamma$	$\delta$	pertes
Séparation directe du lait . . . . .	58	9	7	4,5	22 %
Séparation de la caséine IV . . . .	50,4	28,2	12,9	4,3	4,2 %

L'accord entre les deux séries de chiffres est suffisant si on se rappelle les imperfections du procédé de séparation et les pertes lors de la reprecipitation.

Cette expérience montre en tout cas une chose, c'est que dans le lait, il existe non pas une « caséine » comme produit homogène, mais toute une série de protides se distinguant les uns des autres en particulier par leur précipitabilité par les acides en présence de chlorure d'ammonium : un premier, précipitant au pH 4,6-4,2 ; un second, précipité dans les mêmes conditions seulement en présence de 20 % d'acétone ; un troisième, précipité au pH 3,6 au plus bas ; et un quatrième, précipité seulement par un très grand excès d'acétone.

Si la séparation de  $\alpha$ I et de  $\alpha$ II dans les deux premières fractions A I et A II est très incomplète, elle est y cependant déjà amorcée, sans aucune intervention d'un réactif susceptible de provoquer une désagrégation, car il n'y a aucun motif d'admettre tout d'un coup que la présence de chlorure d'ammonium à la concentration de 5 % suffise à déterminer un début de désagrégation. Cela est mis en évidence non seulement par le résultat de la reprecipitation fractionnée de A I et de A II, mais encore par le comportement de ces deux substances vis-à-vis de la présure.

**La caséine et la présure.** — Nous avons constaté que seule parmi les quatre constituants de la caséine, la fraction  $\alpha$ II coagulait bien par la présure. Les mélanges de  $\alpha$ II avec d'autres fractions donnent un coagulum d'autant plus ferme que leur teneur en  $\alpha$ II est plus élevée. Du moment que la caséine est un mélange dans lequel la teneur en  $\alpha$ II peut présenter des variations très considérables, il faut s'attendre aussi à ce que sa coagulabilité par la présure présente des variations. Sans avoir fait encore des essais systématiques

dans cet ordre d'idées, nous trouvons cependant dans nos données expérimentales de quoi appuyer cette hypothèse, comme le montre le tableau suivant. Dans ce tableau, nous avons réuni des données qualitatives sur la coagulation, par la présure, de deux de nos caséines ainsi que des deux préparations A I et A II retirées directement du lait.

Substance	Eau de chaux cm <sup>3</sup> pr. 0 gr. 15	Teneur en $\alpha\pi$ %	Coagulum
Caséine II .....	4,9	60	très ferme
Caséine III .....	4,9	5,1	moins ferme
A I .....	9,8	2,5	demi-solide
A II .....	7,9	16	solide

Ce sera une étude très intéressante que de vérifier si dans la variation de la teneur en fraction  $\alpha\pi$  se trouverait peut-être une explication de l'existence de laits « paresseux » dont la mauvaise coagulation rend difficile ou parfois impossible l'emploi pour la fabrication du fromage.

#### RÉSUMÉ.

La caséine du lait de vache est un mélange d'au moins quatre substances, ou groupes de substances, qu'on peut séparer les unes des autres grâce aux variations de précipitabilité ( $pH$  et acétone) en présence de chlorure d'ammonium.

Des quatre fractions, celle qui a été désignée provisoirement par  $\alpha\pi$  semble être le porteur des propriétés de coagulabilité par la présure.

Les proportions des quatre constituants dans le mélange appelé caséine ne sont pas constantes.

*Laboratoire de Chimie organique, Université, Genève.*

### LA DÉSACIDIFICATION DU LAIT ET DE LA CRÈME PAR VOIE ÉLECTRIQUE (1)

L'APPAREIL ÉLECTRIQUE « ELACT » DE DÉSACIDIFICATION :  
GESELLSCHAFT FÜR ELEKTRISCHE APPARATE G. m. b. H., VIENNE.

par le Dr OTTO GRATZ

La recherche des divers moyens d'amélioration des qualités du lait et de la crème, que ces produits soient destinés à la consommation humaine ou qu'ils soient réservés à la fabrication du beurre et

(1) La traduction de cet article est due à l'obligeance de M. G. GENIN — (R.).