



HAL
open science

Analyse quantitative des caséines dans le lait de vache par chromatographie liquide rapide d'échange d'ions (FPLC)

Hervé Guillou, G. Miranda, J.-P. Pelissier

► **To cite this version:**

Hervé Guillou, G. Miranda, J.-P. Pelissier. Analyse quantitative des caséines dans le lait de vache par chromatographie liquide rapide d'échange d'ions (FPLC). *Le Lait*, 1987, 67 (2), pp.135-148. hal-00929097

HAL Id: hal-00929097

<https://hal.science/hal-00929097>

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.

Analyse quantitative des caséines dans le lait de vache par chromatographie liquide rapide d'échange d'ions (FPLC)

H. GUILLOU, G. MIRANDA et J.-P. PELISSIER *

I.N.R.A., Laboratoire de Biochimie et Technologie laitières, 78350 Jouy-en-Josas, France

Résumé

Nous nous sommes intéressés à la quantification des caséines bovines par chromatographie liquide rapide d'échange d'ions sur colonne Mono Q (Pharmacia). La séparation des caséines, à partir de la caséine entière, est réalisée à l'aide d'un tampon Tris $5 \cdot 10^{-3}$ M ; Urée 4,5 M, pH 8,0, en présence de dithiothréitol ($6.4 \cdot 10^{-5}$ M), par un gradient linéaire en chlorure de sodium. La durée du gradient et le débit peuvent être choisis de façon à obtenir une analyse rapide des 4 caséines (α_{S1} , α_{S2} , β , κ) ou la caractérisation d'un maximum de formes de caséine. Cependant, la séparation des caséines α_{S1} et α_{S2} est incomplète.

Dans ces conditions, la méthode s'est révélée être linéaire, répétable et reproductible. De plus, nous avons séparé, à partir du lait écrémé, les caséines d'avec les protéines du lactosérum. Cela permet une quantification directe des caséines dans le lait et évite une perte de caséine entière lors de sa préparation par précipitation isoélectrique. Les études réalisées sur les variants génétiques des caséines, ont montré que cette méthode permet de séparer certains d'entre eux.

Mots clés : Caséines - Lait - Vache - Chromatographie - Dosage.

Summary

Quantitative analysis of caseins in cow milk by FPLC

The quantification of bovine caseins by Fast Protein Liquid Chromatography on a Pharmacia Mono Q column has been investigated. The separation of caseins from whole casein, was achieved by using a $5 \cdot 10^{-3}$ M Tris ; 4.5 M Urea buffer pH 8.0 in presence of dithiothreitol ($6.4 \cdot 10^{-5}$ M), and a linear gradient of sodium chloride. The gradient length and flow rate may be chosen so as to have a rapid analysis of the 4 caseins (α_{S1} , α_{S2} , β , κ) or the characterization of a maximum of the different forms of caseins. However, the separation of α_{S1} from α_{S2} casein is incomplete.

* A qui la correspondance doit être adressée.

In our conditions, the method has revealed to be linear, repeatable and reproducible. In addition, direct chromatography of skim milk allowed separation of caseins from whey proteins. This makes possible a direct quantification of caseins in milk and prevents a loss of whole casein during its preparation by isoelectric precipitation. Studies on genetic variants of caseins showed that this method allows to separate some of them.

Key words : Caseins - Milk - Cow - Chromatography - Quantitative determination.

Introduction

La séparation de la caséine entière en plusieurs composants est ancienne. En 1846, SCHLOSSBERGER sépare la caséine en 2 fractions. En 1939, l'apparition de la technique électrophorétique a permis à MELLANDER de caractériser 3 constituants : α , β , γ . Les travaux de WAUGH et VON HIPPEL (1956) montrèrent que la fraction α pouvait être séparée en caséine κ et fraction α_s . Par électrophorèse en gel d'amidon en présence d'urée, WAKE et BALDWIN (1961) ont trouvé plus de 20 composants dans la caséine entière. La chromatographie d'échange d'ions sur DEAE cellulose donne une séparation des différentes caséines à l'état pur (THOMPSON, 1966 ; MERCIER *et al.*, 1968). La détermination des structures primaires des caséines (MERCIER *et al.*, 1971, 1973 ; RIBAUDEAU DUMAS *et al.*, 1972 ; BRIGNON *et al.*, 1977) a permis de montrer que la caséine entière regroupait 4 caséines différentes : les caséines α_{S1} , α_{S2} , β et κ . La caséine α_{S1} existe sous 2 formes, α_{S1} et α_{S0} , qui diffèrent par leur teneur en phosphore (MANSON *et al.*, 1977). La caséine α_{S2} présente 4 formes α_{S2} , α_{S4} , α_{S5} , α_{S6} , qui diffèrent également par leur teneur en phosphore (BRIGNON *et al.*, 1977). La caséine β bovine existe sous une forme moléculaire unique, bien qu'une très faible quantité de caséine β pourrait exister sous une forme déphosphorylée (DAVIES et LAW, 1977). La caséine κ a été séparée en 7 constituants (MERCIER *et al.*, 1968) ou 9 composants (TAKEUCHI *et al.*, 1985) de teneur en sucre différente et pouvant avoir des quantités de phosphore variables (VREEMAN *et al.*, 1977). A côté de ces composés, on trouve les fractions appelées caséine γ (γ_1 , γ_2 , γ_3), qui proviennent de la protéolyse limitée de la caséine β par la plasmine (KAMINOGAWA et YAMAUCHI, 1972).

La caséine entière apparaît donc comme un milieu complexe renfermant un nombre élevé de constituants différents. La quantification de ces composants nécessite de disposer d'une technique permettant de séparer et de doser, si possible simultanément, chacun d'eux. De nombreuses méthodes de dosage des protéines du lait existent (GUILLOU *et al.*, 1986). En particulier, l'électrophorèse sur gel a été souvent utilisée (HAENLEIN *et al.*, 1973 ; RANDOLPH *et al.*, 1974 ; MC LEAN *et al.*, 1984 ; NG-KWAI-HANG et KROEKER, 1984).

Le développement des techniques chromatographiques sous pression ouvre des perspectives nouvelles pour l'analyse de l'ensemble des constituants protéiques du lait. La séparation des protéines du lactosérum a été réalisée par chromatographie d'exclusion moléculaire sur colonne TSK (DIOSADY *et al.*, 1980 ; BICAN et BLANC, 1982 ; GUPTA, 1983) ou sur colonne de Superose 12 (ANDREWS *et al.*, 1985). La chromatographie en phase inverse (DIOSADY *et al.*, 1980 ; PEARCE, 1983) et la chromatographie d'échange d'ions (HUMPHREY et

NEWSOME, 1984) ont également été utilisées. Les caséines, pour leur part, ont été séparées par chromatographie sur colonne de phase inverse (DIOSADY *et al.*, 1980 ; PEARCE, 1983), par chromatographie d'échange d'ions sur colonne TSK greffée par des groupements DEAE (HUMPHREY et NEWSOME, 1984) ou sur colonnes Mono Q ou Mono S (HUMPHREY et NEWSOME, 1984 ; ANDREWS *et al.*, 1985 ; BARREFORS *et al.*, 1985 ; DALGLEISH, 1986).

Dans le travail présenté ici, nous avons utilisé la chromatographie d'échange d'ions sur colonne Mono Q pour doser quantitativement l'ensemble des fractions caséiques du lait.

I. Matériel et méthodes

A. Préparation des caséines

La caséine entière a été préparée par précipitation à pH 4,6 de lait écrémé d'une vache homozygote pour les 4 caséines (α_{S1} -B ; α_{S2} -A ; β -A1 ; κ -A) et conservée lyophilisée, après ajustement du pH à 7,0. Des caséines entières contenant différents variants génétiques ont été préparées. Les variants ont été identifiés par électrophorèse en gel d'amidon à pH 8,6 et pH 3,0 en présence d'urée et de 2-mercaptoéthanol suivant la technique d'ASCHAFENBURG et MICHALAK (1968).

Les principaux constituants de la caséine totale (α_{S1} , α_{S2} , β et κ_0) ont été préparés à partir de la caséine entière par chromatographie sur DEAE-cellulose selon la technique de MERCIER *et al.* (1968).

Les différentes protéines ont été caractérisées par électrophorèse en gel de polyacrylamide agarose suivant la technique d'URIEL (1966) modifiée par GRIPON *et al.* (1975). Leurs compositions en acides aminés ont été déterminées après hydrolyse acide (HCl 5,7N ; 110 °C ; 24 h ; sous vide) selon la technique de SPACKMAN *et al.* (1958) à l'aide d'un analyseur Biotronik LC 5000 (Munich, RFA).

B. Chromatographie FPLC

Le système chromatographique FPLC (Pharmacia, Uppsala, Suède) est composé d'un système de contrôle LCC-500, de 2 pompes P500, d'un détecteur UV muni d'un filtre pour la mesure à 280 nm et d'un passeur d'échantillon MV8. La colonne échangeuse d'anions Mono Q HR 5/5 (Pharmacia, Uppsala, Suède) était thermostatée à l'aide d'un bain-marie.

Les tampons étaient préparés avec de l'eau désionisée traitée sur un système de filtration Milli Q 23004 (Millipore, Bedford MA, USA). Les solutions d'urée étaient filtrées sur une résine mixte AG 501-X8D (Mixed Bed Resin, Bio Rad, Richmond CA, USA). Les tampons étaient dégazés sous courant d'hélium. L'urée provient de chez MERCK (Darmstadt, RFA), le Tris de chez TOUZARD et MATIGNON (Paris, France) et le dithiothréitol de chez SERVA (Heidelberg, RFA). Les autres produits viennent de chez PROLABO (Paris, France).

II. Résultats

A. Séparation de la caséine entière

MERCIER *et al.* (1968), pour la préparation des différentes caséines sur DEAE cellulose ont utilisé un tampon imidazole 0,02 M, urée 3,3 M, 2-mercaptoéthanol 0,04 M, pH 7,0. L'élution était obtenue par un gradient linéaire de 0 à 0,32 M en NaCl.

L'utilisation d'un tel tampon, pour la quantification des caséines sur colonne Mono Q, entraîne, au cours du temps, une dérive de la ligne de base par oxydation du 2-mercaptoéthanol. Nous avons donc remplacé le 2-mercaptoéthanol par du dithiothréitol. Une concentration de $6.4 \cdot 10^{-5}$ M dans le tampon et de 8.10^{-4} M dans l'échantillon permet d'obtenir une séparation semblable à celle obtenue avec le 2-mercaptoéthanol tout en éliminant la dérive de la ligne de base qui pouvait perturber la quantification des pics.

Une concentration en urée de 3,3 M ne permet pas, sur colonne Mono Q, d'obtenir une dissociation complète et reproductible des caséines : en particulier, la surface du pic de caséine β varie d'une analyse à l'autre. Nous avons donc utilisé une concentration en urée de 4,5 M, qui correspond à celle utilisée en électrophorèse, et qui permet d'obtenir des analyses reproductibles. Cependant, pour éviter les risques de carbamylation des caséines, par réaction des ions cyanates contaminant l'urée sur les fonctions amine et thiol (STARK *et al.*, 1960), nous avons, en plus de la filtration sur une résine mixte Biorad de la solution d'urée afin d'éliminer les ions cyanates, remplacé le tampon imidazole par un tampon Tris-HCl $5 \cdot 10^{-3}$ M, pH 7,0. Ce tampon, par sa fonction amine, est capable de réagir avec les ions cyanates diminuant ainsi les risques d'interaction avec les caséines. Ceci permet d'éviter l'apparition, au cours du temps, de pics parasites supplémentaires qui étaient observés avec le tampon imidazole.

La profil chromatographique ainsi obtenu permet une séparation des caséines en, environ, 30 mn. Cependant, la résolution des caséines α_{S1} et α_{S2} n'est pas satisfaisante pour une quantification de ces produits. En modifiant le pH, la température ou le débit, il est possible d'améliorer cette séparation.

Nous avons étudié l'effet du pH dans une gamme allant de pH 7,0 à 8,6. Dans la zone de pH situé entre pH 7,5 et 8,3, on peut mettre en évidence une meilleure résolution des caséines κ et l'apparition de 3 pics (PI) élués juste avant la caséine β . Pour la suite des expérimentations, nous avons utilisé un pH de 8,0.

La température permet également de modifier la séparation des caséines. De plus, l'augmentation de la température entraîne une diminution de la pression sur la colonne et donc une meilleure conservation de la phase. La régulation de la température à une valeur fixe permet également une meilleure reproductibilité de la séparation. On observe une augmentation du temps de rétention des différentes caséines avec l'élévation de la température. A 20 °C, les caséines α_{S1} et α_{S2} ne sont pas séparées. A l'inverse, à 50 °C, ce sont les caséines α_{S0} et α_{S1} qui ne sont pas séparées. Nous nous sommes donc placés à une température de 40 °C qui correspond, globalement, à une séparation optimale de l'ensemble des caséines.

La diminution du débit améliore la résolution des caséines. Ainsi, avec un débit de 0,5 ml/mn, il est possible de séparer 2 constituants dans la caséine α_{s2} . Cependant, cette modification se traduit par un doublement du temps d'analyse par rapport au débit de 1 ml/mn. En fonction du but poursuivi, analyse rapide des 4 caséines ou caractérisation d'un maximum de formes de

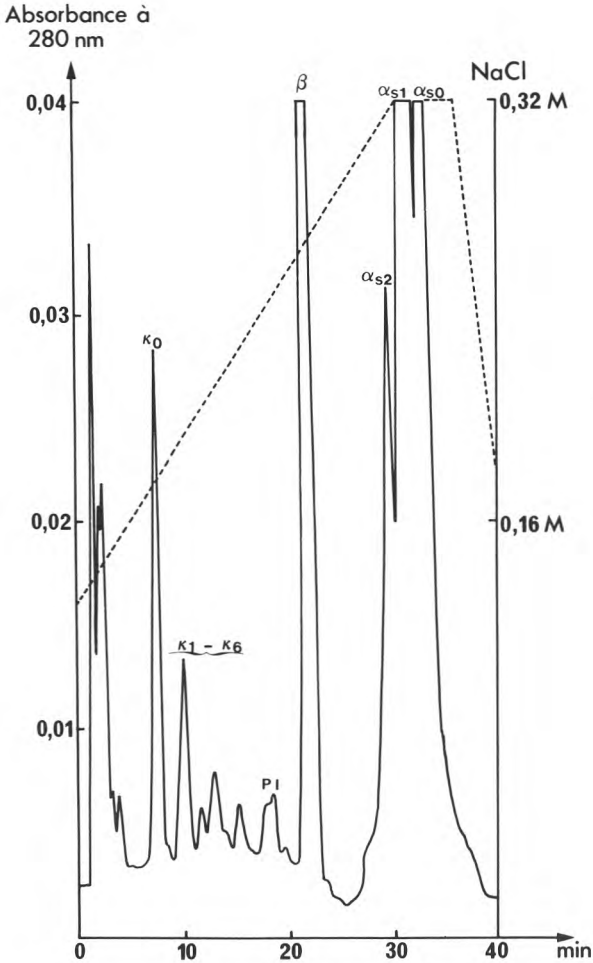


Fig. 1

Séparation par FPLC sur colonne Mono Q de la caséine entière bovine. Débit 1 ml/mn ; température 40 °C. Tampon Tris-HCl $5 \cdot 10^{-3}$ M ; urée 4,5 M ; dithiothréitol $6,4 \cdot 10^{-5}$ M ; pH 8,0. Elution par un gradient de NaCl de 0,12 à 0,32 M. Echantillon dans le tampon avec dithiothréitol $8 \cdot 10^{-4}$ M.

FPLC separation of whole casein on the Mono Q column. The sample dissolved in a $5 \cdot 10^{-3}$ M Tris-HCl ; 4,5 M urea buffer pH 8,0 + dithiothreitol ($8 \cdot 10^{-4}$ M) was applied on the column and eluted at a flow rate of 1 ml/min using a 0.12-0.32 M NaCl gradient. Temperature : 40 °C.

caséines, il pourra être utile de choisir un débit ou un autre. Dans le cas de l'analyse de la caséine entière, obtenue par précipitation à pH 4,6, il est possible de diminuer le temps d'analyse en augmentant la concentration en chlorure de sodium du tampon de départ jusqu'à une concentration de 0,12 M. Le profil chromatographique ainsi obtenu est présenté dans la figure 1. L'identification des différents pics a été effectuée par électrophorèse en gel de polyacrylamide agarose (fig. 2) et par analyse des compositions en acides aminés. De plus, la chromatographie des principaux constituants, caséine α_{S1} , α_{S2} , β et κ_0 (fraction non glycosylée de la caséine κ) à l'état pur ont permis de confirmer ces identifications. La série de pics mineurs (PI), qui est éluée juste avant la caséine β , a une mobilité électrophorétique voisine de la caséine β mais une composition en acides aminés qui ne correspond à aucune des caséines. Il s'agit probablement d'un mélange de caséine κ et de caséine β légèrement modifiées comme cela a déjà été observé par DAVIES et LAW (1977).

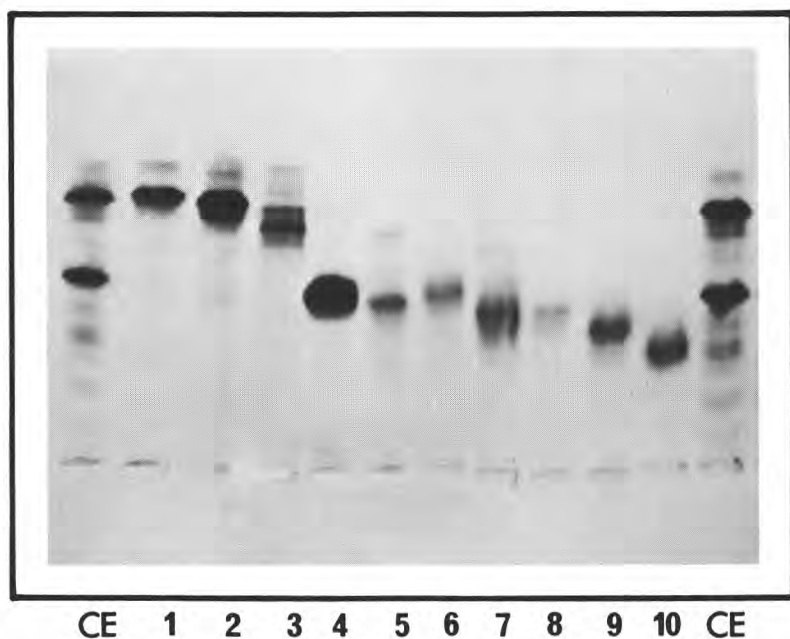


Fig. 2

Electrophorèse en gel mixte d'acrylamide-agarose de la caséine entière (CE) et des fractions caséiques préparées par chromatographie sur colonne Mono Q.

1 : α_{S0} ; 2 : α_{S1} ; 3 : α_{S2} ; 4 : β ; 5 : PI ; 6 : κ_6 ; 7 : $\kappa_{4,5}$; 8 : κ_3 ; 9 : κ_2 ; 10 : κ_0 .

Polyacrylamide gel electrophoresis of whole casein (CE) and of the different casein fractions separated on the Mono Q Column.

1 : α_{S0} ; 2 : α_{S1} ; 3 : α_{S2} ; 4 : β ; 5 : PI ; 6 : κ_6 ; 7 : $\kappa_{4,5}$; 8 : κ_3 ; 9 : κ_2 ; 10 : κ_0 .

B. Quantification de la caséine entière

La fidélité d'une méthode de dosage est définie par 2 critères (GRAPPIN, 1976), la répétabilité qui a été testée en comparant les résultats obtenus par une série d'injections successives du même échantillon, et la reproductibilité qui a été déterminée sur des séries d'expériences. En plus de ces critères, nous avons testé la linéarité de la méthode en utilisant des quantités variables de caséine totale. La figure 3, pour les pics majeurs, et le tableau 1 montrent que

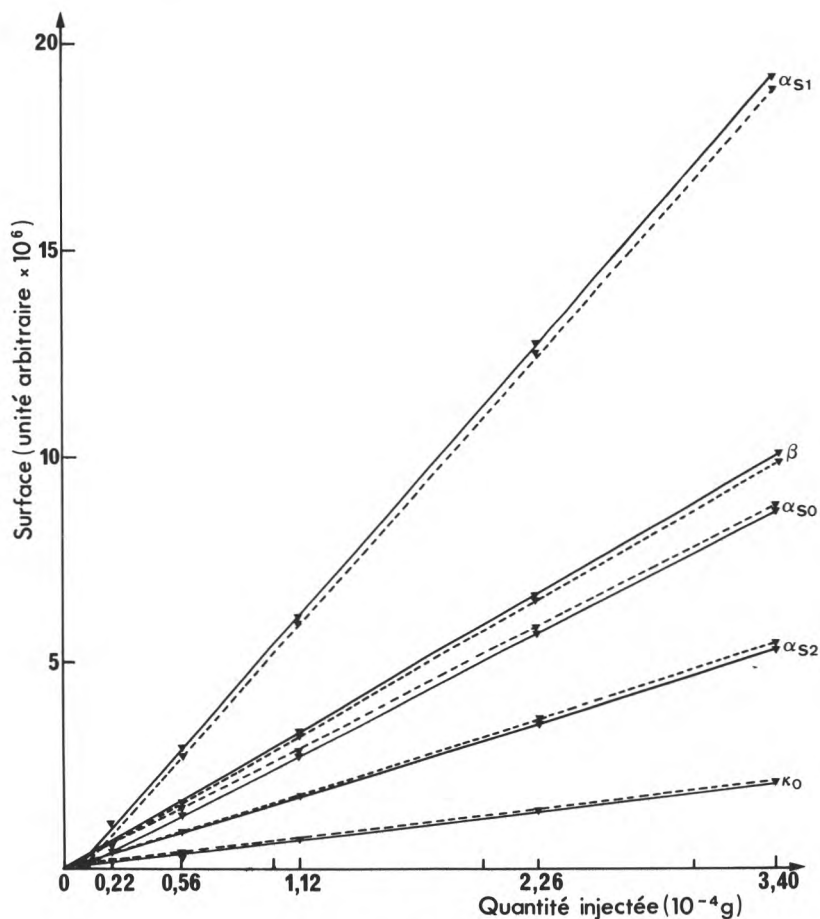


Fig. 3

Linéarité du dosage des principales fractions de la caséine entière en fonction de la quantité de caséine totale injectée.

Variation of caseins peaks area with the amount of whole casein injected.

— 1^{re} série de dosage.
first determination.

- - - 2^e série de dosage.
second determination.

les résultats obtenus sont satisfaisants. Les différences indiquées dans le tableau 1, pour le nombre de données ayant servi à calculer le coefficient de régression, s'expliquent par la limite de détection pour les quantités faibles, qui est différente d'un produit à l'autre. La figure 4 indique, par rapport à la quantité de caséine totale injectée, les quantités minimales détectables observées pour les différents constituants de la caséine entière.

TABLEAU I

Coefficients de corrélation. Linéarité du dosage des différentes fractions de la caséine totale entre la surface de chaque pic et la quantité de caséine totale chromatographiée
Correlation coefficients. Linearity of the method for the different casein fractions between the surface of each peak and the quantity of eluted whole casein

Caséine	Nombre de données	Coefficient de corrélation
α_{S0}	36	0,998
α_{S1}	36	0,998
α_{S2}	30	0,997
β	36	0,998
PI	18	0,941
κ_6	18	0,978
κ_5	18	0,985
κ_4	24	0,992
κ_3	18	0,989
κ_2	36	0,997
κ_0	36	0,998

La quantification des différentes caséines ne peut être effectuée directement à partir de la surface de chacun des pics du fait des différences d'absorption à 280 nm de ces protéines. Afin de pouvoir estimer la proportion des différents constituants de la caséine entière, nous avons déterminé les coefficients d'absorption des caséines dans le tampon utilisé. Les valeurs obtenues sont très voisines de celles déterminées, dans l'eau, par SWAISGOOD (1982). Le tableau 2 indique les coefficients d'absorption et les facteurs correctifs à utiliser, obtenus en prenant la caséine α_{S1} comme référence à une valeur de 1, pour estimer la proportion des différentes caséines.

C. Analyse directe du lait écrémé

L'analyse quantitative des différentes caséines nécessite la précipitation préalable du lait à pH 4,6. Les diverses techniques électrophorétiques ou chromatographiques quantitatives actuellement utilisées procèdent de cette manière. Cependant, lors de la précipitation au point isoélectrique, une très

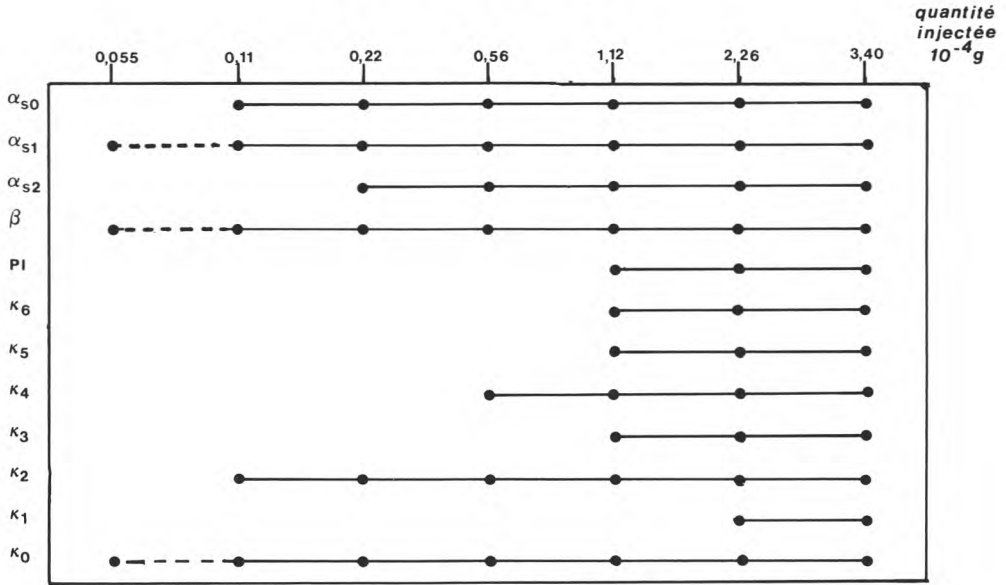


Fig. 4

Zone de détection des différents constituants de la caséine entière en fonction de la quantité totale de caséine entière chromatographiée sur colonne Mono Q.

Detection range of different casein fractions as a function of the total casein quantity separated on the Mono Q column.

Zone dans laquelle le dosage reste linéaire.
Linear range.

Zone de détection non linéaire.
Non linear range.

TABLEAU II

Absorption relative des différentes caséines. Valeurs des coefficients d'absorptions dans le tampon utilisé en chromatographie.

Coefficients correctifs à utiliser pour déterminer la teneur relative des différentes caséines

Relative absorbance of different caseins. Absorbance coefficients in the buffer.

Corrective coefficients to use in order to determine the relative amount of different caseins

caséine	coefficient d'absorption (cm ² /g)		Coefficient correctif d'après le coefficient d'absorption
	Dans le tampon	Dans l'eau d'après Swaisgood (1982)	
	α_{s1}	0,94	1,05
α_{s2}	0,92	1,10	1,02
β	0,44	0,46	2,14
κ	0,94	0,95	1,00

faible partie de la caséine reste en solution. Les résultats ainsi obtenus correspondent donc non pas à l'analyse de la totalité de la caséine, mais à la fraction insoluble à pH 4,6. Une analyse complète de la caséine nécessite donc d'éliminer cette étape de préparation de la caséine totale pour analyser directement le lait.

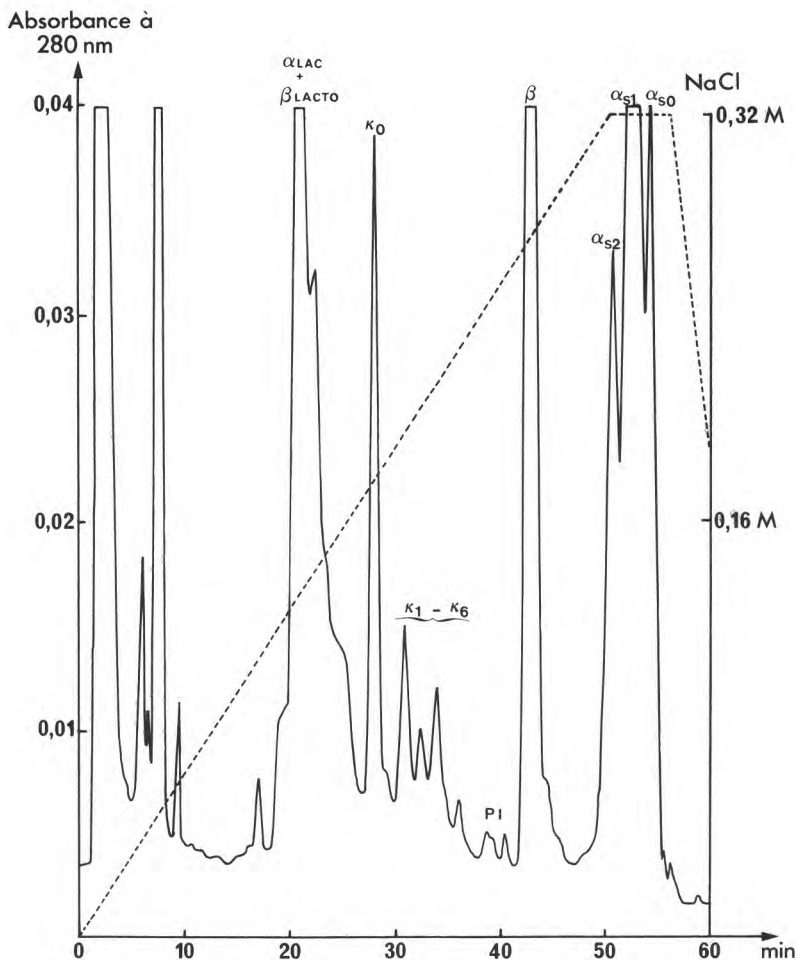


Fig. 5

Séparation par FPLC sur colonne Mono Q du lait écrémé. Débit 1 ml/mn ; température 40 °C ; Tampon Tris-HCl $5 \cdot 10^{-3}$ M ; urée 4,5 M ; dithiothréitol $6,4 \cdot 10^{-5}$ M ; pH 8.0. Elution par un gradient de NaCl de 0 à 0,32 M. Echantillon : lait écrémé dilué au 1/10 dans le tampon ; dithiothréitol $3,5 \cdot 10^{-2}$ M.

FPLC separation of skimmed milk on the Mono Q column. The sample dissolved in a $5 \cdot 10^{-3}$ M Tris-HCl ; 4.5 M urea buffer pH 8.0 + dithiothreitol ($3.5 \cdot 10^{-2}$ M) was applied on the column and eluted at a flow rate of 1 ml/min using a 0-0.32 M NaCl gradient. Temperature : 40 °C.

L'analyse directe du lait, dans nos conditions de chromatographie sur Mono Q, peut être obtenue en diluant un volume de lait dans 9 volumes du tampon de chromatographie dépourvu de NaCl. En utilisant un gradient allant de 0 à 0,32 M de NaCl en 50 min, avec un débit de 1 ml/mn, les protéines du lactosérum sont éluées avant la caséine κ_0 à condition d'augmenter la concentration en dithiothréitol de l'échantillon jusqu'à $3,5 \cdot 10^{-2}$ M (fig. 5). Il est à noter que les protéines du lactosérum ne sont pas correctement séparées et ne peuvent donc être quantifiées directement par cette technique. Ce résultat confirme d'ailleurs celui de ANDREWS *et al.* (1985) qui indique que les protéines du lactosérum ne peuvent être séparées par chromatographie sur Mono Q en présence d'urée.

D. Variants génétiques

La séparation obtenue précédemment correspond au lait d'une vache homozygote pour les 4 caséines (α_{S1} -B ; α_{S2} -A ; β -A1 ; κ -A). Il existe cependant un certain nombre d'autres variants génétiques dont les mutations portent sur des acides aminés chargés. L'analyse de tels laits risque d'entraîner des modifications dans le profil chromatographique obtenu.

Afin d'étudier le comportement chromatographique des variants génétiques des caséines, nous avons analysé des caséines totales renfermant les variants les plus fréquents : pour la caséine α_{S1} , les variants B et C ; pour la caséine β , les variants A1, A2, B et C ; pour la caséine κ , les variants A et B. Pour confirmer les résultats, des caséines provenant de vaches hétérozygotes ont été également analysées.

Dans les conditions utilisées, ou en modifiant les conditions de séparation par diminution de la pente du gradient, il n'a pas été possible de séparer correctement les divers variants de la caséine α_{S1} . Avec la caséine β , les caséines dont les mutations correspondent à une modification d'une seule charge ne peuvent être séparées. Par contre, le variant β -C, qui correspond à la modification d'un résidu d'acide glutamique et à la disparition d'un groupement phosphate (GROSCLAUDE *et al.*, 1972a), peut être séparé des autres variants de caséine β (A1, A2, B). En particulier, les laits contenant à la fois le variant β -C et l'un des autres variants présentent un double pic au niveau de la caséine β (fig. 6).

Les variants A et B de la caséine κ diffèrent par des mutations portant sur 2 acides aminés, dont un seul possède une charge (GROSCLAUDE *et al.*, 1972b). Contrairement à ce que nous avons obtenu, avec les caséines α_{S1} et β dont les mutations ne mettent en cause qu'une seule charge, les 2 variants sont très bien séparés (fig. 6). Ceci met en évidence le fait que, sur colonne Mono Q, un certain nombre de paramètres physico-chimiques des molécules, autre que la charge, influent également sur la séparation des produits.

L'analyse de laits contenant les différents variants génétiques montre que la caséine κ_0 -B est éluée en même temps que les protéines du lactosérum. La proportion des différentes caséines des laits contenant le variant κ -B ne peut donc être déterminée par analyse directe du lait. Il est nécessaire, pour ces échantillons, d'effectuer l'analyse sur la caséine entière. L'étude d'une série de caséines entières, préparée à partir de laits individuels du troupeau (race

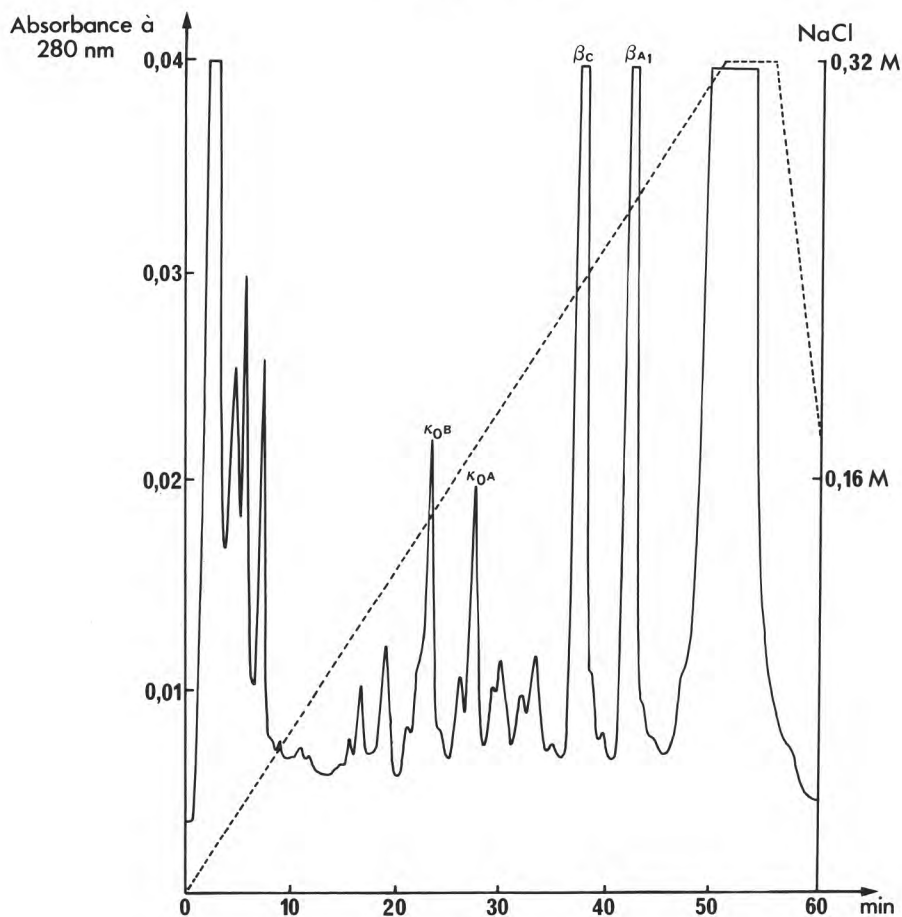


Fig. 6

Séparation par FPLC sur colonne Mono Q de la caséine entière d'une vache hétérozygote : κ -A- κ -B ; β -C- β -A1 ; α_{S2} -A ; α_{S1} -A. Conditions d'éluion : voir figure 1. Elution par un gradient de NaCl de 0 à 0,32 M.

FPLC separation of caseins genetic variants on the Mono Q column. The sample of whole casein (κ -A- κ -B ; β -C- β -A1 ; α_{S2} -A ; α_{S1} -A) dissolved in a $5 \cdot 10^{-3}$ M Tris-HCl ; 4.5 M urea buffer pH 8.0 + dithiothreitol ($8 \cdot 10^{-4}$ M) was applied on the column and eluted at a flow rate of 1 ml/min using a 0-0.32 M NaCl gradient. Temperature : 40 °C.

Holstein) du domaine I.N.R.A. du Haras du Pin, donne la proportion suivante pour les 4 caséines : α_{S1} : 43,9 % ; α_{S2} : 5,6 % ; β : 42 % ; κ : 8,5 %. La proportion de caséine α_{S2} obtenue est plus faible que celle observée dans la littérature. Cette sous estimation provient de la séparation insuffisante des caséines α_{S1} et α_{S2} .

Reçu le 3 juillet 1986.

Accepté pour publication le 7 novembre 1986.

Remerciements

Ce travail a été effectué dans le cadre d'un contrat entre l'I.N.R.A. et l'Association pour le développement de la recherche dans l'industrie laitière (Arlait), grâce à une aide financière de la direction des Industries Agro-Alimentaires du Ministère de l'Agriculture.

Références bibliographiques

- ANDREWS A.T., TAYLOR M.D., OWEN A.J., 1985. Rapid analysis of bovine milk proteins by fast protein liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 348, 177-185.
- ASCHAFFENBURG R., MICHALAK W., 1968. Simultaneous phenotyping procedure for milk proteins. Improved resolution of the β -lactoglobulins. *J. Dairy Sci.*, 15, 1849.
- BARREFORS P., EKSTRAND B., FAGERSTAM L., LARSSON-RAZNIKIEWICZ M., SCHAAR J., STEFFNER P., 1985. Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) of bovine caseins. *Milchwissenschaft*, 40, 257-260.
- BICAN P., BLANC B., 1982. Milk protein analysis. A high performance chromatography study. *Milchwissenschaft*, 37, 592-593.
- BRIGNON G., RIBADEAU DUMAS B., MERCIER J.C., PÉLISSIER J.P., DAS B.C., 1977. Complete amino acid sequence of bovine α_{S2} -casein. *FEBS Lett.*, 76, 274-279.
- DALGLEISH D.G., 1986. Analysis by fast protein liquid chromatography of variants of κ -casein and their relevance to micellar structure and renneting. *J. Dairy Res.*, 53, 43-51.
- DAVIES D.T., LAW A.J.R., 1977. An improved method for the quantitative fractionation of casein mixtures using ion exchange chromatography. *J. Dairy Res.*, 44, 213-221.
- DIOSADY L.L., BERGEN I., HARWALKAR V.R., 1980. High performance liquid chromatography of whey proteins. *Milchwissenschaft*, 35, 671-674.
- GRAPPIN R., 1976. Guide pour l'évaluation des méthodes d'analyse de routine. *Lait*, 56, 608-621.
- GRIPON J.C., DESMAZEAUD M.J., LE BARS D., BERGÈRE J.L., 1975. Etude du rôle des micro-organismes et des enzymes au cours de la maturation des fromages. II. Influence de la présure commerciale. *Lait*, 54, 502-516.
- GROSCLAUDE F., MAHÉ M.F., MERCIER J.C., RIBADEAU DUMAS B., 1972a. Caractérisation des variants génétiques des caséines α_{S1} et β bovines. *Eur. J. Biochem.*, 26, 328-337.
- GROSCLAUDE F., MAHÉ M.F., MERCIER J.C., RIBADEAU DUMAS B., 1972b. Localisation des substitutions d'acides aminés différenciant les variants A et B de la caséine κ bovine. *Ann. Génét. Sél. anim.*, 4, 515-521.
- GUILLOU H., PÉLISSIER J.P., GRAPPIN R., 1986. Méthodes de dosage des protéines du lait de vache. *Lait*, 66, 143-175.
- GUPTA B.B., 1983. Determination of native and denatured milk proteins by high performance size exclusion chromatography. *J. Chromatogr.*, 282, 463-475.
- HAELEIN G.F.W., SCHULTZ L.H., ZIKAKIS J.P., 1973. Composition of proteins in milk with varying leucocyte contents. *J. Dairy Sci.*, 56, 1017-1024.
- HUMPHREY R.S., NEWSOME L.J., 1984. High performance ion exchange chromatography of the major bovine milk proteins. *N.Z.J. Dairy Sci. Technol.*, 19, 197-204.
- KAMINOGAWA S., YAMAUCHI K., 1972. Decomposition of β -casein by milk protease. Similarity of the decomposed products to temperature sensitive and R-caseins. *Agric. Biol. Chem.*, 36, 255-260.
- MC LEAN D.M., GRAHAM E.R.B., PONZONI R.W., 1984. Effects of milk protein genetic variants on milk yield and composition. *J. Dairy Res.*, 51, 531-546.
- MANSON W., CAROLAN T., ANNAN W.D., 1977. Bovine α_{S0} -casein. A phosphorylated homologue of α_{S1} -casein. *Eur. J. Biochem.*, 78, 411-417.

- MELLANDER O., 1939. Elektrophoretische Untersuchung von Casein. *Biochem. Z.*, 300, 240-245.
- 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-mercaptoéthanol. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 50, 521-530.
- MERCIER J.C., GROSCLAUDE F., RIBADEAU DUMAS B., 1971. Structure primaire de la caséine α_{S1} bovine. Séquence complète. *Eur. J. Biochem.*, 23, 41-51.
- MERCIER J.C., BRIGNON G., RIBADEAU DUMAS B., 1973. Structure primaire de la caséine κ -B bovine. Séquence complète. *Eur. J. Biochem.*, 35, 222-235.
- NG-KWAI-HANG K.F., KROEKER E.M., 1984. Rapid separation and quantification of major caseins and whey proteins of bovine milk by polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Dairy Sci.*, 67, 3052-3056.
- PEARCE R.J., 1983. Analysis of whey proteins by high performance liquid chromatography. *Aust. J. Dairy Technol.*, 38, 114-117.
- RANDOLPH H.E., ERWIN R.E., RICHTER R.L., 1974. Influence of mastitis on properties of milk. VII. Distribution of milk proteins. *J. Dairy Sci.*, 57, 15-18.
- RIBADEAU DUMAS B., BRIGNON G., GROSCLAUDE F., MERCIER J.C., 1972. Structure primaire de la caséine β bovine. Séquence complète. *Eur. J. Biochem.*, 25, 505-514.
- SCHLOSSBERGER, 1846. Vorläufige Notiz über einige aus dem sogenannten Casein erhaltenen Substanzen. *Justus Liebigs Ann. Chem.*, 58, 92-95.
- SPACKMAN D.H., STEIN W.H., MOORE S., 1958. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Anal. Chem.*, 30, 1190-1206.
- STARK G.R., STEIN W.H., MOORE S., 1960. Reaction of the cyanates present in aqueous urea with amino acids and proteins. *J. Biol. Chem.*, 235, 3177-3181.
- SWAISGOOD H.E., 1982. Chemistry of milk protein. In : *Developments in Dairy Chemistry*. ed. Fox P.F., Applied Science Publishers. London. 1-59.
- TAKEUCHI M., TSUDA E., YOSHIKAWA M., SASAKI R., CHIBA H., 1985. Fractionation and characterization of 9 sub components of bovine κ -casein A. *Agric. Biol. Chem.*, 49, 2269-2276.
- THOMPSON M.P., 1966. DEAE Cellulose urea chromatography of casein in the presence of 2-mercaptoethanol. *J. Dairy Sci.*, 49, 792-795.
- URIEL J., 1966. Méthode d'électrophorèse dans les gels d'acrylamide agarose. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 48, 969-982.
- VREEMAN H.J., BOTH P., BRINKHUIS J.A., VAN DER SPECK C., 1977. Purification and some physico chemical properties of bovine κ -casein. *Biochim. Biophys. Acta*, 491, 93-103.
- WAKE R.G., BALDWIN R.L., 1961. Analysis of casein fractions by zone electrophoresis in concentrated urea. *Biochim. Biophys. Acta*, 47, 225-239.
- WAUGH R.G., VON HIPPEL P.H., 1956. κ -casein and the stabilization of casein micelles. *J. Am. Chem. Soc.*, 78, 4576-4582.