



HAL
open science

Etude des facteurs d'extraction de la caséine β

Marie-Hélène Famelart, C. Hardy, G. Brulé

► **To cite this version:**

Marie-Hélène Famelart, C. Hardy, G. Brulé. Etude des facteurs d'extraction de la caséine β . Le Lait, 1989, 69 (1), pp.47-57. hal-00929148

HAL Id: hal-00929148

<https://hal.science/hal-00929148>

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.

Article de recherche

Etude des facteurs d'extraction de la caséine β

M.H. Famelart, C. Hardy et G. Brulé

INRA, Laboratoire de recherches de technologie laitière, 65, rue de Saint-Brieuc, 35042 Rennes, France

(reçu le 1-2-1988, accepté le 20-5-1988)

Résumé — Un plan d'expérience est mis en place afin d'optimiser la solubilisation à froid de la caséine β d'un caséinate de sodium dans la zone du pH_i . Les facteurs sont la concentration du caséinate de sodium (2, 13,5 et 25 $g \cdot l^{-1}$), le pH (4,2, 4,4 et 4,6) et la force ionique par addition de NaCl (0, 3 et 6 $g \cdot l^{-1}$). Les paramètres à optimiser sont le taux de caséine β solubilisée et son facteur de purification. Le facteur de purification est plus élevé à faible concentration de caséinate, tandis que le taux de caséine β solubilisée augmente avec la concentration de caséinate jusqu'à atteindre un plateau au-delà de 20 $g \cdot l^{-1}$. Le pH n'a que peu d'effet dans l'intervalle étudié, tandis que l'augmentation de la force ionique a un effet négatif marqué sur le taux de caséine β solubilisée.

caséine β — préparation — optimisation

Summary — **Optimisation of the preparation of β casein enriched solutions.** A factorial design has been used to optimise the solubilisation of β casein at low temperature from a sodium caseinate near the pH_i . The studied factors were sodium caseinate concentration (2, 13.5 and 25 $g \cdot l^{-1}$), pH (4.2, 4.4 and 4.6) and ionic strength by addition of NaCl (0, 3 and 6 $g \cdot l^{-1}$). The optimised parameters were the rate of solubilised β casein and the purification factor. The purification factor was higher at low caseinate concentration, while the rate of solubilised β casein increased with caseinate concentration up to 20 $g \cdot l^{-1}$ of caseinate and then became constant. The pH had no effect within the experimental values, while the ionic strength had a marked negative effect on the rate of solubilised β casein.

β -casein — preparation — optimization

Introduction

La caséine β , de par sa structure moléculaire et ses caractéristiques amphiphiles, possède des propriétés de surface intéressantes, propriétés de formation de films, étudiées par Graham et Phillips (1980), et propriétés moussantes étudiées par Kinsella (1981). Par ailleurs,

des études récentes ont montré que cette protéine contient dans sa séquence primaire des peptides possédant des propriétés physiologiques remarquables : un peptide identifié comme la séquence 60-66 (Brandl *et al.*, 1979; Henschen *et al.*, 1979) et ses peptides dérivés (Chang *et al.*, 1981) possèdent une activité opioïde et peuvent intervenir au niveau cardiovasculaire (Wei et Chang, 1980); la

séquence 177-183 présente une activité antihypertensive (Maruyama *et al.*, 1985, 1987); le phosphopeptide situé en position N terminale isolé par Manson et Annan (1971) possède des propriétés de chélation des cations divalents, et peut jouer un rôle essentiel dans l'absorption intestinale de ces éléments minéraux (Maubois et Brulé, 1982). Lee *et al.* (1987a et b) ont récemment mis en évidence les propriétés émulsifiantes de peptides de caséine β seuls, ainsi qu'en mélange avec des peptides d'autres caséines.

L'étude des propriétés physiologiques de la caséine β et de ses produits d'hydrolyse requiert la mise au point de méthodes d'extraction et de purification de cette protéine. Hipp *et al.* (1952), Aschaffenburg (1963), et plus récemment Fox et Guiney (1972) ont utilisé les propriétés de solubilité différentielle de cette caséine en solution d'urée, tandis que Mercier *et al.* (1968), Davies et Law (1977) et Wei et Whitney (1985) l'ont séparée par chromatographie d'échange d'ions.

L'effet du refroidissement du lait a été étudié par nombre d'auteurs (Rose, 1968; Downey et Murphy, 1970; Creamer *et al.*, 1977; Ali *et al.*, 1980; Pierre et Brule, 1981; Davies et Law, 1983). Un stockage à 4°C du lait entraîne la solubilisation d'une partie des caséines. De 30 à 60% de la caséine β peuvent ainsi être déplacés de la micelle vers la phase soluble, ce qui représente plus de 60% des caséines solubilisées. Le mécanisme de cette solubilisation fait intervenir d'une part l'affaiblissement à froid des interactions hydrophobes qui lient cette caséine aux micelles, et d'autre part la réduction du contenu minéral micellaire.

L'objet de cette étude était l'optimisation de la méthode proposée par Manson et Annan (1971) reposant sur la solubili-

sation à froid de la caséine β à son pH_i . Ces auteurs parviennent ainsi à extraire environ 0,3 g.l⁻¹ de caséine β d'un caséinate à 2 g.l⁻¹, mais la méthode ne semble pas avoir été optimisée. Outre la zone de pH voisine du pH_i , il nous a semblé primordial d'étudier l'influence de la force ionique par ajout de NaCl en raison de son action sur l'ionisation des protéines, ainsi que l'effet de la concentration en caséinate qui pouvait limiter la quantité totale de caséine solubilisable. Les paramètres optimisés dans notre étude sont d'une part la concentration de la caséine β , et d'autre part sa pureté.

Matériel et Méthodes

Essais

Le caséinate de sodium (Armor Protéines, France), à une concentration de 2, 13,5 ou 25 g.l⁻¹, additionné de 0, 3 ou 6 g.l⁻¹ de NaCl était solubilisé dans 1 l d'eau distillée à l'aide d'un mixer Heidorff (500 tr.min⁻¹, puis conservé à 4°C pendant 17 h. Cette solution était acidifiée à 4°C avec HCl 1N jusqu'à environ pH 5, puis avec HCl 0,1 N jusqu'à obtention du pH désirée (4,2, 4,4 ou 4,6). Le précipité était alors décanté sans agitation au froid et des prélèvements effectués à 4°C dans le surnageant à 30 min, 5 h et 24 h étaient filtrés sur papier Whatman 41. Le pH des échantillons était amené à 9 avec NaOH 0,1N (dilution négligeable) avant congélation.

Analyses

Les analyses des échantillons rapidement décongelés comprenaient une mesure de densité optique (DO) à 280 nm (spectrophotomètre Carl Zeiss, Allemagne), une chromatographie FPLC selon la méthode de Andrews *et al.* (1985) sur un système Pharmacia (Suède - LCC-500, pompe P500, détecteur UV 280, colonne monoQ HR 5/5), ainsi qu'une électrophorèse en gels de polyacrylamide (PAGE) selon Andrews (1983) suivie d'une lecture avec intégration sur un densitomètre Vernon (France) (analyse en transparence, avec un filtre orange, des bandes colorées au bleu de Coomassie G250). Des électrophorèses en gel

d'acrylamide plus concentré et SDS (SDS-PAGE) étaient réalisées afin de déterminer le poids moléculaire des peptides apparus dans les surnageants : le gel de migration (T=17%, C=2,5%) en urée 5M, tampon TRIS-HCl 0,4M pH 8,8, et SDS 0,1% était coulé sous un gel de séparation (T=4,2%, C=2,5%) en urée 4,5M, tampon TRIS-HCl 0,06M pH 6,8 et SDS 0,1%. Les échantillons étaient dilués au demi en tampon à pH 6,8, urée 9M, SDS 4%, TRIS 0,05M et mercaptoéthanol. La migration se faisait en tampon glycine, TRIS et SDS à pH 8,3. Les colorations étaient effectuées selon Andrews (1983).

Les paramètres retenus étaient le taux de caséine β solubilisée et son facteur de purification obtenus par électrophorèse PAGE (respectivement taux 1 et pur 1), ainsi que le taux de caséine β solubilisée et son facteur de purification obtenus par chromatographie (respectivement taux 2 et pur 2), calculés comme indiqué dans le Tableau I.

Méthode statistique

Un plan composite, dont la matrice expérimentale est présentée dans le Tableau II, était réali-

sé afin de déterminer le modèle polynomial quadratique pour chacun des paramètres taux 1, taux 2, pur 1 et pur 2. Les coefficients de la régression linéaire ont été estimés, et la nullité de ces coefficients testée par un test *t* de Student, à l'aide d'un logiciel de régression linéaire multiple.

Résultats

Cinétique

La solubilisation des caséines, appréciée par la mesure de la DO à 280 nm, est pratiquement instantanée : la quantité présente dans le surnageant à 30 min est égale à celle présente à 24 h de décantation, et cela quelle que soit la concentration en caséinate. La concentration de caséine β ne peut être calculée à partir des valeurs de DO, car d'après les résultats de l'électrophorèse PAGE et de la chromatographie, la caséine solubilisée

Tableau I. Taux de caséine β et son facteur de purification obtenus par électrophorèse PAGE et taux de caséine β solubilisée et son facteur de purification, obtenus par chromatographie.

| Méthode | Paramètre | Calcul |
|---------------------|--------------------------------|---|
| Electrophorèse PAGE | Taux 1 (g.l ⁻¹) | $\frac{\text{Aire cas } \beta \text{ échantillon}}{\text{Aire cas } \beta \text{ étalon}} \times \text{conc étalon (g.l}^{-1}\text{)}$ |
| | Pur 1 | $\frac{\text{Aire cas } \beta \text{ échantillon}}{\text{Aire totale échantillon}} \bigg/ \frac{\text{Aire cas } \beta \text{ caséinate (*)}}{\text{Aire totale caséinate (**)}}$ |
| Chromatographie | Taux 2 (g.l ⁻¹) | $\frac{\text{Aire cas } \beta \text{ échantillon}}{\text{Aire cas } \beta \text{ étalon}} \times \text{conc étalon (g.l}^{-1}\text{)}$ |
| | Pur 2 | $\frac{\text{Aire cas } \beta \text{ échantillon}}{\text{Aire totale échantillon}} \bigg/ \frac{\text{Aire cas } \beta \text{ caséinate (*)}}{\text{Aire totale caséinate (**)}}$ |

(*) solution de caséinate de sodium à 1 g.l⁻¹; (**) la valeur du dénominateur de pur 1 et pur 2 vaut respectivement 0,3027 et 0,1660.

Tableau II. Matrice expérimentale.

| Niveaux utilisés dans l'analyse | Symboles | -1 | 0 | +1 |
|---|----------|---------------------|------------------------|----------------------|
| Concentration initiale en caséinate de sodium | C | 2 g.l ⁻¹ | 13,5 g.l ⁻¹ | 25 g.l ⁻¹ |
| pH | P | 4,2 | 4,4 | 4,6 |
| Concentration en NaCl | N | 0 g.l ⁻¹ | 3 g.l ⁻¹ | 6 g.l ⁻¹ |

| N° expérience | Niveaux des facteurs | | |
|---------------|----------------------|----|----|
| | C | P | N |
| 1 | -1 | -1 | -1 |
| 2 | -1 | -1 | +1 |
| 3 | +1 | -1 | -1 |
| 4 | +1 | -1 | +1 |
| 5 | -1 | +1 | -1 |
| 6 | -1 | +1 | +1 |
| 7 | +1 | +1 | -1 |
| 8 | +1 | +1 | +1 |
| 9 | 0 | 0 | -1 |
| 10 | +1 | 0 | 0 |
| 11 | 0 | 0 | +1 |
| 12 | -1 | 0 | 0 |
| 13 | 0 | 0 | 0 |
| 14 | 0 | 0 | 0 |
| 15 | 0 | +1 | 0 |
| 16 | 0 | -1 | 0 |

n'est pas constituée uniquement de caséine β .

Taux de caséine β solubilisée

Les taux de caséine β solubilisée variaient de 0,08 à 0,47 g.l⁻¹, et de 0,08 à 0,93 g.l⁻¹ respectivement pour les méthodes électrophorétiques et chromatographiques. Les taux observés par la méthode chromatographique étaient de 40% supérieurs, en moyenne, aux taux obtenus par électrophorèse.

Les données fournies par la méthode électrophorétique étaient beaucoup mieux

expliquées que les données fournies par la méthode chromatographique : 70 et 55% de la somme des carrés des écarts étaient expliqués respectivement pour taux 1 et taux 2, tandis que 94 et 84% de la somme des carrés des écarts étaient expliqués respectivement pour pur 1 et pur 2. Par ailleurs, les facteurs retenus étant les mêmes pour taux 1 et taux 2, ainsi que pour pur 1 et pur 2, seuls les paramètres taux 1 et pur 1 seront analysés par la suite.

Le Tableau III fournit les seuls facteurs significatifs, ainsi que l'équation de régression de taux 1. Aucun effet du pH

n'est observé, tandis qu'un effet négatif de NaCl et un effet linéaire et quadratique de la concentration en caséinate ont été mis en évidence. Soixante-dix pour cent de la somme des carrés des écarts sont expliqués par ce modèle. Ces résultats sont schématisés dans la Figure 1.

Nous avons noté que lorsque la concentration en caséinate augmente, les grains de précipité sont de plus en plus gros, et le surnageant de plus en plus opaque. A concentration faible en NaCl, le précipité est granuleux, tandis qu'à concentration élevée en NaCl, il est plus volumineux, plus hydraté, semble-t-il.

Facteur de purification de la caséine β (Tableau IV)

La concentration en caséinate a un effet négatif sur le facteur de purification. Cet effet explique à lui seul près de 70% de la somme des carrés des écarts. D'autres effets s'ajoutent : un effet du pH, seul et en interaction avec la concentration en NaCl, ou avec la concentration du caséinate. Plus de 90% de la somme des carrés des écarts sont expliqués par ces différents effets.

La Figure 2 indique que le facteur de purification le plus élevé est obtenu pour 2 g.l⁻¹ de caséinate. Par ailleurs, lorsque le pH s'élève de 4,2 à 4,6, ce facteur augmente de 0,3 unités.

Nous avons identifié à partir des chromatographies et électrophorèses PAGE la présence de caséines K dans les surnageants, et cela surtout lors des acidifications à pH 4,2. Les électrophorèses SDS-PAGE ont fait apparaître des bandes correspondant à des masses moléculaires proches de 19 000 et 21 000 D, identifiées comme étant des caséines γ . En revanche, les caséines α_s sont totalement absentes de tous les surnageants, tel qu'on peut en juger à l'aide des techniques analytiques employées (Fig. 3).

Discussion

Ces résultats montrent que la propriété de solubilisation à froid de la caséine β à son pH isoélectrique permet de solubiliser entre environ 0,08 et 0,46 g.l⁻¹ de caséine β , tel qu'on peut l'estimer en électrophorèse. L'abaissement du pH entraîne par régression d'ionisation des groupes car-

Tableau III. Effets significatifs de taux 1.

| <i>Effet</i> | <i>F</i> | <i>Probabilité (%)</i> | <i>% SCE expliqué</i> |
|----------------|----------|------------------------|-----------------------|
| C | 13,83 | 0,30 | 34,1 |
| C ² | 4,25 | 5,94 | 25,7 |
| N | 10,42 | 10,42 | 10,4 |
| Régression | 9,5 | 0,18 | 70,3 |

Taux 1 = $0,397 + (0,083 \pm 0,022) \cdot C - (0,046 \pm 0,022) \cdot N - (0,1177 \pm 0,036) \cdot C^2$; $\sigma = 0,071$; $R^2 = 0,7037$; F = valeur du rapport de la variance de l'effet et de la variance résiduelle; Probabilité = probabilité de dépasser la valeur de F selon la distribution de Fisher; % SCE expliquée = pourcents de la somme des carrés des écarts expliqués par l'effet.

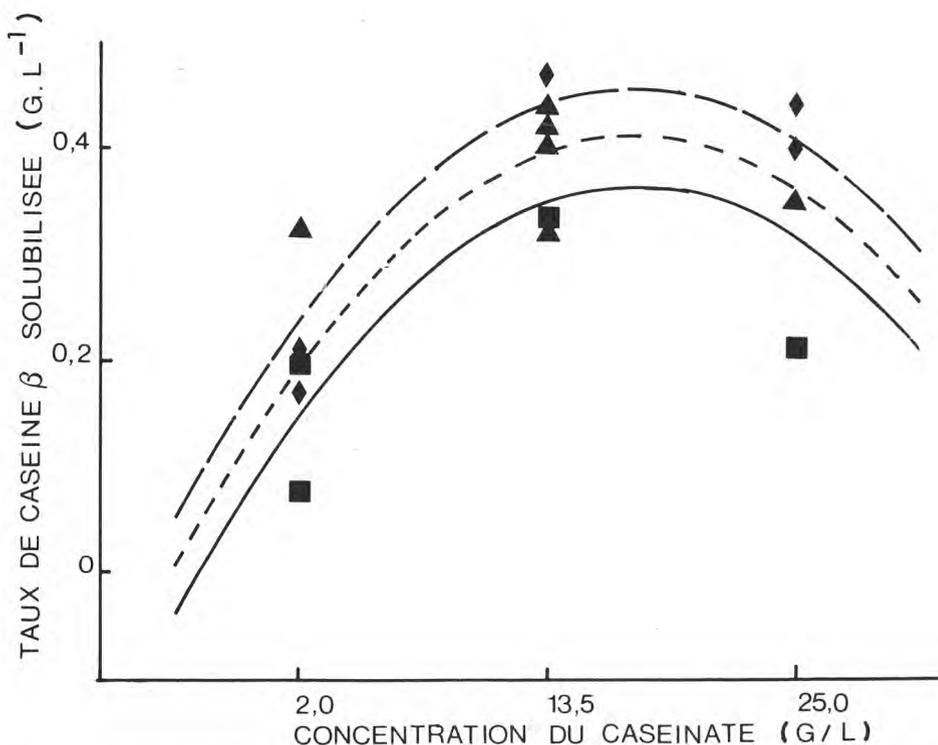


Fig. 1. Taux de caséine β solubilisée (taux 1 en g.l⁻¹) dans les surnageants en fonction de la concentration initiale en caséinate de sodium. Les points représentent indifféremment les valeurs expérimentales obtenues à tous les pH, et les traits la prédiction du modèle quel que soit le pH entre 4,2 et 4,6. Les valeurs observées maximales et minimales sont respectivement de 0,47 et 0,08 g.l⁻¹. ---◆--- NaCl 0 g.l⁻¹; ---▲--- NaCl 3 g.l⁻¹; —■— NaCl 6 g.l⁻¹.

boxyliques et sérylphosphoriques une diminution des répulsions électrostatiques des caséines "micellaires", et de leur hydratation, conduisant à leur insolubilisation. Il est alors tout à fait possible de mettre en œuvre une séparation physique (décantation, centrifugation ou filtration) des fractions solubles et précipitées.

La solubilisation de la caséine β est quasi immédiate puisque la quantité de caséine soluble n'évolue pas après 30 min, ce qui est en accord avec les observations de Creamer *et al.* (1977). Seule

une faible partie de la caséine β est déplacée vers la phase aqueuse, selon un équilibre qui dépend de la température et de l'environnement ionique (Rose, 1968).

Le taux de caséine β solubilisée augmente avec la concentration initiale de caséinate, jusqu'à atteindre un plateau au-delà de 20 g.l⁻¹. Pierre et Brulé (1981), dans des conditions différentes, avaient également observé une limite de solubilisation pour des concentrations supérieures à 100 g de protéine par kg de rétentat de lait, soit environ 75 g.l⁻¹ de

Tableau IV. Effets significatifs de pur 1.

| Effet | F (%) | Probabilité | % SCE expliqué |
|----------------|--------|-------------|----------------|
| C | 115,21 | 0 | 68 |
| C ² | 22,40 | 0,09 | 13,2 |
| PN | 11,68 | 0,65 | 6,9 |
| P | 6,20 | 3,09 | 3,6 |
| CP | 3,99 | 7,14 | 2,3 |
| Régression | 31,90 | 0 | 94,1 |

Pur 1 = $1,815 - (0,625 \pm 0,058) \cdot C + (0,145 \pm 0,058) \cdot P + (0,450 \pm 0,095) \cdot C^2 - (0,130 \pm 0,065) \cdot CP + (0,222 \pm 0,065) \cdot PN$; $\sigma = 0,184$; $R^2 = 0,941$; F = valeur du rapport de la variance de l'effet et de la variance résiduelle; Probabilité = probabilité de dépasser la valeur de F selon la distribution de Fisher; % SCE expliqué = pourcents de la somme des carrés des écarts expliqués par l'effet.

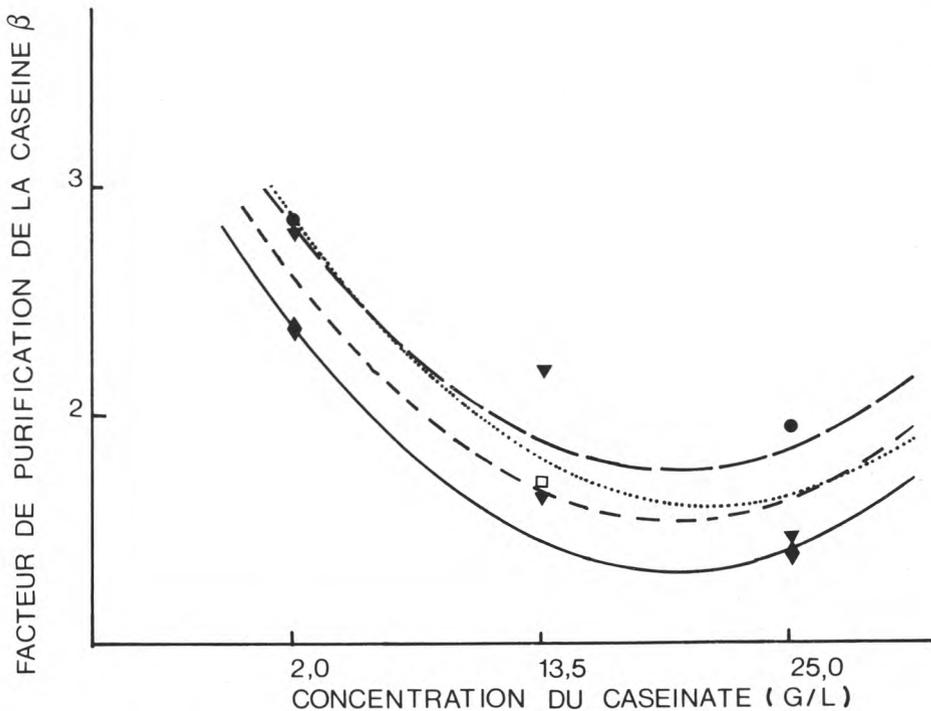


Fig. 2. Facteur de purification de la caséine β dans les surnageants (pur 1) en fonction de la concentration initiale en caséinate de sodium. Les points représentent les valeurs expérimentales, et les traits les prédictions du modèle. Voir Tableau I pour les explications. \bullet --- pH 4,2 et NaCl 0 g.l⁻¹; \square --- pH 4,2 et NaCl 3 g.l⁻¹; \blacklozenge --- pH 4,2 et NaCl 6 g.l⁻¹; \blacktriangledown --- pH 4,4 et NaCl 3 g.l⁻¹.

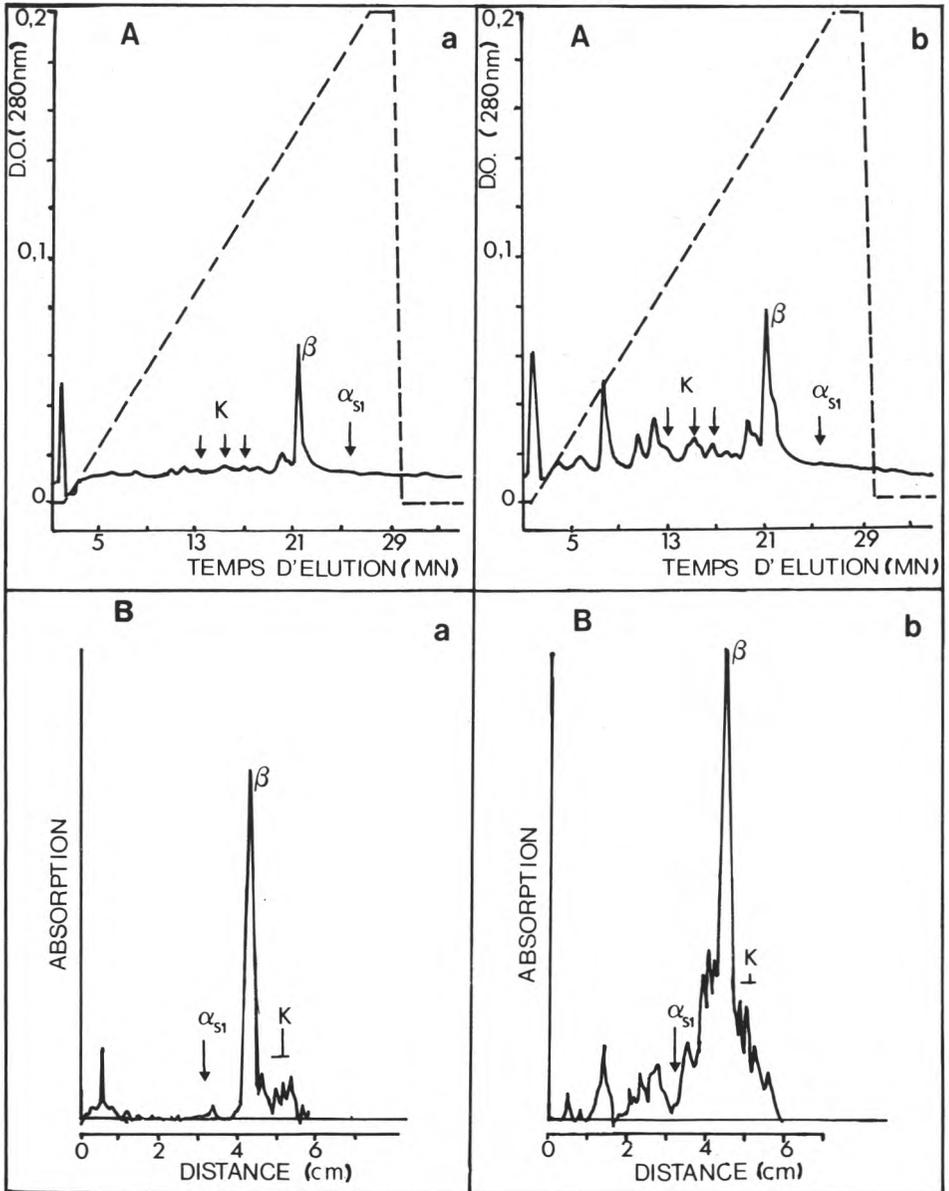


Fig. 3. A. Profils d'élution en FPLC des surnageants. La courbe en pointillés représente le gradient de NaCl (0-0,35 M). B. Profils densitométriques des surnageants en électrophorèse PAGE. a) caséinate de sodium à 2 g.l⁻¹ à pH 4,6 et NaCl 0 g.l⁻¹. b) caséinate de sodium à 25 g.l⁻¹ à pH 4,6 et NaCl 0 g.l⁻¹.

caséinate. Les concentrations critiques ne peuvent être comparées puisque Pierre et Brule solubilisent la caséine β à pH neutre, et à une force ionique environ 7 fois supérieure à celle de nos expérimentations. Nous pensons que cet effet de saturation aux fortes concentrations de caséinate résulte de l'élévation de la force ionique due aux quantités non négligeables de sels accompagnant le caséinate. D'autre part, l'accroissement du pouvoir tampon dû à l'élévation de la concentration du caséinate entraîne une augmentation des quantités d'acide nécessaires à l'obtention du pH de précipitation, et donc de la force ionique.

Un important effet négatif de la concentration en NaCl a été observé sur le taux de caséine β solubilisée, ainsi que sur son taux de purification, en interaction avec le pH. L'augmentation de la force ionique entraîne un accroissement de l'ionisation des protéines ($\text{COOH} \rightarrow \text{COO}^-$), ce qui amène à une diminution du pH_i . Le maximum de solubilité de la caséine β se trouve alors déplacé vers des pH plus acides. Sur un autre plan, le déplacement du pH_i sous l'effet de la force ionique influe sur le taux d'hydratation des caséines à un pH donné, et peut expliquer les différences d'aspect macroscopique des précipités. L'effet du pH, en interaction avec la force ionique, sur le taux de purification peut s'expliquer d'après les courbes de solubilité des caséines en fonction du pH établies par Bingham (1971) : la solubilité de la caséine K est, selon cet auteur, plus importante à pH 4,2 qu'à pH 4,6, ce qui expliquerait l'abaissement de la pureté en caséine β constaté à pH 4,2. Une gamme de pH de précipitation plus large pourrait être étudiée.

Dans les surnageants, nous avons mis en évidence l'apparition de peptides résultant de l'hydrolyse de la caséine β . Cette dégradation, faisant probablement intervenir la plasmine, s'est produite au cours

du stockage à froid du caséinate, et peut être lors de la décantation à pH acide (bien que le pH optimum de la plasmine se situe plutôt aux environs de 8). L'activité enzymatique de la plasmine est en effet accrue, à froid, du fait de la solubilisation simultanée de la caséine β et de l'enzyme (Reimerdes et Herlitz, 1979; Reimerdes, 1982).

Les résultats de cette étude indiquent que le facteur concentration initiale en caséinate détermine principalement la composition du surnageant de précipitation acide. En fonction des objectifs recherchés, des conditions optimales peuvent être définies : la meilleure pureté en caséine β est obtenue avec un caséinate de sodium à 2 g.l⁻¹, sans ajout de sel et à pH 4,6 (pur 1 = 2,94), tandis que la concentration la plus importante est obtenue avec un caséinate à 17,6 g.l⁻¹, sans ajout de sel et à pH 4,2 (conc 1 = 0,46 g.l⁻¹), mais avec une pureté plus faible (pur 1 = 1,76). Il faut noter que le rendement en concentration pour cette dernière condition est de 2,6% contre 12% pour la première. Toutefois, même dans le cas de rendements aussi faibles, le procédé peut être viable dans la mesure où le coût de matière première est nul, puisque le coproduit de cette extraction, le caséinate faiblement appauvri et non altéré, peut conduire aux mêmes utilisations que le caséinate de départ.

Les modèles n'ont pas permis d'expliquer plus de 70 et 90% des variations, respectivement pour les paramètres de concentration et de pureté. D'autres facteurs qui n'ont pas été contrôlés peuvent intervenir dans le phénomène de solubilisation et expliquer ces écarts résiduels : la vitesse d'acidification et le temps d'agitation avant décantation. Par ailleurs, une étude de l'influence de la température, du pH de stockage et du temps de stockage à froid du caséinate pourraient permettre d'améliorer les rendements. En effet, Ali

et al. (1980) et Roefs *et al.* (1985) ont montré que la solubilisation de la caséine β au cours du stockage du lait est maximale à pH 5,4 et minimale à pH 6,6. De plus, la diminution de la température de 4 à 0°C entraîne une augmentation de 13% de la caséine β solubilisée (Creamer *et al.*, 1977). Un stockage à pH 5,4 et à température plus basse (0°C) serait donc susceptible d'améliorer la solubilisation de la caséine β .

La mise en place d'une étape de microfiltration à froid réalisant la séparation des agrégats et de la phase soluble, ainsi que la concentration par ultrafiltration du microfiltrat, sont en cours d'étude.

Remerciements

Nous tenons à exprimer nos remerciements à M. Douaire de la chaire de mathématiques de l'ENSA de Rennes pour son aide dans la mise en place de la planification et de l'exploitation statistique des données.

Références

- Ali E.A., Andrews A.T. & Cheeseman G.C. (1980) Factors influencing casein distribution in cold-stored milk and their effects on cheese-making parameters. *J. Dairy Res.* 47, 383-391
- Andrews A.T. (1983) Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins. *J. Dairy Res.* 50, 45-55
- 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. (1963) Preparation of β -casein by a modified urea fractionation method. *J. Dairy Res.* 30, 259-260
- Bingham E.W. (1971) Influence of temperature and pH on the solubility of α_{S1} -, β - and K-casein. *J. Dairy Sci.* 54, 1077-1080
- Brandl V., Teschemacher H., Henschen A. & Lottspeich F. (1979) Novel opioid peptides derived from casein (β -casomorphins). 1. Isolation from bovine casein peptone. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 360, 1211-1216
- Chang K.J., Killian A., Hazum E. & Cuatrecasas P. (1981) Morphiceptin (NH₄-TYR-PRO-PHE-PRO-CONH₂): a potent and specific agonist for morphine (μ) receptors. *Science* 212, 75-77
- Creamer L.K., Berry G.P. & Mills O.E. (1977) A study of the dissociation of β -casein from the bovine casein micelle at low temperature. *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.* 12, 58-66
- 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
- Davies D.T. & Law A.J.R. (1983) Variation in the protein composition of bovine casein micelles and serum casein in relation to micellar size and milk temperature. *J. Dairy Res.* 50, 67-75
- Downey W.K. & Murphy R.F. (1970) The temperature-dependent dissociation of β -casein from bovine casein micelles and complexes. *J. Dairy Res.* 37, 361-371
- Fox P.F. & Guiney J. (1972) A procedure for the partial fractionation of the α_{S1} -casein complex. *J. Dairy Res.* 39, 49-52
- Graham D.E. & Phillips M.C. (1980) Proteins at liquid interfaces. 5. Shear properties. *J. Colloid Interface Sci.* 76, 240-249
- Henschen A., Lottspeich F., Brandl V. & Teschemacher H. (1979) Novel opioid peptides derived from casein (β -casomorphins). 2. Structure of active components from bovine casein peptone. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 360, 1217-1224
- Hipp N.J., Groves M.L., Custer J.H. & McMeehan T.L. (1952) Separation of α , β and γ casein. *J. Dairy Sci.* 35, 272-281
- Kinsella J.E. (1981) Functional properties of proteins: possible relationships between structure and function in foams. *Food Chem.* 7, 273-288
- Lee S.W., Shimizu M., Kaminogawa S. & Yamauchi K. (1987a) Emulsifying properties of peptides obtained from the hydrolyzates of β -casein. *Agric. Biol. Chem.* 51, 161-166
- Lee S.W., Shimizu M., Kaminogawa S. & Yamauchi K. (1987b) Emulsifying properties of a mixture of peptides derived from the enzymatic hydrolyzates of bovine caseins. *Agric. Biol. Chem.* 51, 1535-1540
- Manson W. & Annan W.D. (1971) The structure of a phosphopeptide derived from β -casein. *Arch. Biochem. Biophys.* 145, 16-26
- Maruyama S., Nakagomi K., Suzuki H. & Tomizuka N. (1985) Angiotensin. I-Converting

- enzyme inhibitor derived from an enzymatic hydrolysate of casein. II. Isolation and Bradykinin-potentiating activity on the uterus and the ileum of rats. *Agric. Biol. Chem.* 49, 1405-1409
- Maruyama S., Mitachi H., Suzuki H., Tanaka H. & Tomizuka N. (1987) Studies on the active site and the antihypertensive activity of angiotensin. I-Converting enzyme inhibitors derived from casein. *Agric. Biol. Chem.* 51, 1581-1586
- Maubois J.L. & Brulé G. (1982) Utilisation des techniques à membrane pour la séparation, la purification et la fragmentation des protéines laitières. *Lait* 62, 484-510
- 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
- Pierre A. & Brulé G. (1981) Mineral and protein equilibria between the colloidal and soluble phases of milk at low temperature. *J. Dairy Res.* 48, 417-428
- Reimerdes E.H. (1982) Changes in the proteins of raw milk during storage. In : *Developments in Dairy Chemistry-1*. (P.F. Fox, ed.), Applied Science Publishers, London, pp. 271-288
- Reimerdes E.H. & Herlitz E. (1979) The formation of γ caseins during cooling of raw milk. *J. Dairy Res.* 46, 219-221
- Roefs S.P.F.M., Walstra P., Dalgleish D.G. & Horne D.S. (1985) Preliminary note on the change in casein micelles caused by acidification. *Neth. Milk Dairy J.* 39, 119-122
- Rose D. (1968) Relation between micellar and serum casein in bovine milk. *J. Dairy Sci.* 51, 1897-1902
- Wei E.T. & Chang J.K. (1980) Cardiovascular effects of peptides related to enkephalins and β -casomorphins. *Fed. Proc.* 39, 605
- Wei T.M. & Whitney R.M. (1985) Batch fractionation of bovine caseins with DEAE cellulose. *J. Dairy Sci.* 68, 1630-1636