



HAL
open science

Dosage des caséines du lait de vache par électrophorèse et par chromatographie liquide rapide d'échange d'ions (FPLC®) : comparaison des résultats

Jc Collin, A Kokelaar, O Rollet-Repecaud, A Delacroix-Buchet

► To cite this version:

Jc Collin, A Kokelaar, O Rollet-Repecaud, A Delacroix-Buchet. Dosage des caséines du lait de vache par électrophorèse et par chromatographie liquide rapide d'échange d'ions (FPLC®) : comparaison des résultats. *Le Lait*, 1991, 71 (3), pp.339-350. hal-00929250

HAL Id: hal-00929250

<https://hal.science/hal-00929250>

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.

Dosage des caséines du lait de vache par électrophorèse et par chromatographie liquide rapide d'échange d'ions (FPLC®) : comparaison des résultats

JC Collin¹, A Kokelaar¹, O Rollet-Repecaud¹,
A Delacroix-Buchet²

¹ INRA, station de recherches en technologie et analyses laitières, BP 89, 39800 Poligny;

² INRA, station de recherches laitières, 78350 Jouy-en-Josas, France

(Reçu le 28 septembre 1990; accepté le 25 février 1991)

Résumé — L'analyse quantitative des diverses caséines du lait de vache a été réalisée par électrophorèse en gel de polyacrylamide-agarose pH 8,6 et par chromatographie anionique à pH 8,0. L'analyse de 118 échantillons individuels de lait prélevés dans un troupeau de 13 vaches durant une lactation a permis d'estimer les proportions de chaque caséine et de comparer les résultats des 2 méthodes. Une étude sur la capacité de fixation spécifique du colorant bleu de Coomassie R 250 sur chaque caséine a donné des coefficients moyens d'absorption par rapport à la caséine α_1 prise comme référence (1,00) de 0,98 pour la caséine α_2 , de 0,95 pour la caséine β et de 0,94 pour la caséine κ .

La comparaison des résultats entre les 2 méthodes d'analyse donne des coefficients de corrélation de 0,80 pour la fraction γ_1 , de 0,77 pour la caséine β , de 0,74 pour la fraction γ_2 et de 0,65 pour les caséines α . Les corrélations sont très faibles pour la caséine κ et la fraction γ_3 . L'étude des relations pouvant exister entre les diverses caséines du lait montre que les taux des 3 fractions γ sont bien corrélés contrairement à d'autres résultats trouvés dans les fromages (Collin *et al*, 1987).

lait de vache / caséine / dosage / électrophorèse / chromatographie

Summary — **Determination of caseins in cow's milk by electrophoresis and fast protein liquid chromatography (FPLC®) : comparison of results.** Studies on quantitative determination of bovine milk caseins were performed using polyacrylamide-agarose gel electrophoresis (pH 8.6) and anionic chromatography (pH 8.0). One hundred and eighteen individual milks were sampled during a lactation period in a herd of 13 Montbeliard cows and analysed in order to estimate the amount of each casein and compare results obtained by each method. The uptake capacity of Coomassie blue R 250 dye by each casein was also studied using α_1 casein as standard. Differences between caseins were < 6%.

Comparison of the 2 determination methods gave correlations between results of 0.80 for the γ_1 fraction, 0.77 for the β -casein, 0.74 for the γ_2 fraction, 0.65 for the α -casein. Very weak correlations were found for the γ_3 fraction and the κ -casein. Study of the relationship between the different caseins showed good correlations in milk between the 3 γ fractions contrary to results found in cheeses (Collin *et al*, 1987).

bovine milk / casein / determination / electrophoresis / chromatography

INTRODUCTION

La détermination de la teneur en protéines totales du lait est réalisée quotidiennement dans des laboratoires spécialisés à l'aide de méthodes parfaitement standardisés (Kjeldahl, colorimétrie ou spectrométrie dans l'infrarouge et l'ultraviolet).

Le lait est l'aliment dont les connaissances sur les protéines sont les plus avancées. En particulier, les séquences des amino-acides des 6 principales protéines du lait de vache ont été élucidées. Des revues scientifiques très détaillées sur les dosages des protéines du lait ont été publiées ces dernières années (Guillou *et al*, 1986; Ribadeau Dumas et Grappin, 1989).

Les protéines du lait se divisent en 2 grandes catégories, d'une part les caséines précipitables à pH 4,6 formant la trame protéique du fromage et d'autre part, les protéines sériques solubles que l'on retrouve dans le lactosérum.

La séparation et la détermination des proportions des différentes caséines du lait a été le plus souvent réalisée à l'aide de techniques électrophorétiques (Haenlein *et al*, 1973; Randolph *et al*, 1974; Ng-Kwai-Hang et Kroeker, 1984; Collin *et al*, 1987). Le développement de la chromatographie liquide sous pression (HPLC, FPLC®) a permis de séparer et de doser les principales caséines du lait en réduisant considérablement la durée d'une analyse (moins d'1 h). Ces séparations chromatographiques ont été le plus souvent réalisées sur colonne Mono Q (Pharmacia, Uppsala) (Andrews *et al*, 1985; Barrefors *et al*, 1985; Guillou *et al*, 1987). Au cours de ces travaux, la chromatographie n'a pas été employée à grande échelle comme méthode de routine. Les résultats publiés dans cet article représentent l'ana-

lyse de 118 échantillons de laits individuels d'un troupeau de vaches montbéliardes par chromatographie et électrophorèse, utilisées comme méthodes de routine, et la comparaison des résultats obtenus par ces 2 techniques d'analyse.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel

Cent dix huit échantillons de lait ont été prélevés régulièrement pendant 1 année (11 prélèvements) sur un troupeau de 13 vaches montbéliardes. Moins de 3 h après la traite, ces échantillons ont été congelés et conservés à -20°C jusqu'à leur traitement pour analyse.

Le système chromatographique FPLC (Pharmacia LCC 500) a été utilisé avec le passeur d'échantillon MV8 et une colonne échangeuse d'anions Mono Q HR 5/5 (Pharmacia).

Une cuve d'électrophorèse de 17×13 cm (Sébia) équipée d'un système de refroidissement à $+10^{\circ}\text{C}$ a servi à réaliser des migrations électrophorétiques horizontales.

Méthodes

Préparation des échantillons

Après décongélation, les échantillons de lait ont été écrémés par centrifugation à $10\,000\text{ g}$, pendant 10 min. Le lait écrémé a été pesé puis acidifié à pH 4,6 à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique 1 N. Après quelques min d'agitation, les protéines précipitées ont été récupérées par centrifugation ($10\,000\text{ g}$, pendant 10 min). Le culot humide a été pesé et, de manière à réaliser les analyses électrophorétiques et chromatographiques sur le même précipité sans décongelations successives, des quantités de 0,5 g de précipité ont été réparties dans des tubes et congelées à -20°C .

Analyses électrophorétiques

Les électrophorèses ont été effectuées en gel d'acrylamide-bisacrylamide-agarose (5% - 0,5% - 0,8%) en tampon Tris/glycine (0,075 mol.l⁻¹ / 0,06 mol.l⁻¹, pH 8,6), urée 4,5 mol.l⁻¹ et 0,2% β mercapto-éthanol. L'échantillon congelé de caséines précipitées (0,5 g) a été dissous dans 2,2 ml d'urée 9 mol.l⁻¹ auxquels ont été ajoutés 40 µl de soude 3 N pour remonter le pH et 0,3% de β mercapto-éthanol. La migration a duré 2 h 30 sous une tension de 25 V/cm.

Après coloration du gel au bleu de Coomassie R 250 puis déshydratation à 37 °C sous feuilles de cellophane, l'analyse quantitative des plaques a été réalisée avec un densitomètre enregistreur (Vernon). La surface de chaque pic a été mesurée sous une longueur d'onde de 590 nm et exprimée en pourcentage de la surface totale de l'ensemble des pics (Collin *et al*, 1987).

Analyses chromatographiques

L'échantillon congelé de caséines précipitées (0,5 g) a été dissous dans 17 ml de tampon Tris/HCl (5,0.10⁻³ mol.l⁻¹ pH 8,0) urée (9 mol.l⁻¹), azide de sodium (1,5.10⁻³ mol.l⁻¹) et dithiothréitol (1,0.10⁻² mol.l⁻¹). L'échantillon a été ensuite ajusté à pH 8,0, filtré sur un filtre de 0,22 µm et 500 µl ont été déposés sur la colonne Mono Q Pharmacia. L'analyseur FPLC Pharmacia permet de réaliser les gradients d'éluion chromatographique à partir de 2 tampons A et B. Ces tampons ont été préparés avec de l'eau UHQ traitée sur un système de filtration Elgostat (Appareil Elga). La composition du tampon A était : Tris/HCl 5.10⁻³ mol.l⁻¹ pH 8,0 urée 4,5 mol.l⁻¹, azide de sodium 1,5.10⁻³ mol.l⁻¹ et dithiothréitol 6,4.10⁻⁶ mol.l⁻¹. Le tampon B contenait en plus 2 mol.l⁻¹ de NaCl. Les tampons A et B ont été dégazés et filtrés sous vide sur un filtre de 0,22 µm (Guillou *et al*, 1987). La détection des caséines a été effectuée à la sortie de la colonne à 280 nm.

Après environ 20 séparations, la colonne a été lavée par le passage successif des solutions suivantes :

- 2 ml d'acide acétique 75%;
- 2 ml de NaCl 2 mol.l⁻¹;
- 2 ml de NaOH 2 N;
- 2 ml de NaCl 2 mol.l⁻¹;
- 2 ml de méthanol.

Les solutions ont été éluées avec de l'eau UHQ filtrée et dégazée. Pendant le lavage, le flux des solutions a été inversé. La colonne a ensuite été rééquilibrée avec une solution de NaCl 2 mol.l⁻¹ et 1 et à 2 séparations de caséines ont généralement été nécessaires avant d'obtenir un profil chromatographique optimal.

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Analyses électrophorétiques

Fixation du colorant

Afin de préciser la capacité de fixation du colorant par chaque caséine, nous avons déposé des quantités connues et croissantes de protéines purifiées sur un même gel (coloration et décoloration identiques). L'intensité de coloration estimée par un spectrophotomètre correspond à la surface du pic d'absorption. Nous avons répété les mesures sur 4 plaques différentes. Les coefficients moyens d'absorption du colorant pour chaque caséine exprimés par rapport à la caséine α_{s1} prise comme référence (1,00) ont été respectivement de 0,98, 0,95 et 0,94 pour les caséines α_{s2}, β et κ. La différence maximale d'absorption entre les caséines α_{s1} et κ n'a donc pas dépassé 6%, alors que la répétabilité des mesures pour chaque caséine dépassait 10%. Ces valeurs n'ont donc pas permis de conclure à des différences significatives d'absorption du colorant entre les diverses caséines et dans la suite de ce travail nous n'avons pas corrigé les résultats du spectrophotomètre.

Résultats des séparations

Les figures 1 et 2 montrent les résultats électrophorétiques obtenus avec des échantillons de lait et des échantillons de caséines purifiées.

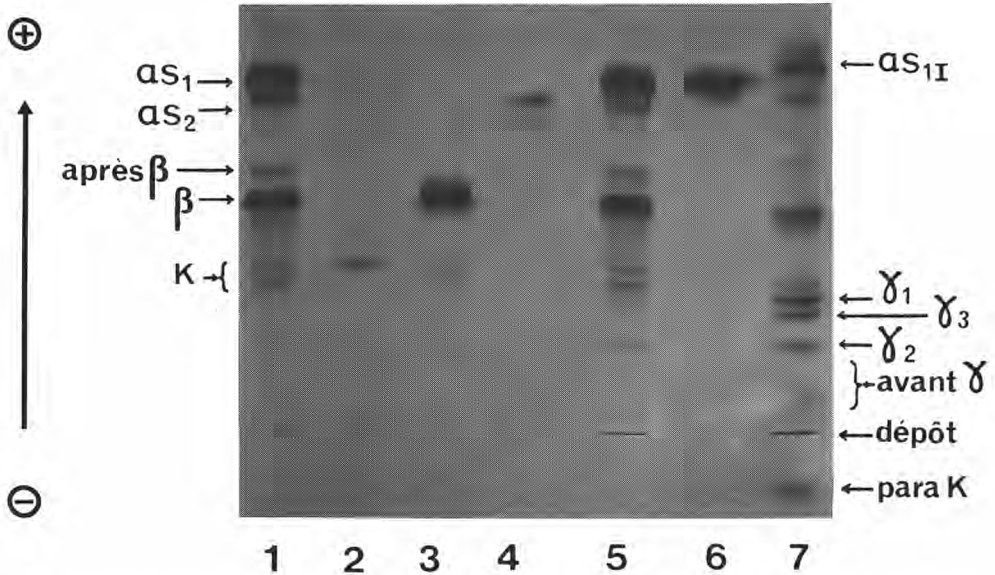


Fig 1. Analyse électrophorétique des caséines du lait de vache. 1: lait précipité à pH 4,6; 2: caséine κ A purifiée; 3: caséine β purifiée; 4: caséine α_{S2} purifiée; 5: lait précipité à pH 4,6; 6: caséine α_{S1} purifiée; 7: échantillon de fromage.

Polyacrylamide gel electrophoretic patterns of bovine milk. 1: milk precipitated at pH 4.6; 2: (purified) κ A-casein; 3: (purified) β -casein; 4: (purified) α_{S2} -casein; 5: milk precipitated at pH 4.6; 6: (purified) α_{S1} -casein; 7: cheese sample.

Pour un échantillon de lait, nous identifions facilement 2 des 3 variants génétiques de la caséine κ et les caséines β , α_{S2} et α_{S1} . Dans le lait de 5 vaches sur 13 une bande de mobilité électrophorétique supérieure à la caséine β a été enregistrée. Cette protéine migre comme la β -lactoglobuline, mais après 3 précipitations de l'échantillon à pH 4,6 et lavages successifs, cette bande persiste et représente certaines fois jusqu'à 10% des protéines précipitables à pH 4,6. Nous n'avons pas identifié cette protéine et dans la suite de cette étude nous l'avons regroupée avec la caséine β .

L'électrophorèse de caséines purifiées montre que les caséines κ glycosylées semblent migrer sous forme de bandes peu colorées entre la caséine κ non glycosylée et la caséine β . Le spectrophotomètre n'a pas la possibilité de différencier la caséine β des bandes mineures situées avant cette caséine. Les lectures électrophorétiques peuvent ainsi sous-estimer les caséines κ et surestimer légèrement les caséines β . L'analyse de la caséine α_{S2} purifiée montre 2 bandes que nous avons regroupées dans la suite de cette étude, pour déterminer la valeur de la caséine α_{S2} .

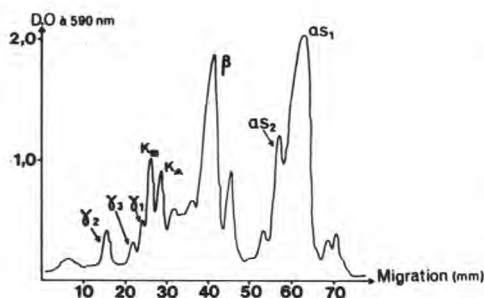


Fig 2. Séparation électrophorétique en gel d'acrylamide-bisacrylamide-agarose à pH 8,6 d'un échantillon de caséine entière obtenu par précipitation à pH 4,6. Gel coloré au bleu de Coomassie R250. Lecture densitométrique des bandes d'électrophorèse à 590 nm.

Electrophoretic separation in polyacrylamide-agarose gel at pH 8.6 of whole casein sample obtained by precipitation at pH 4.6. The gel was colored with Coomassie blue R250. Densitogram at 590 nm.

Répétabilité de la méthode électrophorétique

La répétabilité de la méthode électrophorétique a été estimée à partir de l'analyse en double des 118 échantillons de lait. Le tableau I indique la moyenne de chaque caséine, l'écart type de répétabilité, la répétabilité (exprimée par l'écart maximal obtenu entre 2 doubles) et le coefficient de variation.

Pour les caséines principales (κ , β et α_s), la répétabilité s'améliore par rapport aux premiers travaux de Collin *et al* (1987) avec un coefficient de variation égal ou inférieur à 5%. Le regroupement de la bande β avec la bande non identifiée de mobilité électrophorétique légèrement supérieure améliore la répétabilité des mesures réalisées individuellement sur chaque bande. Ce résultat tend à prouver que cette bande non identifiée pourrait être une partie de la caséine β . Une remarque similaire peut-

être faite sur la répétabilité de la somme des α_s par rapport à la répétabilité des mesures individuelles des caséines α_{s2} et α_{s1} . En effet, la séparation parfois imparfaite de ces 2 caséines entraîne de mauvaises lectures au spectrophotomètre responsables d'une sous-estimation de la caséine α_{s2} et d'une surestimation de la caséine α_{s1} (fig 2).

Analyses chromatographiques

Absorption à 280 nm

L'absorption à 280 nm n'est pas identique pour toutes les caséines. Les valeurs lues par l'intégrateur ont été corrigées en les multipliant par des facteurs déterminés par Guillou *et al* (1987) et valables pour le tampon utilisé. En prenant la caséine α_{s1} comme référence, ces facteurs pour les caséines α_{s2} , β et κ sont respectivement de 1,02, 2,14 et 1,00.

Résultats des séparations

La figure 3 schématise le profil chromatographique moyen des caséines lors de l'analyse d'un échantillon de lait. Le débit était de 2 ml/min, le volume de l'échantillon déposé sur la colonne Mono Q (5/5) était de 500 μ l et la quantité totale des protéines déposées était de 15 mg. Le gradient d'éluion retenu permet la séparation des principales caséines (Miranda, communication personnelle, 1989). L'élimination des protéines solubles par précipitation des caséines à pH 4,6 permet de mettre en évidence les fractions γ (γ_1 , γ_2 et γ_3).

Les pics correspondant aux fractions γ_2 et γ_3 sortent les premiers de la colonne Mono Q et sont en général uniques et très symétriques. Par contre, le pic de la frac-

Tableau I. Répétabilité de l'analyse électrophorétique des caséines du lait de vache. (av γ = avant γ ; βT = β Total; ap β = après β).
Repeatability of the electrophoretic analysis of bovine milk caseins.

Caséines	av γ	γ_2	γ_3	γ_1	κ	βT	ap β	$\beta +$ ap β	α_2	α_1	$\Sigma\alpha s$
Valeur moyenne en % de la surface total des pics (\bar{x})	1,04	2,00	1,29	1,23	9,28	31,37	6,19	37,56	10,10	37,50	47,60
Répétabilité											
Écart type (σ)	0,48	0,34	0,30	0,13	0,49	1,32	0,71	1,41	1,03	1,65	1,61
$r = -2,83 \cdot \sigma$	1,36	0,97	0,85	0,38	1,39	3,73	2,00	3,98	2,92	4,67	4,54
$CV = \frac{\sigma}{\bar{x}} \times 100$	46,10	17,00	23,24	10,80	5,30	4,20	11,50	3,75	10,20	4,40	3,37

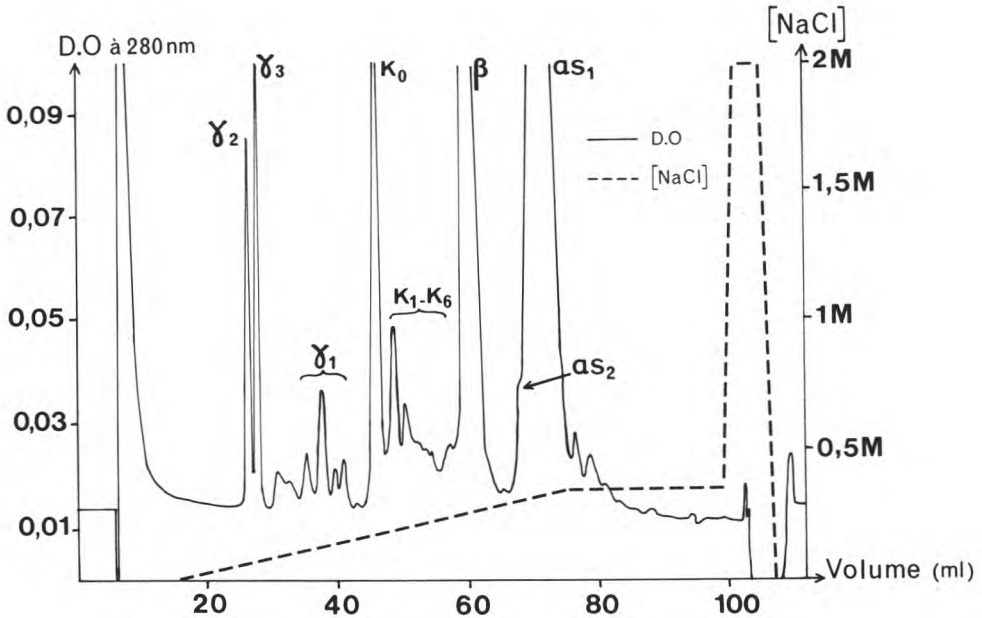


Fig 3. Séparation chromatographique par FPLC sur colonne mono Q d'un échantillon de caséine entière bovine. Débit 2 ml/min, tampon Tris-HCl $5 \cdot 10^{-3}$ mol.l⁻¹, urée 4,5 mol.l⁻¹, dithiothréitol $6,4 \cdot 10^{-5}$ mol.l⁻¹, azide de sodium $1,5 \cdot 10^{-3}$ mol.l⁻¹, pH 8,0. Elution par un gradient de NaCl de 0 à 0,32 mol.l⁻¹. Échantillon dissous dans le tampon avec urée 9 mol.l⁻¹ et dithiothréitol 10^{-2} mol.l⁻¹.

FPLC chromatography of whole bovine casein sample carried out on a Mono Q column using $5 \cdot 10^{-3}$ mol.l⁻¹ Tris-HCl buffer, pH 8,0, containing 4,5 mol.l⁻¹ urea, $6,4 \cdot 10^{-5}$ mol.l⁻¹ dithiothreitol, $1,5 \cdot 10^{-3}$ mol.l⁻¹ Na₃N at a flow rate of 2 ml/min with a linear NaCl gradient (0–0,32 mol.l⁻¹). Sample was dissolved in 9 mol.l⁻¹ urea buffer containing 10^{-2} mol.l⁻¹ dithiothreitol.

tion γ_1 est toujours entouré de petits pics que nous avons regroupés avec le pic principal γ_1 pour donner la valeur des fractions γ_1 en chromatographie FPLC.

L'enregistrement d'un chevauchement des 2 pics de caséine κ_0 (non glycosylée) avec les premiers pics de caséine κ glycosylée, lors de l'analyse d'un échantillon de lait d'une vache hétérozygote pour la caséine κ nous a obligés à regrouper tous les pics de caséines κ au cours de cette étude. D'autres travaux (Dalglish, 1986) mettent également en évidence, sur colonne anionique, les variants A et B de la caséine κ . Cette technique analytique permet ainsi de différencier les variants des différents animaux.

Avec les laits du troupeau retenu dans cette étude, nous n'avons pas pu séparer la caséine α_{s2} de la caséine α_{s1} . Seul un épaulement au début du pic α_{s1} a été enregistré pour certains échantillons. Des essais de séparation chromatographique à 40 °C n'ont pas permis d'enregistrer les améliorations souhaitées.

Répétabilité de la méthode de séparation chromatographique

Comme pour l'analyse électrophorétique, les 118 échantillons de lait ont été analy-

sés en double par la méthode chromatographique. Le tableau II indique la moyenne de chaque caséine, l'écart type de répétabilité, la répétabilité et le coefficient de variation.

Les coefficients de variation des 3 caséines principales, κ , β et α_s , sont respectivement de 6,67, 2,58 et 2,92. Deux analyses effectuées l'une après l'autre, donnent en général des résultats toujours très répétables, tandis que le même échantillon analysé en double à plusieurs jours d'intervalle peut donner des résultats peu reproductibles. En effet, le lavage et le rééquilibrage de la colonne sont des opérations importantes mais relativement longues qu'il s'avère impossible de réaliser tous les 4 ou 5 échantillons. Lors de ce travail, la colonne était lavée environ tous les 20 échantillons et les échantillons ont tous été analysés, en double, sur 2 j différents avec un ordre de passage déterminé au hasard.

Comparaison des deux méthodes

La comparaison des résultats obtenus par les méthodes chromatographique et électrophorétique a été faite en calculant le coefficient de corrélation existant entre les

Tableau II. Répétabilité de l'analyse chromatographique des caséines du lait de vache.
Repeatability of the chromatographic analysis of bovine milk caseins.

Caséines	γ_2	γ_3	γ_1	Σ	β	$\Sigma\alpha_s$
Valeur moyenne en % de la surface totale des pics (\bar{x})	1,30	2,35	1,78	10,63	38,70	45,20
<i>Répétabilité</i>						
Écart type (σ)	0,23	0,53	0,61	0,71	1,00	1,32
$r = 2,83 \cdot \sigma$	0,66	1,49	1,73	2,01	2,82	3,73
σ						
$CV = \frac{\sigma}{\bar{x}} \times 100$	18,00	22,40	34,30	6,67	2,58	2,92

2 séries de résultats pour les principales caséines (fractions γ_1 , γ_2 , γ_3 et caséines κ , β et α_s) (tableau III). Ces résultats doivent être analysés avec une certaine prudence en raison de la faible amplitude de variation des taux des diverses caséines entre échantillons de lait.

Les courbes 4A, 4B et 4C montrent les relations entre les valeurs des fractions γ analysées par les 2 méthodes. Le très faible coefficient de corrélation (0,237) obtenu pour la fraction γ_3 peut-être expliqué par l'existence d'échantillons dont les résultats divergent particulièrement en fonction de la méthode utilisée. Les moyennes des valeurs de la fraction γ_3 sont d'ailleurs celles qui diffèrent le plus (1,29 et 2,35) par rapport aux moyennes des autres fractions γ . La mauvaise répétabilité de la mesure de la fraction γ_1 en chromatographie s'explique par la multitude de pics sommés. Par contre, le coefficient de corrélation entre les valeurs des 2 méthodes d'analyse pour la fraction γ_1 est le meilleur de toutes les caséines mesurées (0,797).

L'analyse des caséines κ pose une interrogation majeure sur la signification des résultats, au regard du très faible coefficient de corrélation (0,042) mesuré entre

les 2 méthodes d'analyse. Les valeurs des échantillons individuels trouvées par les 2 méthodes (fig 5) sont différentes les unes des autres. Les 2 moyennes générales semblent quant à elles concorder, l'écart observé pouvant être dû par ailleurs au fait que la méthode électrophorétique sous-estime les caséines κ en comptabilisant une partie des caséines κ glycosylées avec les caséines β . De plus, il est bien connu que les glycoprotéines fixent mal le colorant bleu de Coomassie R 250 (fig 1). Les valeurs des échantillons varient de 7,16 à 15,98%, alors qu'en électrophorèse ces mêmes échantillons sont situés entre 5,98 et 12,94%. Le coefficient de variation de répétabilité légèrement plus élevé en chromatographie qu'en électrophorèse (6,67% au lieu de 5,30%) peut s'expliquer par le fait qu'en chromatographie nous sommions plusieurs petits pics de caséines κ glycosylées ce qui est un risque d'erreur plus important que la lecture d'une simple bande colorée lors de l'électrophorèse.

En électrophorèse, si nous regroupons avec la bande principale de caséines β , la bande située juste après celle-ci, les moyennes de la caséine β obtenues par les 2 méthodes d'analyse deviennent

Tableau III. Comparaison des résultats des analyses électrophorétique et chromatographique des caséines du lait de vache.
Comparison of electrophoresis and chromatography of caseins from bovine milks.

		γ_2	γ_3	γ_1	κ	β	$\Sigma\alpha_s$
Valeur moyenne relative	électrophorèse	2,00	1,29	1,23	9,28	37,56	47,60
	FPLC	1,30	2,35	1,78	10,63	38,70	45,20
Coefficient de variation de répétabilité (%)	électrophorèse	17,00	23,20	10,80	5,30	3,75	3,37
	FPLC	18,00	22,40	34,30	6,67	2,58	2,92
Coefficient de corrélation entre les 2 méthodes		0,739	0,237	0,797	0,042	0,772	0,650

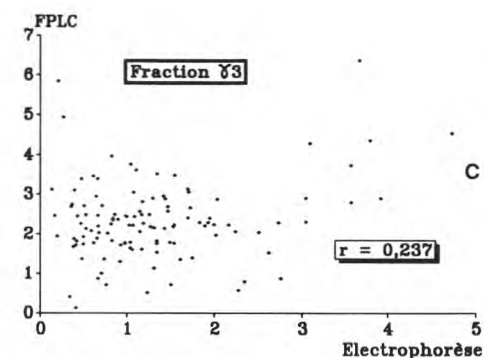
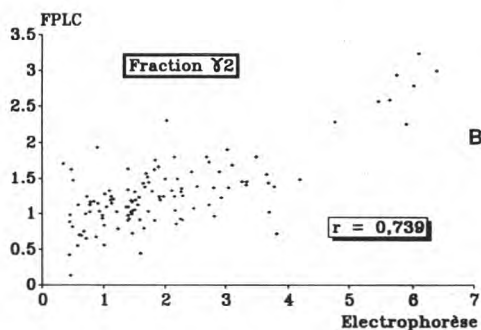
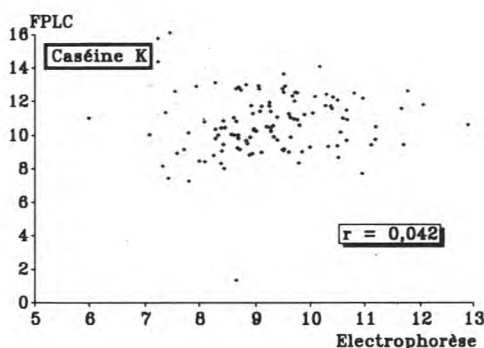
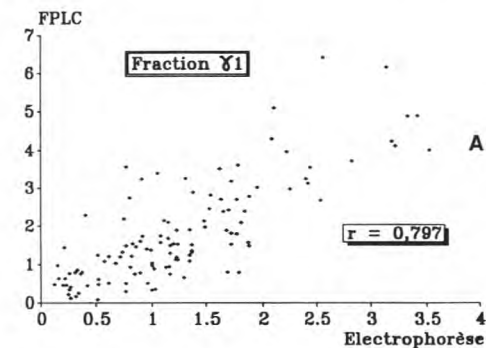


Fig 4. Relation entre les valeurs chromatographiques et électrophorétiques des fractions γ exprimées en % du total de la surface des pics de caséines. A: fraction γ_1 ; B: fraction γ_2 ; C: fraction γ_3 .
Relationship between the chromatographic and electrophoretic values obtained for the γ fractions (expressed as percent of total peaks area). A: γ_1 fraction; B: γ_2 fraction; C: γ_3 fraction.

Fig 5. Relation entre les valeurs chromatographiques et électrophorétiques de la caséine κ exprimées en % du total de la surface des pics de caséines.
Relationship between the chromatographic and electrophoretic values obtained for κ -casein (expressed as percent of total peak area).

assez proches (37,56% en électrophorèse et 38,7% en chromatographie). Le coefficient de corrélation entre les valeurs de la caséine β obtenues par les 2 méthodes est de 0,772 (fig 6A).

Pour les caséines α , la comparaison des résultats moyens trouvés par les 2 méthodes n'est pas aussi satisfaisante (47,6% en électrophorèse et 45,2% en chromatographie) et le coefficient de corrélation est inférieur (0,65) à celui mesuré entre les valeurs de la caséine β (fig 6B).

La comparaison statistique des moyennes obtenues avec les 2 méthodes de mesure pour les différentes caséines, à l'aide du test de Student, montre que dans tous les cas les moyennes sont significativement différentes au seuil de 1%.

Relations entre les variations des diverses caséines

Le tableau IV indique les coefficients de corrélation existant entre les valeurs élec-

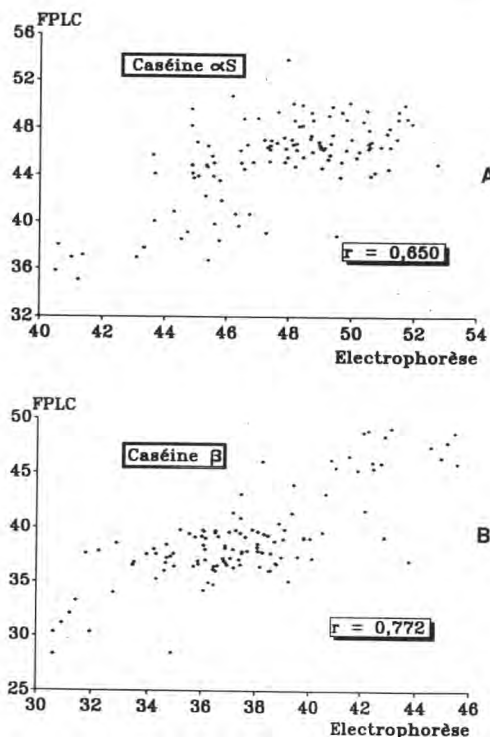


Fig 6. Relation entre les valeurs chromatographiques et électrophorétiques des caséines β et α s exprimées en % du total de la surface des pics de caséines. A: caséine β ; B: caséine α s. *Relationship between the chromatographic and electrophoretic values obtained for β - and α -caseins (expressed as percent of total peak area). A: β -casein; B: α s-casein.*

trophorétiques des différentes caséines. Nous constatons que la meilleure corrélation est celle qui existe entre les teneurs des fractions γ_2 et γ_3 (0,943). Ce résultat confirme le travail publié par Collin *et al* (1987) et laisse à penser que ces 2 caséines sont produites par des systèmes enzymatiques semblables ou très proches. Nous notons également de bonnes corrélations entre la fraction γ_1 et respectivement les fractions γ_2 (0,910), γ_3 (0,835) et la caséine β (0,788). Dans le fromage de

Comté en fin d'affinage, la fraction γ_1 apparaissait indépendante des fractions γ_2 , γ_3 et de la caséine β (Collin *et al*, 1987). Cette constatation semble montrer que l'hydrolyse de la caséine β , pour donner naissance aux fractions γ_1 , γ_2 et γ_3 dans le lait, est régie par des systèmes enzymatiques identiques ou très voisins, mais qu'ensuite l'apparition de la fraction γ_1 dans le fromage s'amplifie sous l'action de systèmes enzymatiques indépendants des premiers. L'hydrolyse de la caséine β dans le lait est attribuée à l'activité de la plasmine, mais dans les fromages à pâte cuite pressée, le système enzymatique qui hydrolyse la caséine β pour donner la fraction γ_1 est encore inconnu. Lors de l'analyse des fromages, les valeurs élevées des fractions γ_1 pourraient aussi s'expliquer par un artefact dû à une fraction inconnue de mobilité électrophorétique identique à celle de la fraction γ_1 . Les corrélations enregistrées entre les valeurs des caséines trouvées par l'analyse chromatographique ont aussi été calculées, mais les coefficients de corrélation sont tous apparus inférieurs à ceux trouvés avec les résultats des analyses électrophorétiques.

CONCLUSION

La séparation et le dosage des caséines du lait de vache ont été réalisés par 2 méthodes différentes : l'électrophorèse et la chromatographie sur résine anionique (Appareil FPLC® Pharmacia).

Le pourcentage moyen annuel de chaque classe de caséines du lait de vache a pu être déterminé à partir d'échantillons prélevés mensuellement pendant un an sur 13 vaches. La somme des fractions γ est apparue élevée par rapport aux valeurs annoncées dans la littérature (4,52% en électrophorèse et 5,43% en chromatographie). La méthode électrophorétique

Tableau IV. Coefficients de corrélation existant entre les valeurs des caséines du lait de vache estimées par électrophorèse.

Correlations between the amounts of the different milk caseins estimated by the electrophoretic method.

	av γ	γ_2	γ_3	γ_1	κ	β	$\Sigma\alpha_s$
av γ	1,000						
γ_2	0,538	1,000					
γ_3	0,573	0,943	1,000				
γ_1	0,352	0,910	0,835	1,000			
κ	-0,400	-0,372	-0,400	-0,367	1,000		
β	-0,261	-0,684	-0,597	-0,788	0,229	1,000	
$\Sigma\alpha_s$	-0,384	-0,255	-0,334	-0,022	-0,147	-0,456	1,000

semble sous-estimer la caséine κ par rapport à la méthode chromatographique (9,28% en électrophorèse et 10,63% en chromatographie).

En électrophorèse, les diverses caséines absorbent des quantités de colorant bleu de Coomassie R 250 assez voisines. Les différences maximales d'absorption entre les 4 principales caséines n'excèdent pas 6%.

La méthode chromatographique ne permet pas de doser en routine les caséines α_{s1} et α_{s2} à cause de la mauvaise résolution de ces 2 pics.

La comparaison des résultats obtenus par les 2 méthodes de dosage donne le meilleur coefficient de corrélation pour la fraction γ_1 et le plus mauvais pour la caséine κ .

L'estimation des proportions des différentes caséines du lait se réalise par des méthodes qui restent encore imprécises, et si aujourd'hui l'électrophorèse permet de tirer le maximum de renseignements, la chromatographie devrait, grâce à ses possibilités d'évolution, apporter à l'avenir les améliorations nécessaires à ces analyses.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à exprimer nos remerciements aux personnes de la station de recherches laitières de Jouy-en-Josas qui nous ont fourni les échantillons de caséines purifiées et les conseils pour les séparations chromatographiques.

RÉFÉRENCES

- Andrews AT, Taylor MD, Owen AJ (1985) Rapid analysis of bovine milk proteins by fast protein liquid chromatography. *J Chromatogr* 348, 177-185
- 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
- Collin JC, Berdagué JL, Dognin-Bergeret M, Grappin R (1987) Affinage et qualité du gruyère de Comté. IV. Étude de la protéolyse. *Lait* 67, 299-318
- Dalgleish DG (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
- Guillou H, Pélissier JP, Grappin R (1986) Méthodes de dosage des protéines du lait de vache. *Lait* 66, 143-175

- Guillou H, Miranda G, Pélissier JP (1987) Analyse quantitative des caséines dans le lait de vache par chromatographie liquide rapide d'échange d'ions (FPLC). *Lait* 67, 135-148
- Haenlein GFW, Schultz LH, Zikakis JP (1973) Composition of proteins in milk with varying leucocyte contents. *J Dairy Sci* 56, 1017-1024
- Ng-Kwai-Hang KF, Kroeker EM (1984) Rapid separation and quantification of major caseins and whey proteins of bovine milk by polyacrylamide gel electrophoresis. *J Dairy Sci* 67, 3052-3056
- Randolph HE, Erwin RE, Richter RL (1974) Influence of mastitis on properties of milk. VII. Distribution of milk proteins. *J Dairy Sci* 57, 15-18
- Ribadeau Dumas B, Grappin R (1989) Milk protein analysis. *Lait* 69, 357-416