

## Article de synthèse

# Revue bibliographique : la fraction protéose-peptones du lait

D. Pâquet

Laboratoire de biochimie appliquée associé à l'INRA, Université de Nancy 1, faculté des Sciences, BP 239, 54506 Vandœuvre-les-Nancy, France

(reçu le 12-11-1987, accepté le 3-6-1988)

**Résumé** — Les constituants de la fraction protéose-peptones du lait de vache sont décrits. Ils sont divisés en 2 classes en fonction de leur origine : d'une part les hydrolysats qui comprennent les composants 5 et 8 ainsi que de nombreux polypeptides résultant de l'hydrolyse des caséines par les protéases natives du lait; d'autre part des protéines, dont le composant 3, ainsi que des protéines majeures résiduelles. La composition et la concentration des protéose-peptones varient au cours de la conservation du lait et pourraient être considérées comme indicateurs de qualité. Les protéose-peptones ont de nombreuses propriétés fonctionnelles. Parmi celles-ci, la capacité du composant 3 d'inhiber la lipolyse dans le lait est probablement liée au caractère hydrophobe de ce composant. Cet article résume également les connaissances des fractions protéose-peptones des laits d'autres mammifères.

**protéose-peptones – protéine – caséine – protéolyse – plasmine**

**Summary — Review : the proteose-peptone fraction of milk.** *The components of the proteose-peptone fraction of bovine milk are described. They are divided to 2 classes, according to their origin: in one group are the hydrolysates which include components 5 and 8, as well as many polypeptides resulting from the hydrolysis of caseins by the native milk proteases; in the other group are proteins, including component 3, as well as residual milk major proteins. The composition and the concentration of the proteose-peptone change during milk conservation should be considered as quality indicators. The proteose-peptones have numerous functional properties. Among them the ability of component 3 to inhibit lipolysis in milk is probably linked to its hydrophobic character. This paper also summarizes findings regarding proteose-peptone fractions in the milk in other mammals.*

**proteose-peptone – protein – casein – proteolysis – plasmin**

## Introduction

La première description d'une fraction azotée résiduelle obtenue après précipitation, en milieu sulfurique, de la caséine et coagulation à l'ébullition des albu-

mines et globulines est due à Osborne et Wakeman (1918). Elle est précipitable par l'acide phospho-tungstique, et Kieferle et Gloetzel (1930) proposèrent de nommer protéoses et peptones ces substances qui furent estimées à 30% des protéines du

lactosérum par Moir (1931). Elle a été pendant longtemps considérée comme une fraction complexe composée de peptides et de polypeptides, résidus de la dégradation des protéines majeures du lait. Au sens étymologique, "protéose" et "peptone" désignent des hydrolysats protéiques de faibles poids moléculaires. Les premières, contrairement aux secondes, sont précipitables par le sulfate d'ammonium. Le nom de "protéose-peptones", proposé par Rowland (1938), convient-il pour représenter cette fraction azotée complexe dont certains constituants présentent les comportements électrophorétiques et chromatographiques typiques des protéines ? Cette question fut posée par Jenness dès 1970.

Les études publiées ces 10 dernières années montrent le rôle important de l'équipement protéasique natif du lait dans la production de polypeptides issus des caséines. Elles mettent aussi en évidence l'existence d'autres constituants, protéines au sens propre, parmi lesquelles certains sont en relation avec le système membranaire des globules gras et pourraient intervenir dans les processus de la lipolyse spontanée du lait.

A une époque où la qualité du lait est une préoccupation constante dans l'industrie de sa transformation, il nous paraît intéressant de faire une revue des connaissances concernant cette fraction protéique.

#### **Mise en évidence de la fraction protéose-peptones dans le lait de vache**

##### *Isolement de différentes fractions protéiques thermostables*

Rowland (1937) montre qu'un traitement thermique à 90°C pendant 30 min ou à 95°C pendant 15 min, suivi d'une acidifi-

cation à pH 4,7, entraîne la dénaturation de 76% des protéines du lactosérum, les protéines résiduelles (24%) étant des protéose-peptones; l'auteur ne prend pas en considération la fraction azotée non protéique (Fig. 1).

A la suite de ces premiers travaux, Rowland (1938) propose 2 protocoles de fractionnement des protéines du lait. Le premier consiste à séparer la caséine par acidification du lait en présence d'un tampon acétate de sodium; les protéines du lactosérum sont fractionnées d'une part en globulines et albumines et d'autre part en protéose-peptones, par relargage au sulfate de magnésium. Le second protocole aboutit à la fraction protéose-peptones par addition d'acide trichloracétique (TCA), jusqu'à 8% dans le surnageant de thermocoagulation du lait avant ou après acidification (Fig. 1).

Reprenant en partie les travaux de Rowland (1937, 1938) en traitant le surnageant de thermocoagulation du lactosérum par le sulfate d'ammonium à demi-saturation, Aschaffenburg (1946) isole une fraction protéique, aux propriétés tensio-actives, évaluée à 3% des protéines totales du lait, qu'il nomme "sigma-protéose" (Fig. 1).

Par un protocole semblable mais en utilisant du lactosérum de lait emprésuré, Weinstein *et al.* (1951a et b) séparent une substance protéique photosensible à l'origine de modifications indésirables de la saveur du lait : la "fraction protéique mineure" (Fig. 1).

Une étude comparative présentée par Brunner et Thompson (1961) montre que les différentes fractions protéiques isolées (protéose-peptones, sigma-protéose et la fraction protéique mineure) présentent de grandes similitudes, marquées par une faible proportion d'azote (10 à 14%), un taux relativement important de phosphore (0,6 à 1,1%) et la présence d'hexoses et

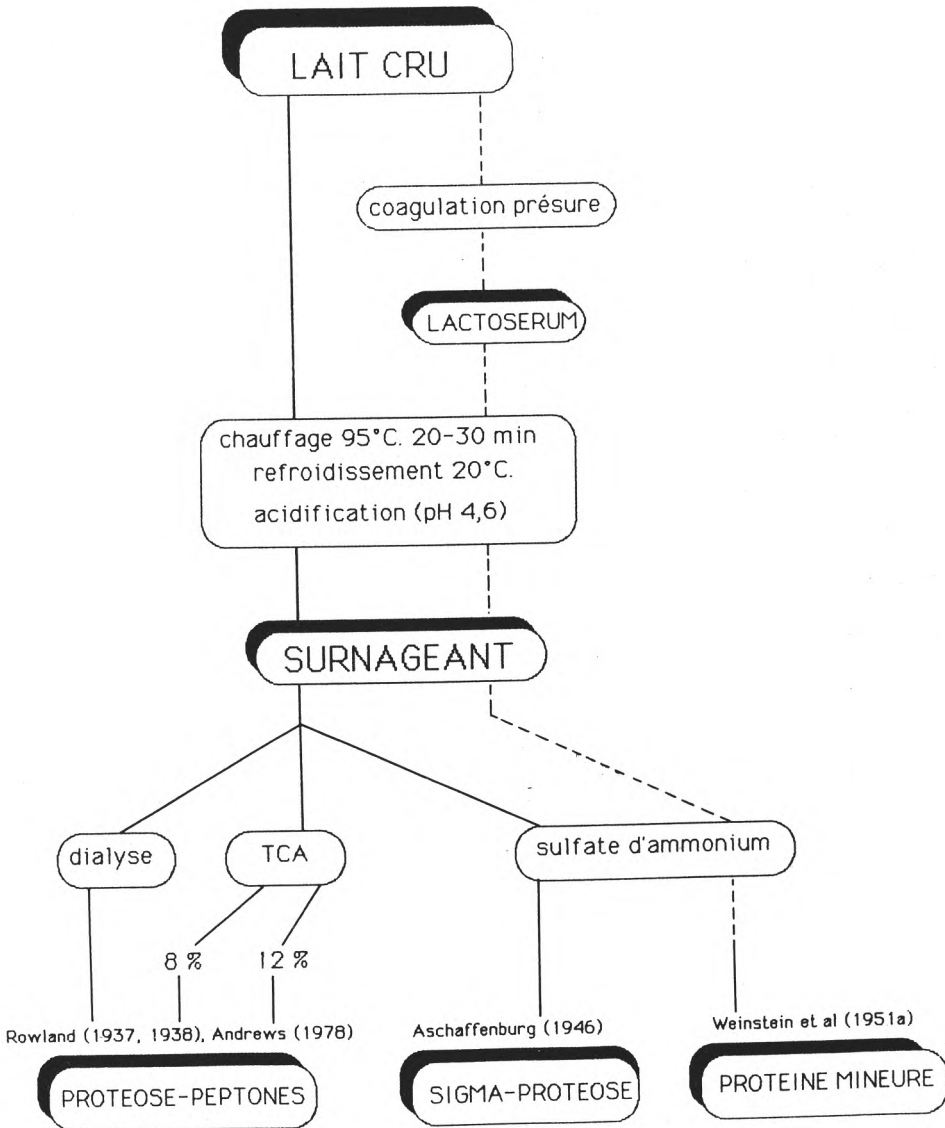


Fig. 1. Protocoles de préparation de la fraction protéose-peptones.

d'acide neuraminique. La proportion d'azote soluble dans le TCA à 12% varie de 4 à 41% de l'azote total selon la fraction protéique considérée.

Le traitement thermique suivi de l'acidification à pH 4,6 peut être appliqué à la caséine micellaire obtenue par ultracentrifugation et au surnageant correspondant, ou bien à la caséine isoélectrique et au lactosérum acide résultant. Dans chacun de ces cas, les solutions obtenues après la séparation des protéines insolubles sont enrichies en protéose-peptones (Ng *et al.*, 1970).

Une fraction protéique enrichie en protéose-peptones peut être isolée à partir du lactosérum acide sans traitement thermique; ainsi, différents complexes de protéines et de phosphate de calcium colloïdal sont séparés en élevant le pH à 8 puis à 10 (Kolar et Brunner, 1969).

### Nomenclature des protéose-peptones

McKenzie (1971) range les protéose-peptones dans le groupe des glycoprotéines mineures, avec la phosphoglycoprotéine M1 (Bezkorovainy, 1967) et la glycoprotéine-A (Groves et Gordon, 1967) (identifiée depuis au composant sécrétaire des IgAS) (Butler, 1971).

La séparation électrophorétique des protéines du lactosérum, par la technique de frontière mobile de Tiselius, a permis la réalisation des premières mesures de mobilité électrophorétique, en milieu alcalin, des albumines et des globulines. Plusieurs composants mineurs remarqués par Smith (1946) et Stanley *et al.* (1950) furent identifiés par Larson et Roller (1955) au cours de l'étude de la dénaturation thermique des protéines du lactosérum; 8 pics apparaissent sur l'image électrophorétique à pH 8,6 en tampon véronal.

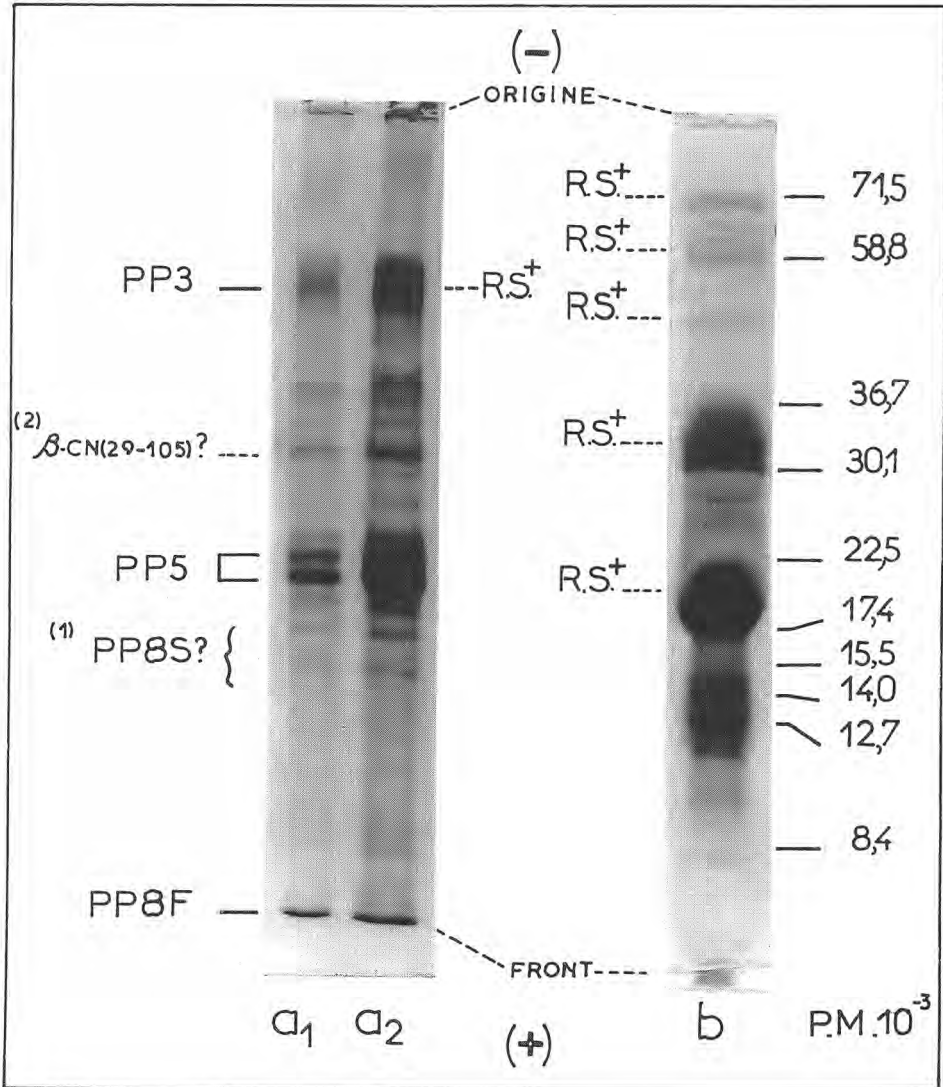
Après traitement thermique à 95°C pendant 30 min et élimination du coagulum, le surnageant, ne contenant que 18,9% des protéines, conserve 3 composants représentés par 3 pics portant les références 3, 5 et 8 en fonction de leurs mobilités. Ces composants sont fréquemment désignés par les abréviations PP3, PP5 et PP8 (Larson et Roller, 1955). Cette nomenclature adoptée par le "Committee on Nomenclature and Methodology of the American Dairy Science Association" (Jenness *et al.*, 1956) est encore en usage.

### Séparation des constituants de la fraction protéose-peptones

#### *Electrophorèses en gel d'amidon et en gel de polyacrylamide*

En électrophorèse sur plaque de gel d'amidon en présence d'urée et de 2-mercaptoéthanol à pH 8,6 selon la technique de Wake et Baldwin (1961), les 3 composants principaux ont des mobilités électrophorétiques élevées, proches de celle des caséines  $\alpha$  S (Kolar et Brunner, 1969). Le composant 5 migre sous la forme de 2 bandes très rapprochées (Kolar et Brunner, 1970).

Lors de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (8%) en tampon continu à pH 8,6, le composant 8 se présente sous la forme de 2 bandes désignées 8-Fast et 8-Slow dans l'ordre de leurs mobilités relatives (Kolar et Brunner, 1970). L'électrophorèse sur plaque verticale de gel de polyacrylamide en système discontinu présente le même type de migration, avec en plus un doublet très serré pour le composant 5 (Pâquet, 1986) (Fig. 2a). La révélation des glycoprotéines dans le gel par oxydation à l'acide periodique et coloration par le réactif de Schiff montre que seul le composant 3 présente la colora-



**Fig. 2.** (a) Electroforèse native sur plaque de gel de polyacrylamide. Gel de séparation (T : 9,25%; C : 3,84%), tampon Tris/HCl 0,38M, pH 8,9. Gel de concentration (T : 4,90%; C : 2,60%), tampon Tris/HCl 0,125M, pH 6,8. Tampon d'électrophorèse : Tris  $5 \cdot 10^{-3}$  M/Gly  $7 \cdot 10^{-2}$  M, pH 8,6 (Pâquet *et al.*, 1988). La charge en protéines déposées en (a1) est 3 fois inférieure à celle déposée en (a2). (1) : PP8 selon Eigel et Keenan (1979); (2) : β-CN(29-105) selon Andrews et Alichanidis (1983). RS<sup>+</sup> : bandes colorées par le réactif de Schiff. (b) Electroforèse-SDS sur plaque de gel de polyacrylamide. Gel de séparation (T : 15,40%; C : 2,60%), tampon Tris/HCl 0,38 M, pH 8,9. Gel de concentration (T : 4,9%; C : 2,6%), tampon Tris/HCl 0,125 M, pH 6,8. Tampon d'électrophorèse Tris  $5 \cdot 10^{-2}$  M/Gly 0,7 M, pH 8,6 (Laemmli et Favre, 1973). PM : poids moléculaire.

tion spécifique (Kester et Brunner, 1982; Pâquet, 1986). Cette technique a permis de dénombrer 38 bandes dans une préparation de protéose-peptones extraite d'un lait frais écrémé de mélange (Kasper et Brunner, 1978; Andrews et Alichanidis, 1983). Ces bandes étant numérotées de 1 à 38 à partir de l'origine, le composant 3 correspond aux bandes 4 et 5, le composant 5 aux bandes 15 et 16 et le composant 8F à la bande 38 (Andrews et Alichanidis, 1983). Des lots de protéose-peptones différant par leur mode de préparation ont été comparés par électrophorèse en tubes de gel de polyacrylamide à pH 8,6, et l'absence relative de composant 8S dans la fraction sigma-protéose a été observée (Pâquet et Alais, 1982).

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécyle sulfate (SDS) et de 2-mercaptoéthanol (Pâquet, 1986) montre une distribution très large des masses moléculaires entre 80 000 et 5 000 D (Fig. 2b). Les bandes de hautes masses moléculaires ainsi que celles correspondant aux masses moléculaires 30 000 et 20 000 sont des glycoprotéines entrant dans la composition du composant 3 (Fig. 2b).

La focalisation isoélectrique sépare 23 constituants dont les points isoélectriques se situent entre pH 3,8 et pH 5,3 (Kasper et Brunner, 1978). L'utilisation de gradients de pH étroits de 2,5 à 6,5 a permis de dénombrer au moins 30 bandes entre pH 4 et 5,5 dont 5 principales (Pâquet et Alais, 1982). Cette technique ne permet pas encore de déterminer avec précision la répartition des points isoélectriques des nombreux composants. Plusieurs raisons peuvent être invoquées :

– la fraction protéose-peptones est composée, pour une grande partie, d'hydrolysats protéiques de faibles poids moléculaires qui peuvent quitter le gel de poly-acrylamide, de faible réticulation, pendant l'étape de coloration;

– certains composants sont peu solubles dans l'eau pure et la présence d'urée à haute concentration est nécessaire pour disperser les agrégats.

L'adaptation de cette technique est nécessaire pour la réalisation de la carte peptidique des protéose-peptones par électrophorèse bidimensionnelle.

#### *Séparation chromatographique*

La filtration sur colonne de gel de Séphacryl S 200 en tampon Tris/HCl 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 8, conduit à la séparation, selon leurs tailles respectives, de 4 fractions protéiques. Le composant 3 correspond à la fraction de masse moléculaire supérieure à 270 000 D, le composant 5 ainsi que d'autres constituants non identifiés sont présents dans la fraction comprise entre 56 000 et 27 000 D; la dernière fraction, de masse moléculaire inférieure à 27 000 D contient de nombreux constituants protéiques dont le composant 8 (Pâquet *et al.*, 1985). Les poids moléculaires apparents observés paraissent élevés pour les protéose-peptones. Des résultats semblables ont été obtenus par chromatographie liquide haute performance (CLHP) sur une colonne Superose 12 en tampon phosphate de potassium 0,5 M, NaCl 0,5 M, pH 7,2 (Pâquet, 1986).

La présence de SDS 0,1 M dans le tampon d'élution provoque une diminution considérable de la taille des constituants qui sont alors élués en 2 groupes; le premier correspond à des masses moléculaires voisines de 150 000 D; le second est compris entre 40 000 et 15 000 D.

La filtration sur gel et l'électrophorèse en présence de SDS sont complémentaires et mettent en évidence la nature agrégée des protéose-peptones. Cette observation permet d'envisager l'utilisation d'une technique de filtration sur membrane pour l'extraction de la fraction pro-

téose-peptones à partir du lactosérum industriel.

La chromatographie sur colonne d'hydroxyapatite à pH 6,8 avec un gradient linéaire de phosphate de potassium permet de séparer, en partie, le composant 3 des autres constituants (Pâquet *et al.*, 1985). Ce composant s'adsorbe plus fortement que les autres sur la matrice d'hydroxyapatite. Ce comportement ne peut pas être directement imputé à une phosphorylation importante, car les interactions des protéines avec le phosphate de calcium sont complexes; les sites positifs  $Ca^{++}$ ) ou négatifs (phosphate) de l'hydroxyapatite interviennent, dépendant de la charge nette de la protéine et non uniquement de la proportion de chaînes latérales phosphorylées.

La plus grande partie des composants de la fraction protéose-peptones ont des points isoélectriques très proches les uns des autres, et la chromatographie d'échange d'ions semble peu efficace pour leur fractionnement (Andrews et Alichanidis, 1983; Pearce, 1980).

La chromatographie d'interactions hydrophobes sur colonne de phényl-Sépharose en tampon phosphate de sodium 0,1 M, pH 6,8, sépare les constituants principaux selon leur taux d'hydrophobicité de surface dans un gradient linéaire et décroissant de sulfate d'ammonium. Le composant 3 est de loin le plus hydrophobe, suivi du composant 5; le composant 8F ainsi que d'autres peptides ne s'adsorbent pas sur la matrice hydrophobe même en présence de sulfate d'ammonium 1M (Pâquet et Alais, 1982; Pâquet *et al.*, 1985).

La chromatographie d'affinité sur colonne de concanavoline-A-Sépharose permet de séparer les glycoprotéines en fonction de leur affinité pour le support; ainsi le composant 3 est retenu dans la colonne alors que les autres composants, qui ne semblent pas être de nature glyco-

protéique, sont directement élués (Kester et Brunner, 1982).

La chromatographie d'affinité sur colonne de concanavoline-A et surtout la chromatographie d'interactions hydrophobes sont 2 techniques très efficaces pour séparer le composant 3 des autres constituants des protéose-peptones. Les supports chromatographiques hydrophobes, par leur grande stabilité chimique, permettent de préparer rapidement des quantités de protéine relativement importantes.

#### *Une fraction protéique complexe*

Les fractionnements électrophorétiques et chromatographiques mettent en évidence la grande complexité de la fraction protéose-peptones du lait de vache. Elle comprend un nombre élevé de composants possédant des caractéristiques physico-chimiques très variées.

Selon leurs spécificités, ces techniques font apparaître un nombre variable de constituants protéiques dont une proportion ne diffère probablement que par certains éléments mineurs (taux de glycosylation ou taux de phosphorylation, structures primaires homologues de tailles voisines, etc.).

La chromatographie et l'électrophorèse ont largement contribué à l'identification des composants 5, 8S et 8F, comme des produits de la dégradation de la caséine  $\beta$ . Le composant 3 groupe différents constituants de nature glycoprotéique et hydrophobe, en relation avec les protéines de structure de la membrane des globules gras du lait.

#### **Isolement et composition des constituants des protéose-peptones**

##### *Les constituants principaux*

Dans le lait frais, la fraction protéose-peptones est répartie entre la caséine micel-

laire et le lactosérum (Kolar et Brunner, 1969).

La fraction protéique utilisée dans la plupart des protocoles d'extraction des composants majeurs est la fraction protéose-peptones de Rowland (1937). Cependant, l'extraction directe à partir du lait écrémé, sans chauffage, a été mise en pratique (Kolar et Brunner, 1969, 1970; Ng *et al.*, 1970; Nejjar, 1987).

#### *Les composants 5 et 8*

Ces composants sont des protéines phosphorylées en équilibre entre la caséine et le lactosérum (Kolar et Brunner, 1969, 1970). Ces auteurs notent l'existence d'une partie prosthétique glucidique. Le protocole d'isolement le plus ancien est celui de Jenness (1959) pour l'extraction du composant 5 à partir du lait frais écrémé. Les caséines et les protéose-peptones sont copécipitées par le chlorure de sodium à saturation. Après dispersion du précipité à pH 8 et dialyse, la caséine est éliminée par acidification à pH 4,6 et le surnageant contenant les protéose-peptones est percolé sur une résine échangeuse d'ions pour isoler le composant 5. Kolar et Brunner (1969) ont modifié ce protocole en augmentant progressivement le pH de la solution de protéose-peptones de 4,6 à 11,5; les différents précipités protéiques obtenus contiennent les composants 5 et 8. Les mêmes auteurs extraient les composants 5 et 8 d'une préparation de caséine micellaire, obtenue par ultracentrifugation, et par lavages à l'eau distillée. Plusieurs protocoles de préparation des composants majeurs des protéose-peptones, utilisant l'effet *salting out*, ont été également suivis (Ng *et al.*, 1970; Kolar et Brunner, 1970). Il faut noter que les étapes de précipitation des protéines par effet *salting out* n'aboutissent qu'à des préparations enrichies. La chromatographie sur colonne ou l'électrophorèse sont

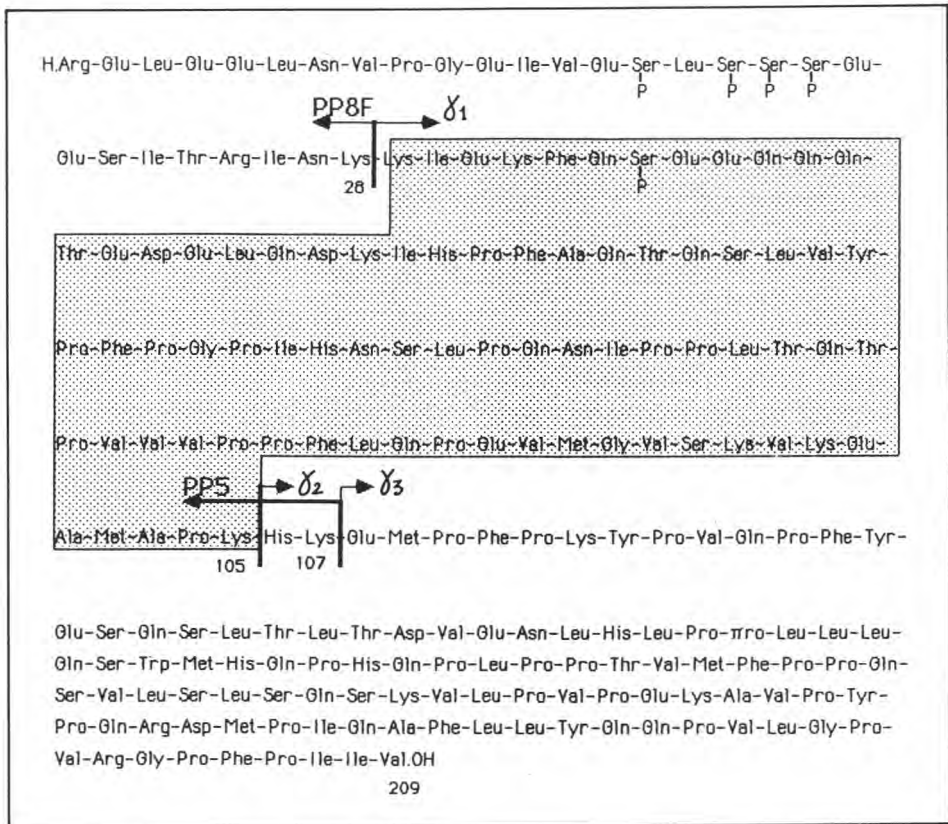
des moyens nécessaires pour obtenir des composants d'un état de pureté élevé.

L'étude des composants 5 et 8F, extraits de la fraction protéose-peptones par Andrews (1978 a et b, 1979), et surtout les premières hydrolyses *in vitro* de la caséine  $\beta$  par la plasmine (Eigel et Keenan, 1979; Eigel, 1981), ont été déterminantes dans la connaissance des composants majeurs.

*Le composant 5.* Isolée de la fraction protéose-peptones par relargage au sulfate d'ammonium (Kolar et Brunner, 1970) ou par chromatographie de filtration sur gel (Andrews, 1978a), cette protéine a une masse moléculaire comprise entre 11 500 et 14 300 D. Elle ne possède pas de groupement prosthétique glucidique (Andrews, 1978a). C'est une protéine riche en proline et pauvre en acides aminés aromatiques, qui ne contient pas de cystéine. La teneur en phosphore est estimée à 5 mol/mol. Sa séquence N-terminale (Arg-Glu-) ainsi que ses 2 séquences C-terminales (-Ala -Met-(Ala, Pro, Lys)) et (-His-Lys) montrent que ce composant correspond à un mélange de molécules représentant les polypeptides N-terminaux 1-105 et 1-107 de la caséine  $\beta$  (Andrews, 1978a, 1979) (Fig. 3). Ces observations sont confirmées par l'hydrolyse *in vitro* de la caséine  $\beta$  par la plasmine bovine, qui libère un polypeptide de mobilité électrophorétique identique à celle du composant 5 (Eigel, 1981).

*Le composant 8F.* Obtenu à partir de la fraction protéose-peptones par relargage au sulfate d'ammonium suivi d'une chromatographie de filtration sur Bio-gel P10 (Kolar et Brunner, 1970) ou par gel filtration sur Séphadex G-50 (Andrews, 1978b), ce composant a une masse moléculaire comprise entre 3 300 et 4 100 D (Kolar et Brunner, 1970; Andrews, 1978b, 1979). Sa teneur en phosphore est de 3,8 mol/mol (Andrews, 1978b) et il ne contient pas de groupement prosthétique gluci-





**Fig. 3.** Protéolyse de la caséine  $\beta$  A1 par la plasmine. La coupure des liaisons peptidiques Lys(28)-Lys(29), Lys(105)-His(106) et Lys(107)-Glu(108) donne naissance à 3 fragments N-terminaux nommés caséines  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$  et  $\gamma_3$ . Les fragments N-terminaux correspondants sont les composants PP8F (Arg(1)-Lys(28)) et PP5 (Arg(1)-Lys(105 ou 107)); le fragment Lys(29)-Lys(105 ou 107) est attribué à PP8S par Eigel et Keenan (1979).

dique. Les séquences N-terminale (Arg-Glu-) et C-terminale (-Thr-(Arg,Ile,Asn)-Lys) de ce composant montrent qu'il correspond au polypeptide N-terminal 1-28 de la caséine  $\beta$  (Andrews, 1978b, 1979) (Fig. 3).

**Le composant 8S.** Ce composant n'a été isolé qu'une fois par Kolar et Brunner

(1970) à partir de la fraction protéose-peptones par relargage au sulfate d'ammonium suivi de la gel filtration sur Bio-gel P10. Ces auteurs estiment sa masse moléculaire à 9 900 D et le définissent comme une glycoprotéine phosphorylée.

Eigel et Keenan (1979) montrent que 2 peptides N-terminaux de la caséine  $\beta$ ,

libérés *in vitro* par la plasmine bovine, ont des poids moléculaires et une mobilité électrophorétique à pH 9,6 (doublet) identiques à ceux du composant 8S. Le doublet correspondant au composant 8S, extrait du gel d'électrophorèse, présente une carte peptidique identique à celle des fragments protéiques obtenus par la protéolyse *in vitro*. Tenant compte de ces résultats, les auteurs estiment que le composant 8S des protéose-peptones correspond aux fragments 29-105 et 29-107 de la caséine  $\beta$  formés au cours de la protéolyse par la plasmine.

La localisation électrophorétique des fragments 29-105 et 29-107 de la caséine  $\beta$  (Fig. 2a) est cependant controversée. Selon Andrews et Alichanidis (1983), la bande attribuée au composant 8S ne correspond pas aux résidus 29-105 et 29-107 de la caséine  $\beta$  car l'hydrolyse *in vitro* de cette caséine ou du composant 5 par la plasmine bovine donne, en électrophorèse, à pH 8,9, 2 bandes principales de mobilité inférieure à celle du composant 5; l'un de ces produits d'hydrolyse, isolé par chromatographie sur colonne à partir de lait pasteurisé stocké à 37°C a une masse moléculaire comprise entre 8 000 et 8 900 D et présente un aminogramme similaire à celui du peptide 29-105 de la caséine  $\beta$ . La bande attribuée jusqu'alors au composant 8S est, selon ces mêmes auteurs, difficile à localiser avec précision sur le gel d'électrophorèse et ferait partie d'un mélange hétérogène de composants représentés par plusieurs bandes.

L'amélioration considérable des techniques de fractionnement par CLHP et par électrophorèse pourrait permettre de résoudre ce problème dans un proche avenir.

### Le composant 3

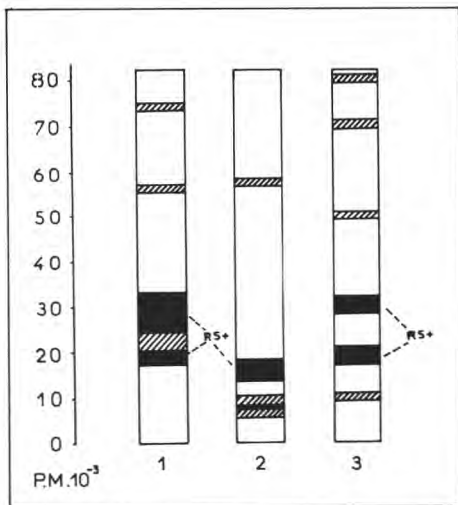
Cette protéose-peptone est présente uniquement dans le lactosérum (Kolar et

Brunner, 1970; Andrews et Alichanidis, 1983). Les premières études (Ng, 1967; Ng et Brunner, 1966; Kolar et Brunner, 1969; Ng *et al.*, 1970) ont été réalisées sur des concentrés protéiques enrichis, préparés à partir de lait cru ou chauffé, par relargage au sulfate d'ammonium. C'est une fraction protéique caractérisée par une faible concentration en acides aminés aromatiques et en méthionine et l'absence de cystéine (Ng *et al.*, 1970). Les mêmes auteurs notent une proportion élevée d'hydrates de carbone (17,3%) et la présence de phosphore. En tampon véronal pH 8,6, ce composant se présente sous forme de complexes de masses moléculaires 163 000 D dissociés par la guanidine 5 M en sous-unités de masse moléculaire apparente voisine de 40 000 D; cette dernière a été évaluée à 22 000 D à partir de l'analyse des acides aminés.

Le caractère hydrophobe marqué de cette fraction permet son isolement par chromatographie d'interactions hydrophobes suivie d'une filtration sur gel à partir de la fraction "sigma-protéose" (Pâquet et Alais, 1982). L'extraction quantitative par ce type de chromatographie montre que la fraction hydrophobe représente environ 25% des protéose-peptones totales éluées (Pâquet *et al.*, 1985). Son image électrophorétique en milieu non dissociant est homogène; l'électrophorèse en présence de SDS et de 2-mercaptoéthanol fait apparaître 2 bandes principales de masses moléculaires 17 000 et 7 000 D, dont la plus grosse est une glycoprotéine (Pâquet *et al.*, 1988) (Fig. 4). L'électrofocalisation de la fraction hydrophobe dans un gradient de pH de 2,5 à 10 présente de nombreuses bandes entre pH 3 et 6; 2 d'entre elles, les plus importantes, correspondent à des protéines de  $pH_i$  voisins respectivement de 3,5 et de 4 (Pâquet, non publié).

Kester et Brunner (1982) isolent par

chromatographie d'affinité sur concanavine-A la fraction glycoprotéique des protéose-peptones. Elle ne semble comprendre que le composant 3. L'électrophorèse de cette fraction en présence de SDS et de 2-mercaptoéthanol fait apparaître 2 constituants glycoprotéiques de masses moléculaires comprises respectivement entre 18 000 et 22 000 D et 24 600 et 33 400 D (Fig. 4).



**Fig. 4.** Composition de 3 isolats protéiques contenant le composant 3. 1 : fraction glycoprotéique des protéose-peptones (Kester et Brunner, 1982). 2 : fraction hydrophobe des protéose-peptones (Pâquet *et al.*, 1987). 3 : fraction protéique isolée du lait sans chauffage (Nejjar, 1987). PM : poids moléculaire.

Dans une étude récente, le composant 3 a été isolé à partir du lait cru par relargage au sulfate d'ammonium, suivi d'une chromatographie sur colonne d'hydroxyapatite en tampon phosphate de potassium pH 6,8 et de la CLHP sur colonne d'échangeur d'anions en tampon éthanol-

amine 0,02 M, pH 7,5 avec un gradient linéaire de chlorure de sodium. L'électrophorèse en présence de SDS montre la présence de 2 constituants glycoprotéiques majeurs de masses moléculaires 18 000 et 30 000 D (Fig.4) (Nejjar, 1987).

Ces différentes études mettent en évidence l'hétérogénéité de la fraction composant 3 et son caractère glycoprotéique.

Les travaux d'immunochimie réalisés sur des préparations enrichies en composant 3 par Kanno et Yamauchi (1978, 1979), Kanno et Othake (1981), Kester et Brunner (1982), Nejjar *et al.* (1986), ainsi que la récente étude de Nejjar (1987) à partir du composant 3 extrait du lait cru, mettent en évidence une identité antigénique certaine entre le composant 3 et certains constituants protéiques de la membrane des globules gras. L'ensemble de ces résultats permet d'imaginer plusieurs hypothèses concernant l'origine de ce composant :

- fragments protéiques de la membrane des cellules sécrétrices constituant l'enveloppe du globule gras au moment de l'excrétion dans le lumen;
- protéines du réticulum endoplasmique enveloppant les gouttelettes lipidiques au cours de leur migration vers le pôle apical de la cellule sécrétrice;
- protéines synthétisées dans le sang et traversant les cellules de la glande mammaire.

Vu sa nature hétérogène, l'origine du composant 3 pourrait correspondre à une ou plusieurs de ces hypothèses.

#### *Autres constituants des protéose-peptones*

Les fractionnements chromatographiques (Pâquet *et al.*, 1985) ou électrophorétiques (Andrews et Alichanidis, 1983) des

protéose-peptones ont montré la complexité de cette fraction protéique. Si le composant 3 paraît être une protéine du lactosérum, tous les autres constituants sont des fragments de caséine produits par l'action des protéases natives du lait. La plupart des 38 bandes observées sur l'image électrophorétique en gel de polyacrylamide sont identiques à celles d'hydrolysats produits *in vitro* par action de la plasmine sur les caséines  $\alpha$ S et  $\beta$  principalement (Andrews et Alichanidis, 1983).

Malgré la grande intensité du traitement thermique appliqué au lait cru ou écrémé pour en extraire la fraction protéose-peptones, certaines caséines et les protéines majeures du lactosérum demeurent cependant à l'état soluble après précipitation du thermocoagulum à pH 4,6. Ainsi des traces de  $\beta$ -lacto-globuline, d' $\alpha$ -lactalbumine et de caséine  $\beta$  et  $\alpha$ S<sub>1</sub> (Andrews et Alichanidis, 1983) et de la sérum albumine (Nejjar *et al.*, 1986) ont été détectées.

### Evolution de la fraction protéose-peptones dans le lait

La protéolyse enzymatique de la caséine  $\beta$  est responsable de la formation des composants 5 et 8. Elle est aussi à l'origine de nombreux autres composants non encore identifiés.

Le lait normal, d'animaux sains, contient plusieurs protéases qui ont déjà été décrites par Humbert et Alais (1979), Visser (1981) et Reimerdes (1983). Il faut également tenir compte de l'activité protéolytique d'enzymes exogènes sécrétées par des micro-organismes, en particulier au cours de la conservation réfrigérée du lait. De nombreux travaux ont montré que les caséines sont les protéines les plus dégradées par la flore psychrotrophe protéolytique (Adams *et al.*, 1976; Feuillat *et al.*, 1976; de Beukelar *et al.*, 1977). Dans

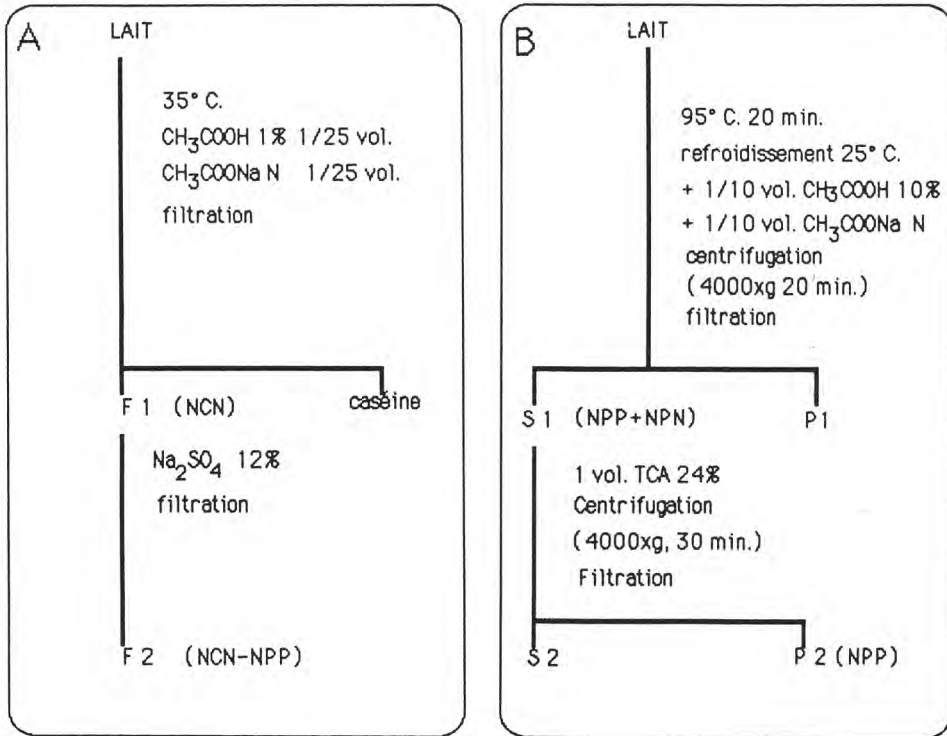
une revue, Law (1979) rapporte l'effet de ces bactéries sur les constituants du lait. D'autres protéases d'origine leucocytaire apparaissant dans la mamelle des animaux atteints de mammite peuvent être responsables de l'hydrolyse des protéines (Grieves et Kitchen, 1985) et, par conséquent, d'une modification du taux de protéose-peptones.

Plusieurs méthodes existent pour mesurer le taux de protéose-peptones dans le lait. La plus ancienne, proposée par Aschaffenburg et Drewry (1959) (Fig. 5), consiste à précipiter cette fraction protéique par le sulfate de sodium dans le lactosérum acide et à calculer la différence entre l'azote non caséinique (NCN) du lactosérum initial et l'azote du filtrat recueilli après la précipitation. Cette méthode semble peu précise; des contrôles électrophorétiques effectués sur le précipité ont montré la présence d'une contamination par les protéines solubles (Pâquet et Driou, non publié). Les méthodes plus récentes (Fig. 5) reprennent le principe du protocole de Rowland (1938). Elles consistent à précipiter les protéose-peptones par le TCA dans le surnageant de thermo-coagulation du lait et, soit à doser l'azote dans le précipité (Schaar, 1985), soit à calculer la différence entre l'azote du surnageant et l'azote du filtrat TCA (Pâquet *et al.*, 1987).

### Teneur du lait en protéose-peptones

La synthèse des travaux publiés sur les protéose-peptones ne permet pas d'établir une teneur moyenne du lait, car les valeurs sont très souvent exprimées différemment (gramme de protéine par litre, pourcentage de l'azote total ou de l'azote protéique, etc.). La teneur varie entre 0,5 et 3 g/l (Joshi et Ganguli, 1972; O'Keefe *et al.*, 1979; Hagrass *et al.*, 1983).

Au moyen de l'électrophorèse quantitative, Andrews (1979) évalue à 2,28



**Fig. 5.** Méthodes de dosage de la fraction protéose-peptones dans le lait de vache. A : méthode d'Aschaffenburg et Drewry (1959), la quantité d'azote correspondant aux protéose-peptones (NPP) est donnée par le calcul F1-F2; B : méthode utilisée par Pâquet *et al.* (1987), dans laquelle  $\text{NPP}=\text{S1}-\text{S2}$ . NPP peut être aussi obtenu par le dosage de l'azote contenu dans P2 (Schaar, 1985). NCN : azote non caséinique; NPN : azote non protéique; P : précipité; S : surnageant; F : filtrat.

mg/ml la quantité de protéose-peptones dans le lait frais, dont 0,84 mg pour PP5 et 0,19 mg pour PP8F. Pierre et Douin (1984) estiment la teneur en composant 5 à 1 g/kg de lait et à 0,6 g/kg de lactosérum. Jusqu'à présent, on ne connaît pas la proportion de composant 3 dans le lait de vache.

La race des animaux, le stade et le nombre de lactations sont les principaux facteurs de variation. La teneur tend à diminuer en début de lactation pour aug-

menter en milieu de lactation (Hagrass *et al.*, 1983). Elle est supérieure dans les laits contenant le génotype BB de la  $\beta$ -lactoglobuline (Schaar, 1985). Dans une étude portant sur le lait frais du matin d'un troupeau de 20 vaches de race frisonne (stades de lactation confondus), Pâquet *et al.* (1987) montrent que le taux varie de 2,8 à 4,2% de l'azote protéique.

Une seule étude sur une longue période avec un nombre important d'animaux a été effectuée (Schaar, 1985). Une pro-

portion moyenne de 9,1% de l'azote total a été trouvée pour un troupeau de 82 animaux de races suédoise, frisonne et jersey, à différents stades de lactation, entre les mois de janvier et de mai. L'auteur met en évidence une relation linéaire avec forte corrélation entre cette teneur et l'activité plasmine. Cependant, dans le lait natif, ce taux ne peut pas être attribué à la seule activité postsécrétoire de la plasmine. Certains constituants pourraient être sécrétés directement dans le lumen à la suite d'une dégradation intra-cellulaire (Schaar, 1985).

*Variation de la teneur en protéose-peptones du lait au cours de sa conservation*

Dans le lait frais conservé à 5°C pendant 72 h, le taux augmente de 14% en moyenne sur un échantillon de 80 animaux et présente une forte corrélation avec l'activité plasminique. Ces 2 paramètres s'intensifient avec le nombre de lactations, mais contrairement à l'activité de la plasmine, la production de protéose-peptones n'est pas affectée par le stade de lactation. L'accroissement du taux de protéose-peptones est le plus élevé lorsque le lait présente le génotype BB pour la  $\beta$ -lactoglobuline. Aucune relation n'a été montrée avec les variants génétiques des autres protéines du lait (Schaar, 1985).

Pendant la conservation à 37°C du lait frais ou pasteurisé, en présence d'agents antibactériens, les proportions de caséine  $\gamma$  et de tous les composants des protéose-peptones, à l'exception du composant 3, augmentent considérablement (Andrews, 1983). Pour une valeur initiale de 2,5 mg/ml dans le lactosérum frais, la teneur en protéose-peptones s'accroît jusqu'à 11,1 mg/ml dans le lait cru et à 15,5 mg/ml dans le lait pasteurisé, après 7 jours à 37°C. Un taux moyen de réduction égal à 36% de la production

de protéose-peptones est observé lorsque l'inhibiteur trypsique du soja est ajouté au lait au niveau de 30  $\mu$ g/ml, confirmant ainsi le rôle important de la plasmine dans la protéolyse. L'examen électrophorétique des hydrolysats *in vitro* des différentes caséines par la plasmine porcine ou le plasminogène bovin et l'urokinase indique que 90% des composants pourraient avoir pour origine les caséines  $\alpha$ S1 et  $\beta$  (Andrews et Alichanidis, 1983). Des différences dans les compositions des hydrolysats obtenus au cours de la conservation et ceux produits par l'ajout de plasmine montrent que plusieurs protéases natives du lait sont concernées (Andrews, 1983).

La relation entre la croissance des bactéries psychrotrophes et la teneur en protéose-peptones dans le lait frais conservé par réfrigération à 6°C a été étudiée. L'accroissement du taux de protéose-peptones suit la croissance des bactéries psychrotrophes et devient significatif à partir d'une population bactérienne de  $10^6$  UFC/ml (Pâquet *et al.*, 1987). L'électrophorèse en gel de polyacrylamide ainsi que la CLHP sur colonne de gel filtration montrent que les composants majeurs (PP3 et PP5) tendent à disparaître après 3 jours de stockage réfrigéré, tandis que des peptides de faibles poids moléculaires avec des mobilités électrophorétiques élevées apparaissent (Pâquet *et al.*, 1987).

La proportion des protéose-peptones s'accroît dans le lait des animaux atteints de mammite (Randolph *et al.*, 1974; Lin, 1977; Burniana *et al.*, 1979). L'activité protéolytique de ces laits est souvent jusqu'à 10 fois supérieure à celle de l'équipement protéasique natif (Alais, 1984).

## Propriétés fonctionnelles des protéose-peptones

### *Thermostabilité et solubilité*

La thermostabilité est la première propriété fonctionnelle de la fraction protéose-peptones; les constituants sont solubles après un traitement thermique élevé suivi d'une acidification à pH 4,6. La solubilité de ces protéines semble cependant dépendre du pH. La mesure de la turbidité d'une solution de protéose-peptones met en évidence l'insolubilisation du composant 5 à un pH inférieur à 4,2; le composant 3 précipite partiellement (Pierre et Douin, 1984). Ces auteurs montrent que l'acidification du lait à pH 2,2 par décaionisation, suivie d'une remontée du pH à 4,8 par ajout de lait non traité et d'un traitement thermique à 48°C, provoque la coprécipitation des caséines et du composant 5. La quantité de protéose-peptones ainsi retenue est voisine de 0,8 g/l de lait. Le composant 5 serait adsorbé sur la caséine à pH acide, le composant 3, partiellement précipité, serait plus ou moins retenu avec des lipoprotéines dans les agrégats. Cette coprécipitation est mise en pratique dans un nouveau procédé de fabrication de la caséine à partir de lait décaionisé (Rialland et Barbier, 1980).

### *Propriétés fonctionnelles de surface*

La fraction protéose-peptones possède des propriétés tensio-actives intéressantes. La "sigma-protéose" est responsable du moussage du lait (Aschaffenburg, 1946). Cante et Moreno (1975) préconisent son utilisation comme agent émulsifiant à une concentration comprise entre 0,1 et 2% (P/V) dans la phase aqueuse.

Les propriétés moussantes ont été étudiées par Jelen (1973) et Jelen *et al.* (1973). Le lactosérum de fromagerie est

séparé de ses protéines majeures par traitement thermique à 95°C et acidification à pH 4,5, puis partiellement délactosé par décantation après concentration. Le fouettage de la solution obtenue, contenant environ 2% de protéines pour un extrait sec de 30%, produit une mousse de qualité comparable à celle du blanc d'œuf.

Les propriétés tensio-actives des protéose-peptones ont été récemment comparées à celles de la caséine entière (Pâquet, 1986). A des concentrations comprises entre 0,1 et 10 µg d'azote/ml de tampon phosphate de sodium 0,01 M à pH 7, la tension superficielle de la solution de protéose-peptones est inférieure à celle de la caséine. La fraction hydrophobe présente un pouvoir tensio-actif supérieur à celui de la fraction protéose-peptones totale.

Les protéose-peptones inhibent la lipolyse spontanée dans le lait de vache (Anderson, 1981) ainsi que dans le lait de chèvre (Chilliard *et al.*, 1984). L'inhibition maximum dans le lait de vache intervient pour une addition de 1 à 2 mg de protéose-peptones par ml de lait et lorsque des préparations enrichies en composant 3 sont utilisées. L'addition préalable de sérum sanguin au lait lève l'inhibition (Anderson, 1981), ainsi que l'excès de substrat (Shimizu *et al.*, 1982; Cartier et Chilliard, 1986). L'inhibiteur interviendrait sur le substrat et non sur l'enzyme (Anderson 1981) et l'effet très net de la fraction hydrophobe des protéose-peptones apporte un argument à cette hypothèse. Il s'agirait plus d'une protection du substrat que d'un effet inhibiteur à proprement parler (Pâquet, 1986; Cartier, 1987).

Une fraction glycoprotéique soluble isolée de la membrane des globules gras inhibe la lipolyse dans le lait (Shimizu *et al.*, 1982); il pourrait s'agir de composant 3 ou d'une partie de ses constituants gly-

coprotéiques puisqu'il est, pour une partie, présent au sein des membranes de globules gras (Kanno et Yamauchi, 1979; Kester et Brunner, 1982; Pâquet, 1986; Nejjar, 1987).

Des préparations enrichies en composant 5 sont, au contraire, activatrices de la lipolyse (Cartier et Chilliard, 1986), de même que la fraction non hydrophobe des protéose-peptones (Pâquet, 1986; Cartier, 1987).

#### *Autres propriétés fonctionnelles*

D'autres propriétés de la fraction protéose-peptones du lait de vache ont été notées, dont l'étude ne semble pas avoir été développée jusqu'à présent. Nous en citerons quelques-unes.

La "fraction protéique mineure", isolée par Weinstein *et al.* (1951 a et b), est responsable de l'altération photochimique du goût du lait homogénéisé.

Les protéose-peptones pourraient avoir un effet stabilisant sur la caséine  $\alpha_S$  en présence de chlorure de calcium (Hofí *et al.*, 1978), mais un effet déstabilisant sur le lait traité thermiquement (Kelly, 1982). Elles ne sont pas responsables des propriétés gélifiantes des isolats de protéines de lactosérum (Hillier et Cheeseman, 1979).

Le composant 8 est susceptible de provoquer la précipitation des caséines dans les boissons à base de lait fermenté, alors qu'au contraire le composant 3 a un effet stabilisant (Takamizawa *et al.*, 1978; Kudo *et al.*, 1978).

Le composant 5 a un effet dépresseur sur le volume du pain (Jenness, 1959). Les composants 8F et 8S pourraient être également responsables de cette propriété qui disparaît après dialyse du lactosérum. Selon Volpe et Zabik (1975), ces protéines relieriaient entre elles les molécules de gluten par des ponts hydrogènes

ou hydrophobes et comprimant ainsi la structure réticulée de la pâte, elles provoqueraient la perte de volume.

Au plan biologique, par son analogie structurale avec les fragments 1-105 et 1-107 de la caséine  $\beta$ , le composant 5 contient une grande partie des sites antigéniques de cette caséine qui sont principalement localisés dans sa région N-terminale (Otani *et al.*, 1984 a, b et c, 1987). Par conséquent, comme la caséine  $\beta$ , le composant 5 pourrait être un allergène potentiel responsable de l'allergie au lait, à condition que le caractère allergénique soit maintenu dans la forme peptide.

#### **La fraction protéose-peptones des laits d'autres espèces**

La composition des fractions protéose-peptones des laits des autres espèces de mammifères a été jusqu'ici peu étudiée. Seule celle du lait humain a été détaillée, celles des laits de bufflesse, de brebis et de chèvre ont fait l'objet de recherches très limitées.

La fraction protéose-peptones du lait humain (environ 210 mg/100 ml de lait) contient en moyenne 45% d'hydrates de carbone: Quatre composants protéiques majeurs ont été répertoriés, dont le plus abondant correspond à l' $\alpha$ -lactalbumine de masse moléculaire 13 000 D. Le second de masse moléculaire 30 000 D est une protéine similaire à la galactothermine. Les 2 autres composants de masses moléculaires 70 000 et 100 000 D sont de nature glycoprotéique et étroitement associés en un complexe de haut poids moléculaire. Contrairement à celle du lait bovin, cette fraction protéose-peptones contient le facteur de croissance de *Lactobacillus bifidus var. Penn.* (Bezkorovainy *et al.*, 1976). La présence abondante d' $\alpha$ -lactalbumine est surprenante; elle est probablement liée aux



conditions techniques particulièrement difficiles de la séparation des protéines à partir de ce lait.

La fraction protéose-peptones du lait de bufflesse présente une image électrophorétique, sur gel d'amidon à pH 8,6, identique à celle du lait de vache (Majumder *et al.*, 1972). Elle représente 0,95% de la matière azotée du lait (Stephen et Ganguli, 1974). Les 87,1% de celles-ci se trouvent dans le lactosérum (Abd El Salam *et al.*, 1978).

Dans le lait de brebis, elle représente 4,7% des protéines totales (Saleem *et al.*, 1986). Elle a été mise en évidence par électrophorèse en gel de polyacrylamide à pH 9,5 sous la forme d'une bande de mobilité électrophorétique intermédiaire entre les immunoglobulines et l' $\alpha$ -lactalbumine (Morais et Ramos, 1978).

L'analyse électrophorétique du lait de chèvre indique la présence de 3 constituants protéiques principaux de masses moléculaires 36 310, 18 840 et 14 960 D (Khatoun et Joshi, 1987).

Le lait de jument contient une proportion de 0,19% de protéose-peptones (Urbinisov *et al.*, 1981).

## Conclusion

### *Point sur l'identification et la nomenclature*

Les composants principaux des protéose-peptones ont été nommés en fonction de leurs mobilités électrophorétiques. Les composants 5 et 8F sont identifiés comme des fragments de la caséine  $\beta$ . La séquence peptidique totale de ces polypeptides n'a cependant pas été établie. Pour le composant 8S subsiste une controverse quant à sa composition, mais on sait néanmoins que les fragments 29-105 et 29-107 de la caséine  $\beta$  entrent

dans la composition des protéose-peptones.

La connaissance du composant 3 a surtout évolué durant les 7 dernières années. Il est constitué de plusieurs protéines et polypeptides, dont certains sont de nature glycoprotéique, associés en un complexe de haut poids moléculaire. Les dosages immunologiques (Nejjar, 1987) tendent à le situer comme le constituant majeur des protéose-peptones. Sa présence au niveau de la membrane des globules gras ne fait plus de doute, mais la question de son origine reste encore posée. Plusieurs hypothèses sont proposées qui pourraient en elles-mêmes constituer plusieurs thèmes de recherche pour le futur.

L'avancement des connaissances permettrait désormais de réviser la nomenclature des protéines du lait dans plusieurs domaines. Déjà le "Committee on Nomenclature and Methodology of Milk Proteins of the Dairy Foods Research Section, American Dairy Science Association" a proposé de remplacer les appellations composant 5, 8S et 8F par  $\beta$ -CN-5P,  $\beta$ -CN-1P et  $\beta$ -CN-4P en fonction de leurs proportions respectives de résidus sérine phosphorylés (Eigel *et al.*, 1984).

D'autres modifications sont envisageables :

- la division de la fraction protéose-peptones en 2 classes comprenant d'une part les composants issus de la protéolyse enzymatique et, d'autre part, les protéines dites "natives" telles que le composant 3;
- l'abandon des termes "protéose-peptones" désignant uniquement des peptides de faibles poids moléculaires;
- le composant 3 devrait être considéré comme un groupe de 3 polypeptides principaux à caractère hydrophobe pour certains et glycoprotéique pour d'autres.

### *Les protéose-peptones témoins de la qualité du lait*

La démonstration de la relation entre les propriétés tensio-actives du composant 3, son hydrophobicité apparente élevée et son comportement inhibiteur de la lipolyse du lait et de la lipoprotéine lipase *in vitro* ouvrent la voie à un important travail de recherche.

Les méthodes modernes d'électrophorèse mettent en évidence la présence d'un nombre élevé de composants mineurs pour la plupart originaires de l'hydrolyse des caséines  $\beta$  et  $\alpha$ S par le système protéasique natif du lait. Sans cependant négliger la présence de caséines et de protéines solubles résiduelles non dénaturées par le traitement thermique, le dosage des protéose-peptones pourrait constituer un indice, d'une part de l'activité plasminique dans le lait natif et le lait pasteurisé et, d'autre part pour l'activité des protéases d'origine psychrotrophe dans le lait réfrigéré.

### Remerciements

L'auteur remercie Messieurs les Professeurs C. Alais et G. Linden pour leurs précieux conseils lors de la rédaction de cet article.

### Références

Abd El Salam M.H., Mohamed A.A., Mahran G.M. & Hofi A.A. (1978) Distribution of proteose-peptones in the protein system of buffalo's milk. 20<sup>th</sup> Int. Dairy Congr., pp. 220-221

Adams D.M., Barach J.T. & Speck M.L. (1976) Effect of psychrotrophic bacteria from raw milk on milk proteins and stability of milk proteins to ultrahigh temperature treatment. *J. Dairy Sci.* 59, 823-827

Alais C. (1984) *Science du Lait. Principes des Techniques Laitières*. SEPAIC, Paris

Anderson M. (1981) Inhibition of lipolysis in bovine milk by proteose-peptone. *J. Dairy Res.* 48, 247-252

Andrews A.T. (1978a) The composition, structure and origin of proteose-peptone component 5 of bovine milk. *Eur. J. Biochem.* 90, 59-65

Andrews A.T. (1978b) The composition, structure and origin of proteose-peptone component 8F of bovine milk. *Eur. J. Biochem.* 90, 67-71

Andrews A.T. (1979) The formation and structure of some proteose-peptone components. *J. Dairy Res.* 46, 215-218

Andrews A.T. (1983) Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins. *J. Dairy Res.* 50, 45-55

Andrews A.T. & Alichanidis E. (1983) Proteolysis of caseins and the proteose-peptone fraction of milk. *J. Dairy Res.* 50, 275-290

Aschaffenburg R. (1946) Surface activity and proteins of milk. *J. Dairy Res.* 14, 316-329

Aschaffenburg R. & Drewry J. (1959) New procedure for the routine determination of the various non-casein proteins of milk. 15<sup>th</sup> Int. Dairy Congr., London, 3, 1631-1637

Bezkorovainy A. (1967) Physical and chemical properties of bovine milk and colostrum whey M-1 glycoproteins. *J. Dairy Sci.* 50, 1368-1375

Bezkorovainy A., Nichols J.H. & Sly D.A. (1976) Proteose-peptone fractions of human and bovine milk. *Int. J. Biochem.* 7, 639-645

Burniana L.M., Mohran M.A. & Gheorghiu A. (1979) Changes in electrophoretic pattern of milk proteins from animal with mastitis. *Egypt. J. Dairy Sci.* 7, 129-136

Brunner J.R. & Thompson M.P. (1961) Characteristics of several minor-protein fractions isolated from bovine milk. *J. Dairy Sci.* 44, 1224-1237

Butler J.E. (1971) Physicochemical and immunochemical studies on bovine IgA and glycoprotein-a. *Biochim. Biophys. Acta* 251, 435-449

Cante C.J. & Moreno V. (Général Foods Corp.) (1975) Edible polyunsaturated emulsions. US Patent 3 887 715

Cartier P. & Chilliard Y. (1986) Effects of different skim milk fractions on activity of cow milk purified lipoprotein lipase. *J. Dairy Sci.* 69, 951-955

Cartier P. (1987) *Aspects biochimiques de la lipolyse spontanée du lait de vache*. Thèse de Doctorat, Clermont-Ferrand

Chilliard Y., Selselet-Attou G., Bas P. & Morand-Fehr P. (1984) Characteristics of lipolytic system in goat milk. *J. Dairy Res.* 67, 2216-2223

De Beukelar N.J., Cousin M.A., Bradley Jr R.L.

- & Marth E.H. (1977) Modification of milk proteins by psychrotrophic bacteria. *J. Dairy Sci.* 60, 857-861
- Eigel W.N. & Keenan T.W. (1979) Identification of proteose-peptone component 8-Slow as a plasmin-derived fragment of bovine  $\beta$ -casein. *Int. J. Biochem.* 10, 529-535
- Eigel W.N. (1981) Identification of proteose-peptone component 5 as a plasmin-derived fragment of bovine  $\beta$ -casein. *Int. J. Biochem.* 13, 1081-1086
- Eigel W.N., Butler J.E., Ernstrom C.A., Farrell Jr H.M., Harwalkar V.R., Jenness R. & Mc L. Whitney R. (1984) Nomenclature of proteins of cow's milk : fifth revision. *J. Dairy Sci.* 67, 1599-1631
- Feuillat M., Le Guennec S. & Olsson A. (1976) Contribution à l'étude de la protéolyse des laits réfrigérés et incidences sur le rendement d'une fabrication de fromage à pâte molle. *Lait* 56, 521-536
- Grieve P.A. & Kitchen B.J. (1985) Proteolysis in milk : the significance of proteinases originating from milk leucocytes and a comparison of the action of leucocytes, bacterial and natural milk proteinases on casein. *J. Dairy Res.* 52, 101-112
- Groves M.L. & Gordon W.G. (1967) Isolation of a new glycoprotein-a and a  $\gamma$  G-globulin from individual cow's milk. *Biochemistry* 6, 2388-2394
- Hagrass A.E.A., Asker A.A., Hafez S.H. & Shehata A.E. (1983) Some factors affecting the nitrogen distribution of Friesian cow's milk. *Ann. Agric. Sci. Ain Shams Univ.* 28, 1429-1444 (*Dairy Sci. Abstr.*, 1986, 5360)
- Hillier R.M. & Cheeseman G.C. (1979) Effect of proteose-peptone on the heat gelation of whey protein isolates. *J. Dairy Res.* 46, 113-120
- Hofi A.A., Mahran G.M., Mohamed A.A. & Abd El Salam M.H. (1978) Effect of proteose-peptone of the stability of  $\alpha$ S-casein. *Egypt. J. Dairy Sci.* 6, 119-123
- Humbert G. & Alais C. (1979) Review of the progress of dairy science : the milk proteinase system. *J. Dairy Res.* 46, 559-571
- Jelen P. (1973) Whipping studies with partially delactosed cheese whey. *J. Dairy Sci.* 56, 1505-1511
- Jelen P., Manning P.B. & Coulter S.T. (1973) Separation of nitrogenous residues from deproteinated whey for lactose crystallization. *J. Dairy Sci.* 56, 1492-1497
- Jenness R., Larson B.L., McMeekin T.L., Swanson A.M., Whitnah C.H. & Mc L. Whitney R. (1956) Nomenclature of the proteins of bovine milk. *J. Dairy Sci.* 39, 536-541
- Jenness R. (1959) Characterization of milk serum protein component 5. *J. Dairy Sci.* 42, 895
- Jenness R. (1970) Protein composition of milk. In : *Milk Proteins Chemistry and Molecular Biology*. Vol. 1, (H.A. McKenzie, ed.), Academic Press, New York and London, pp. 17-43
- Joshi V.K. & Ganguli N.C. (1972) Proteose-peptone contents of milk from cross-bred animals. *Indian J. Dairy Sci.* 25, 59-62 (*Dairy Sci. Abstr.*, 1973, 1943)
- Kanno C. & Yamauchi K. (1978) Antigenic identity between the soluble glycoprotein of milk fat globule membrane and a heat-stable protein fraction of whey. *Agric. Biol. Chem.* 42, 1697-1705
- Kanno C. & Yamauchi K. (1979) Relationship of soluble glycoprotein of milk fat globule membrane to component-3, -5 and -8 fractions of proteose-peptone. *Agric. Biol. Chem.* 43, 2105-2113
- Kanno C. & Othake Y. (1981) Immunological and electrophoretic characteristics of anti-SGP reacting protein among component -3, -5 and -8 fractions of proteose-peptone of bovine milk : evidence for the multiple forms. *Jpn. J. Zootech. Sci.* 52, 282-296
- Kasper G.A. & Brunner J.R. (1978) Electrophoretic characterization of the proteose-peptone fraction of cow's milk. *J. Dairy Sci.* (Suppl. 1) 61, 112
- Kelly P.M. (1982) The effect of addition of a proteose-peptone extract on the heat-stability of milk. 21<sup>th</sup> Int. Dairy Congr. 1, (2), 203
- Kester J.J. & Brunner J.R. (1982) Milk fat-globule membrane as possible origin of proteose-peptone glycoproteins. *J. Dairy Sci.* 65, 2241-2252
- Khatoun J.A. & Joshi V.K. (1987) Physico-chemical characteristics of the proteose-peptone fraction from goat milk. I. Geoelectrophoretic and filtration pattern. *Milchwissenschaft* 42, 236-237
- Kieferle F. & Gloetzel J. (1930) The residual nitrogen of cow milk. *Milchwirtsch. Forsch.* 11, 62-117
- Kolar C.K. & Brunner J.R. (1969) Proteose-peptone fraction of bovine milk : distribution in the protein system. *J. Dairy Sci.* 52, 1541-1546
- Kolar C.K. & Brunner J.R. (1970) Proteose-peptone fraction of bovine milk : lacteal serum

- component 5 and 8-casein associated glycoproteins. *J. Dairy Sci.* 53, 997-1008
- Kudo S., Takamizawa K. & Mada M. (1978) Acid precipitation of fermented milk beverages. II. Influence of  $\beta$ -lactoglobulin, component 3 and euglobulin. *Jpn. J. Zootech. Sci.* 49, 753-760 (*Dairy Sci.*, Abstr., 1979, 4046)
- Larson B.L. & Roller G.D. (1955) Heat denaturation of the specific serum proteins in milk. *J. Dairy Sci.* 38, 351-360
- Laemmli U.K. & Favre M. (1973) Maturation of the head of the bacteriophage T4. 1. DNA packaging events. *J. Mol. Biol.* 80, 575-599
- Law B.H. (1979) Reviews of the progress of dairy science: enzymes of psychrotrophic bacteria and their effects on milk and milk products. *J. Dairy Res.* 46, 573-588
- Lin R.H. (1977) Influence of mastitis on the heat stability of bovine milk. *Diss. Abstr. Int. B* 38, 1637
- Majumder G.C., Joshi V.K. & Ganguli N.S. (1972) Starch gel electrophoresis of proteose-peptone, proteose and peptone of cow and buffalo milk. *Indian J. Anim. Sci.* 42, 779-784
- McKenzie H.A. (1971) Whole casein: isolation properties and zone electrophoresis. In: *Milk Proteins: Chemistry and Molecular Biology*. Vol. 1, (H.A. McKenzie, ed.) Academic Press, New York and London, pp. 87-116
- Moir G.M. (1931) The determination of the milk proteins. *Analyst* 56, 228-235
- Morais F. & Ramos M. (1978) Isolation and identification of ewe's milk whey proteins by electrophoresis. 20<sup>th</sup> Int. Dairy Congr., 216
- Nejjar Y. (1987) *Purification et études physico-chimiques et immunologiques d'une fraction contenant le composant 3 des protéose-peptones du lait*. Thèse de Doctorat, Nancy
- Nejjar Y., Pâquet D., Godbillon G. & Le Déaut J.Y. (1986) Immunological relationship between the hydrophobic fraction of proteose-peptone and the milk fat globule membrane of bovine milk. *Int. J. Biochem.* 18, 893-900
- Ng W.S. (1967) *The isolation and physico-chemical characterization of a glycoprotein from the proteose-peptone fraction of cow's milk*. Ph. D thesis, Michigan State University, East Lansing
- Ng W.S. & Brunner J.R. (1966) Preparative-scale electrophoresis on acrylamide gel. *J. Dairy Sci.* 49, 96-98
- Ng W.S., Brunner J.R. & Rhee K.C. (1970) Proteose-peptone fraction of bovine milk: lactum serum component 3-A whey glycoprotein. *J. Dairy Sci.* 53, 987-996
- O'Keefe A., Mulholand E. & Pheland J.A. (1979) Influence of stage of lactation on protein composition and on suitability of milk for cheesemaking. *Ir. J. Food Sci. Technol.* 3, 62 (*Dairy Sci.*, Abstr., 1981, 1738)
- Osborne T.B. & Wakeman A.J. (1918) The proteins of cow's milk. *J. Biol. Chem.* 33, 7-17
- Otani H., Higashiyama S. & Tokita F. (1984a) Antigenic reactivity of human casein with anti-serum to bovine  $\beta$ -casein. *Milchwissenschaft* 39, 65-67
- Otani H., Iwasaki S. & Tokita F. (1984b) Studies on the antigenic structure of bovine  $\beta$ -casein. I. Antigenic reactivity of  $\beta$ -III with anti-serum to  $\beta$ -casein. *Milchwissenschaft* 39, 211-214
- Otani H., Higashiyama S. & Tokita F. (1984c) Studies on the antigenic structure of bovine  $\beta$ -casein. II. Antigenic reactivity of  $\beta$  2-casein with anti-serum to  $\beta$ -casein. *Milchwissenschaft* 39, 291-293
- Otani H., Mine Y. & Hosono A. (1987) Studies on the antigenic structure of bovine  $\beta$ -casein. V. Antigenic activities of some peptides derived from residues 1-93. *Milchwissenschaft* 42, 505-508
- Pâquet D. (1986) *Comportement des protéose-peptones du lait de vache: isolement, purification et propriétés d'une fraction à caractère hydrophobe*. Thèse de Doctorat, Nancy
- Pâquet D. & Alais C. (1982) Purification et quelques caractéristiques moléculaires du composant 3 des protéose-peptones. *Lait* 62, 338-349
- Pâquet D., Nejjar Y. & Alais C. (1985) Electrophoretic and chromatographic behavior of the proteose-peptone fraction of cow's milk. *Milchwissenschaft* 40, 200-203
- Pâquet D., Driou A., Bracquart P. & Linden G. (1987) Effect of refrigerated storage of milk on proteolysis. Relationship to the proteose-peptone content. *Neth. Milk Dairy J.* 41, 81-92
- Pâquet D., Nejjar Y. & Linden G. (1988) Study of a hydrophobic protein fraction isolated from milk proteose-peptone. *J. Dairy Sci.* (accepted for publication)
- Pearce R.J. (1980) Heat-stable components in the Aschaffenburg and Drewry total albumin fraction from bovine milk. *N.Z. J. Dairy Sci. Technol.* 15, 13-22
- Pierre A. & Douin M. (1984) Eléments d'étude du procédé Bridel de fabrication de caséine à

- partir du lait décactionisé par échanges d'ions (E1). *Lait* 64, 521-536
- 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
- Reimerdes E.H. (1983) New aspects of naturally occurring proteases in bovine milk. *J. Dairy Sci.* 66, 1591-1600
- Rialland J.P. & Barbier J.P. (1980) Procédé de traitement du lait par une résine échangeuse de cations en vue de la fabrication de la caséine et du lactosérum. Brevet français N° 2480568
- Rowland S.J. (1937) The soluble protein fraction of milk. *J. Dairy Res.* 8, 6-14
- Rowland S.J. (1938) The precipitation of the proteins in milk. I. Casein. II. Total proteins. III. Globulin. IV. Albumin and proteose-peptone. *J. Dairy Res.* 9, 30-41
- Saleem R.M., Mahmoud W.A. & Younis Y.A. (1986) Nitrogen distribution, molecular weight and size of casein micelles in Awassi sheep's milk. *Egypt. J. Dairy Sci.* 14, 81-86
- Schaar J. (1985) Plasmin activity and proteose-peptone content of individual milk. *J. Dairy Res.* 52, 369-378
- Shimizu M., Miyaji H. & Yamauchi K. (1982) Inhibition of lipolysis by milk fat globule membrane materials in model milk fat emulsion. *Agric. Biol. Chem.* 46, 795-799
- Smith E.L. (1946) Isolation and properties of immune lactoglobulins from bovine whey. *J. Biol. Chem.* 165, 665-676
- Stanley W.G., Andrews A.C. & Whitnah C.H. (1950) Electrophoresis of milk proteins. I. Some comparisons of salt-acid and salt-lyophilized whey fractions. *J. Dairy Sci.* 33, 275-280
- Stephen J. & Ganguli N.C. (1974) Distribution of nitrogen in buffalo milk and ultracentrifugal whey as affected by heat-treatments. *Milch-wissenschaft* 29, 594-596
- Takamizawa K., Kudo S. & Mada M. (1978) Acid precipitation of fermented milk beverages. I. Influence of milk constituents. *Jpn. J. Zootech. Sci.* 49, 745-752 (*Dairy Sci.*, Abstr., 1979, 4045)
- Urbinisov Z.K., Servetnik-Chalaya G.K. & Izatullaev E.A. (1981) Protein content of mare milk. *Molochn. Promst.* 2, 45 (*Dairy Sci.*, Abstr., 1982, 589)
- Visser S. (1981) Proteolytic enzymes and their action on milk proteins. A review. *Neth. Milk Dairy J.* 35, 65-88
- Volpe T. & Zabik M.E. (1975) A whey protein contributing to loaf volume depression. *Cereal Chem.* 52, 188-197
- Wake R.G. & Baldwin R.L. (1961) Analysis of casein fractions by zone electrophoresis in concentrated urea. *Biochim. Biophys. Acta* 47, 225-239
- Weinstein B.R., Duncan C.W. & Trout G.M. (1951a) The solar activated flavor of homogenized milk. IV. Isolation and characterization of a whey constituent capable of producing the solar-activated flavor. *J. Dairy Sci.* 34, 570-576
- Weinstein B.R., Lillevik H.A., Duncan C.W. & Trout G.M. (1951b) The solar activated flavor of homogenized milk. V. The electrophoretic analysis of a contributing minor-protein fraction. *J. Dairy Sci.* 34, 784-789