

LOCALISATION DES SUBSTITUTIONS D'ACIDES AMINÉS DIFFÉRENCIANT LES VARIANTS A ET B DE LA CASÉINE κ BOVINE

F. GROSCLAUDE, Marie-Françoise MAHÉ, J.-C. MERCIER
et B. RIBADEAU-DUMAS

*Laboratoire de Génétique biochimique et Laboratoire de Recherches sur les Protéines,
Centre national de Recherches zootechniques, I. N. R. A.,
78350 Jouy en Josas*

RÉSUMÉ

Comme le suggéraient les résultats de WOYCHIK *et al.* (1966), DE KONING *et al.* (1966) et HILL *et al.* (1970), les caséinomacropéptides des variants A et B de la caséine κ bovine diffèrent par deux substitutions d'acides aminés : Ala (κ B) \rightarrow Asp (κ A) et Ile (κ B) \rightarrow Thr (κ A).

Ces substitutions affectent respectivement la 22^e et la 34^e position à partir de l'extrémité COOH-terminale du caséinomacropéptide, qui est également celle de la caséine κ .

D'un point de vue génétique, les deux variants de la caséine κ assurent donc le marquage de la partie terminale du locus κ -Cn.

INTRODUCTION

Les techniques d'électrophorèse en gel ont permis de mettre en évidence un polymorphisme génétique au niveau de chacune des trois espèces principales de caséine bovine, les caséines α_{s1} , β et κ (voir les revues bibliographiques d'ASCHAFENBURG, 1968 et de THOMPSON, 1970). Les quatre variants génétiques de caséine α_{s1} , les cinq variants de caséine β et les deux variants de caséine κ détectés à ce jour chez *Bos taurus* sont déterminés par les allèles des trois loci de structure, α_{s1} -Cn, β -Cn et κ -Cn. Ces loci présentent la particularité d'être très étroitement liés, au point que leurs allèles ségrégent comme s'ils formaient une seule unité génétique (GROSCLAUDE *et al.*, 1964, 1965 ; KING *et al.*, 1965 ; LARSEN et THYMAN, 1966).

Nous avons suggéré, dans des publications antérieures (GROSCLAUDE *et al.*, 1966, 1969) que la localisation des mutations correspondant à tous ces variants pouvait contribuer à préciser la disposition relative des trois loci de structure considérés.

Pour localiser ces mutations, il suffit, en vertu du principe de colinéarité entre un gène de structure et la protéine correspondante, de localiser, dans chacune des chaînes polypeptidiques, les altérations propres aux différents variants génétiques.

Nous venons de caractériser de la sorte tous les variants des caséines α_{s1} et β connus à ce jour (GROSCLAUDE *et al.*, 1972).

En ce qui concerne la caséine κ , les compositions en acides aminés établies par WOYCHIK *et al.* (1966) montrent que, par rapport à celle du variant κB , la chaîne polypeptidique du variant κA comporte d'une part un résidu alanyle et un résidu isoleucyle en moins, et d'autre part un résidu thréonyle et un résidu aspartyle ou asparaginyne en plus ; WOYCHIK *et al.* ont suggéré que les deux variants différaient par les substitutions Ala \rightarrow Asp et Ile \rightarrow Thr, car, dans cette hypothèse, chacune des mutations correspondantes peut n'impliquer que la substitution d'une seule paire de nucléotides. DE KONING *et al.* (1966) ont montré par ailleurs que ces substitutions affectaient le caséinomacropéptide, c'est-à-dire la partie COOH-terminale de la caséine κ , ce qui a été confirmé par HILL *et al.* (1970). Le présent travail qui se réfère à la séquence du caséinomacropéptide du variant κB établie par MERCIER *et al.* (1972), précise la localisation des deux substitutions d'acides aminés qui différencient les variants κA et κB .

MATÉRIEL ET MÉTHODES

La caséine κA a été préparée suivant ZITTLE et CUSTER (1963) à partir du lait d'une vache de race Française Frisonne Pie-Noire, homozygote pour le complexe génique $\alpha_{s1}\text{-Cn}^B - \beta\text{-Cn}^A - \kappa\text{-Cn}^A$

La fraction dépourvue de glucides, κA_1 , a été obtenue par chromatographie de la caséine κA sur DEAE-cellulose en milieu urée et β -mercaptoéthanol (MERCIER *et al.*, 1968). Son homogénéité a été vérifiée par électrophorèse en gel d'amidon selon SCHMIDT (1964).

Les autres techniques utilisées dans ce travail ont toutes été décrites dans nos publications antérieures : électrophorèse et chromatographie sur papier, chromatographie sur colonne de résine Dowex, dosage des acides aminés, dosage du phosphore : GROSCLAUDE *et al.* (1970) ; hydrolyse par la leucine aminopeptidase, par la carboxypeptidase A et par la pepsine, dégradation soustractive d'Edman : MERCIER *et al.* (1970 a) ; hydrolyse par le bromure de cyanogène : MERCIER *et al.* (1970 b) ; hydrolyse acide ménagée, utilisation de la phosphatase alcaline : MERCIER *et al.* (1971) ; hydrolyse par la thermolysine : RIBADEAU-DUMAS *et al.* (1971) ; utilisation de l'aminopeptidase M : RIBADEAU-DUMAS *et al.* (1972).

L'origine des enzymes et produits utilisés a été donnée par MERCIER *et al.* (1972).

La nomenclature des peptides résultant de l'hydrolyse d'un peptide plus long fait intervenir, dans l'ordre, trois éléments : a) la dénomination du peptide de départ, b) les initiales du nom de l'enzyme ou du réactif ayant servi à l'hydrolyse (Th = thermolysine ; CN = bromure de cyanogène), c) un numéro d'ordre, attribué en fonction du résultat de l'opération de fractionnement effectuée. Le numérotage des peptides se fait dans l'ordre d'éluion pour une chromatographie préparative sur colonne, de l'anode vers la cathode pour une électrophorèse préparative sur papier, et dans le sens des mobilités croissantes pour une chromatographie préparative sur papier. Par ailleurs l'appellation d'un peptide comporte, si besoin est, le nom du variant génétique ayant servi à le préparer.

RÉSULTATS

Comme pour l'étude de la séquence du caséinomacropéptide de la caséine κB (MERCIER *et al.*, 1972), nous n'avons pas opéré sur le caséinomacropéptide lui-même mais sur le peptide $\kappa A_1\text{CN}_2$, l'un des 3 peptides résultant de l'hydrolyse de la ca-

TABLEAU I

<i>Peptide αA_1CN2</i>	
Composition en acides aminés	<i>Asx</i> , 5,01(5) ; <i>Thr</i> , 11,50(12) ; Ser, 5,77(6) ; Glx, 10,21(10) ; Pro, 7,64(8) ; Gly, 1,03(1) ; <i>Ala</i> , 4,85(5) ; Val, 5,95(6) ; <i>Ile</i> , 5,61(6) ; Leu, 1,04(1) ; Lys, 2,80(3) ; P, 0,97(1).
Composition de αB_1CN2 peptide homologue de αB_1 (MERCIER <i>et al.</i> , 1972)	<i>Asx</i> , 3,93(4) ; <i>Thr</i> , 10,62(11) ; Ser, 5,75(6) ; Glx, 10,04(10) ; Pro, 8,16(8) ; Gly, 1,07(1) ; <i>Ala</i> , 6,03(6) ; Val, 5,83(6) ; <i>Ile</i> , 6,60(7) ; Leu, 0,97(1) ; Lys, 2,87(3) ; P (1).
<i>Peptide $\alpha A_1CN2Th1$</i>	
Composition en acides aminés	<i>Asx</i> , 1,75(2) ; Thr, 1,09(1) ; Ser, 1,61(2) ; Glx, 4,06(4) ; Pro, 3,03(3) ; Val, 1,00(1) ; <i>Ile</i> , 1,52(2) ; Leu, 1,00(1) ; P*.
Composition de $\alpha B_1CN2Th1$ peptide homologue de αB_1 (MERCIER <i>et al.</i> , 1972)	<i>Asx</i> , 0,96(1) ; Thr, 1,01(1) ; Ser, 1,80(2) ; Glx, 4,02(4) ; Pro, 2,94(3) ; <i>Ala</i> , 1,00(1) ; Val, 0,73(1) ; <i>Ile</i> , 1,62(2) ; Leu, 1,01(1).
<i>Peptide $\alpha A_1CN2Th1a$</i>	
Composition en acides aminés	<i>Asx</i> , 1,00(1) ; Ser, 0,95(4) ; Glx, 2,08(2) ; Pro, 0,86(1) ; Leu, 0,77(1) ; P*.
Séquence	Leu - Glu - Asp - SerP - Pro - Glu
Edman après déphosphorylation	
Stade 1	<i>Asx</i> , 0,89(1) ; Ser, 1,00(1) ; Glx, 2,10(2) ; Pro, 1,28(1) ; <i>Leu</i> , 0,23(0).
Stade 2	<i>Asx</i> , 0,84(1) ; Ser, 1,00(1) ; <i>Glx</i> , 1,55(1) ; Pro, 1,26(1).
Stade 3	<i>Asx</i> , 0,37(0) ; Ser, 1,00(1) ; Glx, 1,38(1) ; Pro, 1,12(1).
Stade 4	<i>Asx</i> , 0,28(0) ; Ser, 0,42(0) ; Glx, 1,30(1) ; Pro, 0,97(1).
Stade 5	<i>Asx</i> , 0,27(0) ; Ser, 0,40(0) ; Glx, 1,30(1) ; Pro, 0,70(0-1).
<i>Peptide $\alpha A_1CN2Th1b$</i>	
Composition en acides aminés	<i>Asx</i> , 0,94(1) ; Thr, 0,94(1) ; Ser, 1,09(1) ; Glx, 2,29(2) ; Pro, 2,29(2) ; Val, 0,90(1) ; <i>Ile</i> , 1,52(2).
<i>Peptide $\alpha A_1CN2Th2$</i>	
Composition en acides aminés	<i>Thr</i> , 4,46(5) ; Ser, 2,58(3) ; Glx, 3,02(3) ; Pro, 2,02(2) ; Gly, 0,91(1) ; <i>Ala</i> , 1,87(2) ; Val, 1,00(1) ; <i>Ile</i> , 1,07(1).
Composition de la séquence homologue de αB_1 (MERCIER <i>et al.</i> , 1972)	<i>Thr</i> ₄ , Ser ₃ , Glx ₃ , Pro ₂ , Gly, Ala ₂ , Val, <i>Ile</i> ₂ .
<i>Peptide $\alpha A_1CN2Th2P1$</i>	
Composition en acides aminés	Thr, 3,29(4) ; Ser, 1,58(2) ; Glx, 1,85(2) ; Pro, 1,85(2) ; Gly, 0,99(1) ; <i>Ala</i> , 1,03(1) ; <i>Ile</i> , 0,76(1).
Carboxypeptidase A**	(5 μ l ; 1 h) Glu, 0,32 ; Thr, 0,19.
<i>Peptide $\alpha A_1CN2Th3$</i>	
Composition en acides aminés	<i>Thr</i> , 4,12(4) ; Ser, 2,01(2) ; Glx, 2,35(2) ; Pro, 1,87(2) ; Gly, 0,90(1) ; <i>Ala</i> , 1,66(2) ; <i>Ile</i> , 1,00(1).
Composition de la séquence homologue de αB_1 (MERCIER <i>et al.</i> , 1972)	<i>Thr</i> ₃ , Ser ₂ , Glx ₂ , Pro ₂ , Gly, Ala ₂ , <i>Ile</i> ₂ .
Leucine aminopeptidase	(2 μ l ; 15 h) <i>Ile</i> , 0,80 ; <i>Ala</i> , 0,54.
Carboxypeptidase A**	(2 μ l, 15 h) Thr, 0,45 ; Glu, 0,28 ; <i>Ala</i> , 0,28.

* Mis en évidence par électrophorèse sur papier, sous la forme de phosphosérine, après hydrolyse acide ménagée.

** μ l de solution commerciale/0,1 μ mole de peptide.

séine αA_1 par le bromure de cyanogène et qui correspond au caséinomacropéptide amputé de son résidu méthionyle NH_2 -terminal. Ce peptide a été préparé comme son homologue αB_1CN_2 (MERCIER *et al.*, 1972). La confrontation de la composition en acides aminés de αA_1CN_2 avec celle de αB_1CN_2 (tabl. 1) confirme les conclusions de DE KONING *et al.* (1966) et HILL *et al.* (1970) : par rapport à αB_1CN_2 , αA_1CN_2 possède un résidu alanyle et un résidu isoleucyle en moins, un résidu thréonyle et un résidu aspartyle ou asparaginyle en plus.

Pour localiser ces substitutions, le peptide αA_1CN_2 a été hydrolysé par la thermolysine (11 μ Moles ; E/S : 1/200 ; 40°C ; 1 heure) et l'hydrolysate ainsi obtenu chromatographié sur colonne de Dowex 50 WX2 (MERCIER *et al.*, 1972). Les principaux résultats de cette chromatographie figurent sur le tableau 1 : la première fraction du chromatogramme nous a fourni le peptide $\alpha A_1CN_2Th_1$ dont la composition en acides aminés est, à une substitution Ala/Asx près, identique à celle du peptide $\alpha B_1CN_2Th_1$. La seconde fraction nous a fourni le peptide $\alpha A_1CN_2Th_2$ dont la composition, obtenue après repurification par électrophorèse sur papier, correspond, à une substitution Ile/Thr près, à la somme des compositions des peptides $\alpha B_1CN_2Th_2$ et $\alpha B_1CN_2Th_3$. La troisième fraction nous a fourni le peptide $\alpha A_1CN_2Th_3$ dont la composition correspond, à une substitution Ile/Thr près, à la somme des compositions des peptides $\alpha B_1CN_2Th_2$ et $\alpha B_1CN_2Th_8$. La figure 1 montre l'emplacement de ces trois peptides

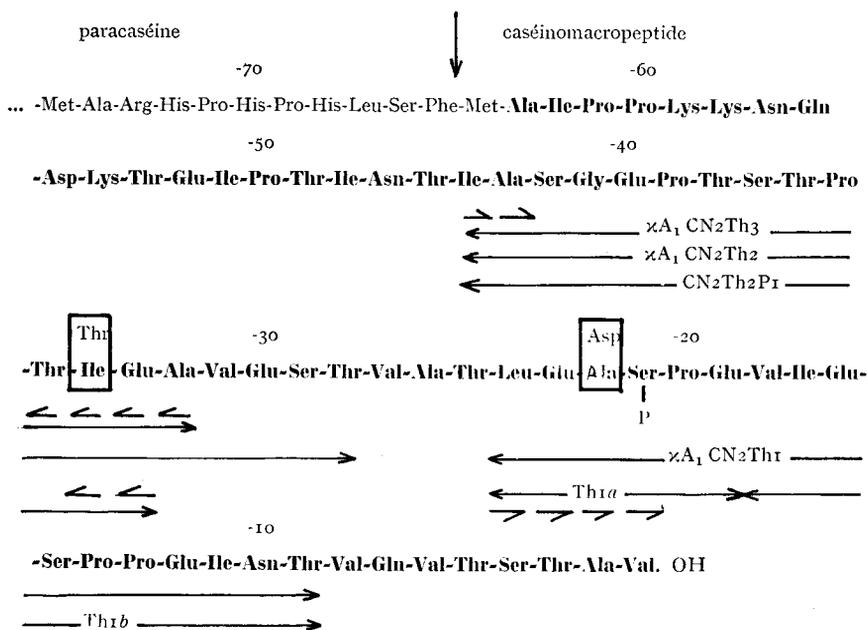


FIG. 1. — Localisation dans le caséinomacropéptide des substitutions d'acides aminés différenciant les variants génétiques de la caséine α bovine (αA et αB).

La séquence de référence est celle du variant αB_1 (MERCIER *et al.*, 1972)

Les résidus sont numérotés négativement à partir de l'extrémité $COOH$ -terminale du caséinomacropéptide, qui est aussi celle de la caséine α . La séquence du peptide αA_1CN_2 est imprimée en caractères gras. Les deux substitutions mises en évidence et localisées sont encadrées.

←→, peptides ayant servi à localiser ces substitutions ; →, acide aminé libéré par la leucine aminopeptidase ; ←, acide aminé libéré par la carboxypeptidase A ; →, acide aminé identifié par la technique soustractive d'Edman ; ↓ liaison dont l'hydrolyse par la présure libère le caséinomacropéptide.

dans la séquence du peptide CN₂ (ou du caséinomacropéptide). A noter que les autres fractions du chromatogramme nous ont fourni, avec des compositions identiques à celles de leurs homologues du variant α B₁, les peptides correspondant au reste de la séquence de α A₁CN₂.

D'autre part, une répétition de cette manipulation effectuée dans des conditions similaires à partir de 7 μ moles de peptide α A₁CN₂, nous a permis d'isoler, à partir d'une fraction éluee juste après celle contenant α A₁CN₂ThI, les peptides α A₁CN₂ThIa et α A₁CN₂ThIb, purifiés par chromatographie sur papier, lesquels ne peuvent provenir que de l'hydrolyse partielle du peptide α A₁CN₂ThI (tabl. I et fig. I).

L'ensemble de ces résultats suggérait que α B₁CN₂ et α A₁CN₂ différaient d'une part par une substitution Ile \rightarrow Thr affectant l'élément de séquence représenté par le peptide α A₁CN₂Th₃ et d'autre part par une substitution Ala \rightarrow Asx affectant l'élément de séquence représenté par le peptide α A₁CN₂ThIa. L'identification exacte et la localisation de ces substitutions sont prouvées par les résultats suivants :

A. — Peptides α A₁CN₂Th₃ et α A₁CN₂Th₂P₁

L'action de la leucine aminopeptidase montre que le seul résidu isoleucyle que contient le peptide α A₁CN₂Th₃ est situé en position NH₂-terminale ; par contre, l'action de la carboxypeptidase A ne donne pas de résultats concluants.

Le peptide α A₁CN₂Th₂ a alors été hydrolysé par la pepsine (3 μ moles ; E/S : 1/50, température ambiante ; 24 heures), et l'hydrolysât ainsi obtenu chromatographié sur colonne de Sephadex, en milieu acide acétique 30 vol. p. 100. La première fraction du chromatogramme nous a fourni le peptide α A₁CN₂Th₂P₁, qui correspond au peptide α A₁CN₂Th₃ amputé d'un résidu alanyl, résidu qui est, on le voit, en position COOH-terminale dans ce dernier peptide. L'action de la carboxypeptidase A sur le peptide α A₁CN₂Th₂P₁ montre que la séquence COOH-terminale de ce dernier est Thr-Glu OH. Autrement dit, la 34^e position à partir de l'extrémité COOH-terminale du caséinomacropéptide (tabl. I) est occupée, dans le variant A, par un résidu thréonyle, et non plus, comme dans le variant B, par un résidu isoleucyle.

B. — Peptide α A₁CN₂ThIa

Les résultats des dégradations soustractives d'Edman montrent que le résidu qui précède le résidu phosphoséryle est un résidu aspartyle ou asparaginyle alors que dans le variant α B₁, la position correspondante (22^e à partir de l'extrémité COOH-terminale) est occupée par un résidu alanyl. Nous avons vérifié par électrophorèse sur papier que l'action de l'aminopeptidase M libérait de l'acide aspartique, et non de l'asparagine.

CONCLUSION ET DISCUSSION

Le variant A de la caséine α bovine diffère donc du variant B par deux substitutions d'acides aminés, une substitution Ala \rightarrow Asp et une substitution Ile \rightarrow Thr, ce qui confirme et précise les résultats de WOYCHIK *et al.* (1966), DE KONING *et al.* (1966) et HILL *et al.* (1970). Ces substitutions affectent respectivement la 22^e et la 34^e posi-

tion de la chaîne polypeptidique de la caséine α à partir de son extrémité COOH-terminale. Chacune d'elles peut, selon le code génétique, ne dériver que de la mutation d'une seule paire de nucléotides ($GC_C^C \rightarrow GA_C^C$ pour Ala \rightarrow Asp ; $AU_C^C \rightarrow AC_C^C$ pour Ile \rightarrow Thr). La substitution Ile \rightarrow Thr mettant en jeu des résidus neutres, c'est la seule substitution Ala \rightarrow Asp qui est responsable de la différence de mobilité électrophorétique des deux variants A et B à pH alcalin. C'est donc elle, en fait, qui assure le marquage du locus α -Cn et, plus précisément, de l'extrémité terminale de ce locus.

Reçu pour publication en mai 1972.

SUMMARY

LOCALIZATION OF AMINO-ACID SUBSTITUTIONS DIFFERENTIATING THE A AND B VARIANTS OF α -CASEIN IN CATTLE

As was suggested by the results of WOYCHIK *et al.* (1966), DE KONING *et al.* (1966) and HILL *et al.* (1970) the caseinomacropeptides from the A and B variants of bovine α -casein differ by two amino-acid substitutions : Ala (α B) \rightarrow Asp (α A) and Ile (α B) \rightarrow Thr (α A).

These substitutions affect the 22 nd and 34 nd positions, respectively, from the COOH-terminus of the caseinomacropeptide, which is also the COOH-terminus of α -casein.

From a genetical point of view, the two variants of α -casein ensure the marking of the terminal part of α -casein locus.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ASCHAFFENBURG R., 1968. Genetic variants of milk proteins; their breed distribution. *J. Dairy Res.*, **35**, 447-460.
- DE KONING P. J., VAN ROOIJEN P. J., KOK A., 1966. Location of amino acid differences in the Genetic Variants of α -Casein A and B. *Biochem. Res. Commun.*, **24**, 616-621.
- GROSCLAUDE F., GARNIER J., RIBADEAU-DUMAS B., JEUNET R., 1964. Étroite dépendance des loci contrôlant le polymorphisme des caséines α_s et β . *C. R. Hebd. Séances Acad. Sci. (Paris)*, **259**, 1569-1571.
- GROSCLAUDE F., MAHÉ M.-F., MERCIER J.-C., RIBADEAU-DUMAS B., 1972. Caractérisation des variants génétiques des caséines α_{s1} et β bovines. *Eur. J. Biochem.*, **28**, 328-337.
- GROSCLAUDE F., MERCIER J.-C., RIBADEAU-DUMAS B., 1969. Sur la localisation, dans la séquence COOH-terminale de la caséine α_{s1} bovine, de la substitution GLU/GLY différenciant les variants génétiques B et C. *C. R. Hebd. Séances Acad. Sci. (Paris)*, **268**, 3133-3136.
- GROSCLAUDE F., MERCIER J.-C., RIBADEAU-DUMAS B., 1970. Structure primaire de la caséine α_{s1} bovine. Localisation des peptides tryptiques dans les fragments obtenus par hydrolyse tryptique de la caséine maléylée. *Eur. J. Biochem.*, **14**, 98-107.
- GROSCLAUDE F., PUJOLLE J., GARNIER J., RIBADEAU-DUMAS B., 1965. Déterminisme génétique des caséines α du lait de vache ; étroite liaison du locus α -Cn avec les loci α_s -Cn et β -Cn. *C. R. Hebd. Séances Acad. Sci. Paris*, **261**, 5229-5232.
- GROSCLAUDE F., PUJOLLE J., RIBADEAU-DUMAS B., GARNIER J., 1966. Analyse génétique du groupe de loci de structure synthétisant les caséines bovines ; in : *Polymorphismes biochimiques des animaux*, 415-420. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris.
- HILL R. J., NAUGHTON M. A., WAKE R. G., 1970. The major genetic variant macropeptides of α -casein. A comparison of their amino-acid contents and tryptic peptides. *Biochem. Biophys. Acta*, **200**, 267-274.
- KING J. W. B., ASCHAFFENBURG R., KIDDY C. A., THOMPSON M. P., 1965. Non-independent occurrence of α_{s1} and β -casein variants of cow's milk. *Nature*, **206**, 324-325.
- LARSEN B., THYMANN M., 1966. Studies on milk protein polymorphism in Danish cattle and the interaction of the controlling genes. *Acta vet. Scand.*, **7**, 189-205.

- MERCIER J.-C., GROSCLAUDE F., RIBADEAU-DUMAS B., 1970 a. Structure primaire de la caséine α_{s1} bovine. Séquence de 48 résidus d'acides aminés de l'extrémité COOH-terminale. *Eur. J. Biochem.*, **14**, 108-119.
- MERCIER J.-C., GROSCLAUDE F., RIBADEAU-DUMAS B., 1970 b. Structure primaire de la caséine α_{s1} bovine. Enchaînement des peptides obtenus par action du bromure de cyanogène et des peptides résultant de l'hydrolyse de la caséine α_{s1} maléylée. *Eur. J. Biochem.*, **16**, 439-446.
- MERCIER J.-C., GROSCLAUDE F., RIBADEAU-DUMAS B., 1971. Structure primaire de la caséine α_{s1} bovine. Séquence complète. *Eur. J. Biochem.*, **23**, 41-51.
- MERCIER J.-C., MAUBOIS J. L., POZNANSKI S., RIBADEAU-DUMAS B., 1968. Fractionnement préparatif des caséines de vache et de brebis par chromatographie sur DEAE cellulose, en milieu urée et 2-mercaptoéthanol. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **50**, 521-530.
- MERCIER J.-C., URO J., RIBADEAU-DUMAS B., GROSCLAUDE F., 1972. Structure primaire du caséinomacropéptide de la caséine α B₁ bovine. *Eur. J. Biochem.*, **27**, 535-547.
- RIBADEAU-DUMAS B., BRIGNON G., GROSCLAUDE F., MERCIER J.-C., 1972. Structure primaire de la caséine β bovine. Séquence complète. *Eur. J. Biochem.*, **25**, 505-514.
- RIBADEAU-DUMAS B., GROSCLAUDE F., MERCIER J.-C., 1971. Structure primaire de la caséine β bovine. Enchaînement des peptides trypsiques et des peptides obtenus par action du bromure de cyanogène. *Eur. J. Biochem.*, **18**, 252-257.
- SCHMIDT D. G., 1964. Starch-gel electrophoresis of α -casein. *Biochim. Biophys. Acta.*, **90**, 411-414.
- THOMPSON M. P., 1970. Phenotyping milk proteins : a review. *J. Dairy Sci.*, **53**, 1341-1348.
- WOYCHIK J. H., KALAN E. B., NOELKEN M. E., 1966. Chromatographic isolation and partial characterisation of reduced α -casein components. *Biochemistry*, **5**, 2276-2282.
- ZITTLE C. A., CUSTER J. H., 1963. Purification and some of the properties of α_s -casein and α -casein. *J. Dairy Sci.*, **46**, 1183-1188.