

ETUDE COMPARATIVE DES CASEINES CAMELINES (*CAMELUS DROMEDARIUS*) ET BOVINES

Reçu le 29/09/2007 – Accepté le 25/10/2008

Résumé

Une étude comparative a été réalisée entre les caséines du lait de dromadaire et celles du lait de vache. L'ensemble des caséines ont été séparées par chromatographie liquide rapide d'échange d'ions (FPLC) et analysées par électrophorèse en milieu SDS. Avant la détermination des séquences N-terminales, les différentes fractions caséiques issues de l'échangeur d'ions ont été purifiées par RP-HPLC. Les profils chromatographiques et électrophorétiques des caséines des deux espèces laitières s'avèrent très différents. Le lait de dromadaire renferme principalement les caséines α_{S1} et β , dont les séquences N-terminales ont été déterminées et une teneur très faible en κ caséine. Aucune protéine homologue à la caséine α_{S2} n'a été détectée. La méthode utilisée a permis la séparation des variants génétiques de la caséine α_{S1} .

Mots clés : Lait de dromadaire, caséines, FPLC, HPLC, électrophorèse, séquence N-terminale.

Abstract

A comparative study between dromedary and cow caseins was realized. Whole caseins were separated by fast protein liquid chromatography (FPLC) and identified by SDS-PAGE. Before N-Terminal sequence analysis, the different fractions issued from FPLC have been further purified by RP-HPLC. Elution profiles and electrophoretic mobilities of whole caseins obtained from the two species of milk were very different. Dromedary milk contains dominantly α_{S1} and β -casein and small amounts of κ -casein. α_{S2} has not been identified. This method has permitted the separation of α_{S1} -casein variants.

Keywords: Dromedary milk, caseins, FPLC, HPLC, electrophoresis, N-Terminal sequence.

N.CHAOUI-KHEROUATOU¹
H. ATTIA²

¹ Département de Biologie et
Physiologie Animales,
Université Mentouri
Constantine, route Aïn-El-Bey,
25000, Constantine, Algérie.

² Ecole Nationale
d'Ingénieurs de Sfax, B.P.W,
3038 Sfax, Tunisie.

ملخص

أجريت دراسة مقارنة بين كازينات حليب الناقة و كازينات حليب البقر. مجموع الكازينات تم فصلها بطريقة الكروماتوغرافية التبادل الأيوني (FPLC) و حلت بواسطة الهجرة الإلكترونية (الإستشراد) في وسط SDS. قبل تحديد نهايات السلاسل N لمختلف الكازينات الناتجة عن التبادل الأيوني تم ترشيحها أولاً بتقنية RP - HPLC. لقد تبين أن النتائج الكروماتوغرافية و الالكتروفورية لكازينات نوعي الحليب المدروسين كانا جد مختلفين. كما أنه اتضح أن حليب الناقة يحتوي على كميات كبيرة من الكازينات β و α_{S1} و على كمية ضئيلة من الكازين κ . لم يتسنى لنا تحديد الكازين α_{S2} . تقنية الكروماتوغرافية المستعملة في هذا البحث امكنت كذلك من فصل المتغيرات الوراثية للكازين α_{S1} .

الكلمات المفتاحية: حليب الناقة، كازين، FPLC، HPLC، إستشراد، نهاية السلسلة N.

Contrairement à la plupart des laits issus des mammifères domestiques, le lait de dromadaire n'est pas transformé de manière traditionnelle en fromages, mais consommé uniquement sous forme liquide à l'état frais ou après acidification naturelle.

Cette situation qui entraîne une sous exploitation du potentiel laitier camelin due principalement à l'inaptitude de ce lait à la transformation enzymatique a poussé certains chercheurs à étudier et à bien définir les caséines camelines. Pour ce faire, plusieurs techniques chromatographiques et électrophorétiques ont été mises au point.

En effet, comparé au lait bovin, les caséines du lait de dromadaire montrent une faible teneur en κ caséine et une proportion plus importante en β caséine [1], des mobilités électrophorétiques très différentes [1, 2, 3, 4], une composition en acides aminés partiellement similaire [3, 4], des structures primaires et secondaires plus ou moins différentes avec un degré de phosphorylation moins important et un site de clivage de la κ caséine par la chymosine au niveau de la liaison Phe⁹⁷-Ile⁹⁸ au lieu de la liaison Phe¹⁰⁵-Met¹⁰⁶ dans le cas du lait bovin [1].

Pour mieux se rapprocher de tous ces travaux et pour pouvoir caractériser nos échantillons de caséines, nous avons essayé de les séparer par chromatographie échangeuse d'anions, de les purifier par HPLC en phase inverse puis de les comparer à leur homologues bovines du point de vue structurale afin de pouvoir ressortir les différences qui peuvent exister entre elles et mieux comprendre les obstacles de transformations technologiques¹ que nous avons rencontré lors de nos études de la coagulation de ce lait par différentes voies: acide, biologique ou enzymatique [5, 6].

MATERIELS ET METHODES

Le Lait

Le lait de dromadaire est un lait de grand mélange obtenu à partir d'un troupeau de 18 animaux (*Camelus dromedarius*) appartenant à l'institut des régions arides (I.R.A., Médenine, Tunisie). L'écémage de ce lait a été effectué comme indiqué par Attia et al. [7].

Préparation de la caséine entière

L'ensemble des caséines est obtenu après leur précipitation au point isoélectrique (pH 4,6) par ajout goutte à goutte de l'acide chlorhydrique 1 N. Le culot est lavé avec l'eau distillée, solubilisé au pH 7,00 par addition de l'hydroxyde de sodium, reprécipité au pH 4,6 puis lavé 3 fois avec l'eau distillée. Finalement, le pH de l'ensemble des caséines a été ajusté à 7,00, les échantillons ont été de suite lyophilisés puis gardé à -20 °C [8].

Un mélange de caséines bovines standards (Sigma Chemical Co., MO, USA) a été utilisé pour permettre une étude comparative.

Fractionnement des caséines par F.P.L.C. (Fast Protein Liquid Chromatography)

Le système chromatographique FPLC (Pharmacia, Uppsala, Suède) est composé d'un système de contrôle LCC-500, de 2 pompes P500, d'un détecteur UV muni d'un filtre pour la mesure à 280 nm et d'un passeur d'échantillon MV-7.

Les tampons étaient préparés avec de l'eau désionisée traitée sur un système de filtration Milli Q 23004 (Millipore, Bedford MA, USA), filtrés à travers un filtre stérile Durapore GVWP 04700 de 0,22 μ m de diamètre de pores (Millipore, Bedford MA, USA), puis dégazés à l'hélium.

Avant l'analyse 8 mg de caséines camelines sont dissoutes dans un tampon : tris HCl 5×10^{-3} M, pH 8,00, dithiothréitol 8×10^{-4} , urée 4,5 M, homogénéisés pendant 15 min en maintenant la température à 40 °C. L'échantillon est ensuite filtré sur un filtre hydrophilique de 0,45 μ m de diamètre de pores (Millipore, Bedford MA, USA).

La séparation a été conduite sur une colonne échangeuse d'anions Mono Q HR5/5 (120 \times 19 mm L/ ϕ , Pharmacia, Uppsala, Suède), en appliquant un gradient linéaire de sel du tampon A (tris HCl 5×10^{-3} M, pH 8,00, dithiothréitol $6,4 \times 10^{-5}$, urée 4,5 M) au tampon B (tampon A + 0,35 M NaCl), à température ambiante et un débit de 0,5 ml/min. Le même protocole expérimental a été adopté pour les caséines bovines standard [8].

Les proportions des pics obtenus par séparations chromatographiques ont été calculées en rapportant l'aire de chaque pic à l'aire totale du profil chromatographique. Le temps de rétention ainsi que le volume d'élution de chaque pic ont été également déterminés.

Pour juger la répétabilité de l'analyse sur FPLC, 3 essais consécutifs ont été réalisés par injection d'un volume de 1 ml du mélange caséique.

Détermination de la teneur en protéines des fractions collectées

La quantification des différentes fractions caséiniques a été effectuée par la méthode de Lowry et al. [9].

Electrophorèse Les fractions caséiques collectées à partir des séparations par FPLC ont été analysées par électrophorèse en milieu SDS suivant la méthode de Laemmli [10].

L'électrophorèse a été réalisée dans une cuve verticale mini Slab gel apparatus Protean II (Biorad Laboratories, Californie, U.S.A) selon les conditions opératoires suivantes : Gel de concentration : 4 % d'acrylamide, gel de séparation (8,0 \times 6,0 \times 0,075 cm) :

15 % d'acrylamide, voltage : 90 mV, ampérage 20mA, durée : 3 heures.

Purification des fractions caséiniques par RP-HPLC (Reversed –phase high performance liquid chromatography)

Les différentes fractions issues de la chromatographie par échange d'ions ont été purifiées par RP-HPLC selon la procédure de Ochirkhuyag et al. [4] légèrement modifiée par nous-mêmes comme suit :

La séparation a été conduite sur un appareil Shimadzu classe Vp 10A (Shimadzu Co., Tokyo, Japan) en utilisant une colonne analytique phase inverse C18 Vydac (7µm, 4,6 mm × 250 mm, Technochroma S.Coop C. Ltd., USA). La colonne a été équilibrée avec le solvant A (0,1 % TFA dans H₂O, pH 2,5).

L'élution des caséines a été effectuée par application d'un gradient linéaire de 60 % A / 40 % B (80 % acétonitrile, 20 % H₂O, 0,085 % TFA) à 30 % A / 70 % B durant 90 min selon la programmation suivante :

- 40 % B	→	70 % B pendant 70 min
- 70 % B	→	70 % B pendant 10 min
- 70 % B	→	40 % pendant 10 min

Température : 25 °C ; Débit : 0,8 ml/min ; Pression maximale : 180 bar ; Absorbance : 214 nm.

SDS PAGE et Electroblothing des caséines en vue du séquençage N- terminal

Les protéines caséiniques du lait de dromadaire ont été séparées préalablement par électrophorèse en milieu SDS. Les gels obtenus subissent immédiatement un electroblotting des protéines sur membrane PVDF (Pharmacia Amersham Biotech AB, Uppsala, Sweden) dans un appareil de transfert type Apelex.

Les conditions de transfert ont été adaptées comme décrit par Towbin et al. [11] Voir : tampon d'electroblotting : tampon CAPS ; voltage : 50 V, ampérage : 150 mA ; durée : 1h 45 min. La détection des protéines a été réalisée par coloration au bleu de coomassie 0,1 %, décoloration au méthanol / eau (v/v) puis lavage abondant à l'eau bidistillée.

Les membranes ont été séchées quelques minutes à l'air libre puis toutes les bandes électrophorétiques correspondant aux caséines camélines ont été découpées à la lame de scalpel et stockées à -20 °C dans des tubes eppendorf stériles.

Séquençage N-terminal

Les extrémités NH₂-terminales ont été déterminées par la méthode d'Edman automatisée [12, 13] sur un microséquenceur de protéines type applied Biosystems 470 HT précise équipé d'un système HPLC phase inverse 140C.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

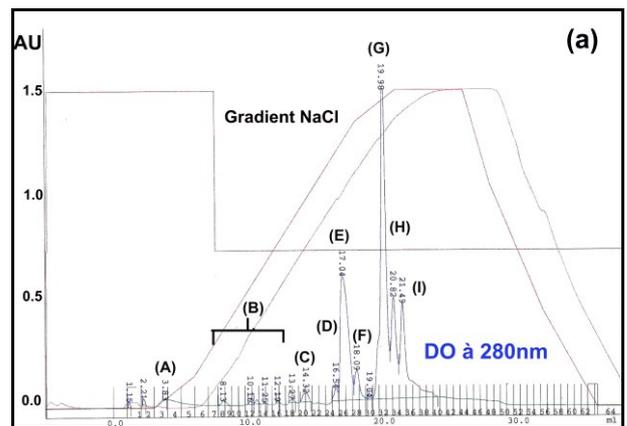
Fractionnement des caséines par FPLC

La séparation de l'ensemble des caséines bovines et camélines sur colonne échangeuse d'anions (Mono Q HR 5/5) a donné des profils d'élutions très différents. Ceci suggère une différence de structure et de composition entre les protéines caséiniques des deux espèces laitières (Fig1 a et b).

Les profils chromatographiques ainsi obtenus ont permis la séparation complète des caséines dans environ 50 min. Si l'on compare le profil chromatographique bovin obtenu (Fig.1b) avec ceux rapportés en bibliographie [8, 14], on s'aperçoit qu'ils sont similaires, présentant l'élution successive, des caséines κ, β et α. Cependant, il faut noter que la résolution de cette dernière caséine n'a pas été satisfaisante.

Contrairement aux caséines bovines qui sont éluées en trois pics majoritaires, les caséines du lait de dromadaire sont éluées en cinq pics majoritaires (E, F, G, H et I) (Fig.1a) respectivement à 0,29 ; 0,315 ; 0,337 et 0,35 mol/L NaCl pour les deux derniers pics.

Les proportions relatives des pics issus de la séparation chromatographique ont été obtenues en rapportant l'aire de chaque pic à l'aire totale du profil chromatographique et ont été : de 26,80 % caséine β, 59,35 % caséine α et 6,80 % caséine κ pour le lait de vache et de 23 % E, 3,5 % F, 42,17 % G, 11,7 % H et 14,33 % I pour le lait de dromadaire.



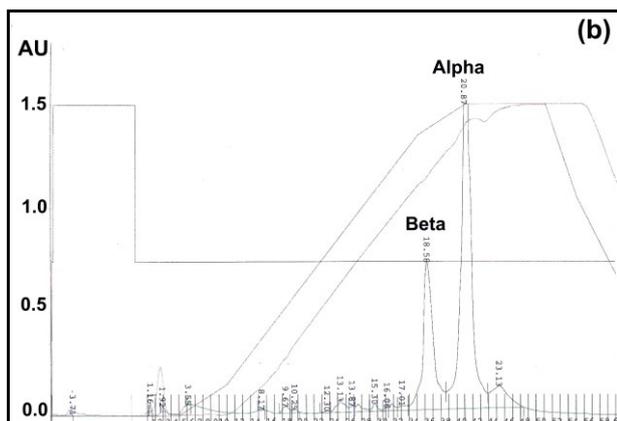


Figure 1 : Chromatographie échangeuse d'anions sur colonne mono Q des caséines camelines (a) et bovines (b).

Analyse quantitative des fractions issues de l’FPLC

La quantification des différentes fractions caséiques ne peut se faire directement à partir de la surface de chacun des pics du fait, d’une part, des différences d’absorption à 280 nm de ces protéines et d’autre part, de la non disponibilité des protéines camelines standards. Nous avons donc essayé de les doser par la méthode pratique de Lowry *et al.* [9]. Les résultats sont reproduits sur le Tableau 1.

Tableau 1 : Teneurs en protéines des fractions collectées à partir de la chromatographie échangeuse d’anions dosées par la méthode de Lowry *et al.* [9].

Fraction	mg Protéine/fraction	Total %
A	0,083	1,037
B	0	0
C	0	0
D	0,0177	0,22
E	1,586	19,82
F	0,673	8,41
G	1,646	20,57
H	2,416	30,2
I	1,186	14,82
Total	7,6	95,077

Analyse de la fiabilité de la méthode de séparation

Il est bien connu que la fidélité d’une méthode de séparation est définie par deux critères [15], la répétabilité qui a été testée en comparant les résultats obtenus par une série d’injections successives du même échantillon et la reproductibilité qui a été déterminée sur des séries d’expériences. Les résultats sont donnés sur les tableaux 2 et 3.

Tableau 2 : Volumes d’élution et temps de rétention des fractions majoritaires camelines collectées à partir de la chromatographie échangeuse d’anions

Fractions camelines	E	G	H	I
Volume d’élution (ml)	16,87	19,82	20,69	21,39
	17,02	19,87	20,70	21,39
	17,04	19,98	20,82	21,49
Moyenne (ml)	16,97	19,89	20,73	21,42
SD	0,076	0,067	0,059	0,047
Temps de rétention (min)	33,94	39,78	41,47	42,84

Tableau 3 : Volumes d’élution et temps de rétention des fractions majoritaires bovines collectées à partir de la chromatographie échangeuse d’anions

Fractions bovines	κ	β	α
Volume d’élution (ml)	13,13	18,21	20,49
	13,20	18,58	20,87
	13,52	18,70	21,18
Moyenne (ml)	13,27	18,49	20,84
SD	0,219	0,208	0,28
Temps de rétention (min)	26,54	36,99	41,69

Les tests de reproductibilité et de répétabilité ainsi que la récupération en protéines que nous avons estimé à ~ 95 % s’avèrent satisfaisants. Ce qui justifie la fiabilité de la méthode de séparation et suggère qu’une seule expérience sera suffisante pour fractionner et quantifier les différentes protéines caséiniques.

Analyse qualitative des fractions issues de l’FPLC

L’électrophorèse en milieu SDS des différentes fractions camelines issues de la chromatographie échangeuse d’anions (Fig.2) montre que la migration de la protéine E présente une bande bien distincte de masse moléculaire de 32,76 kDa.

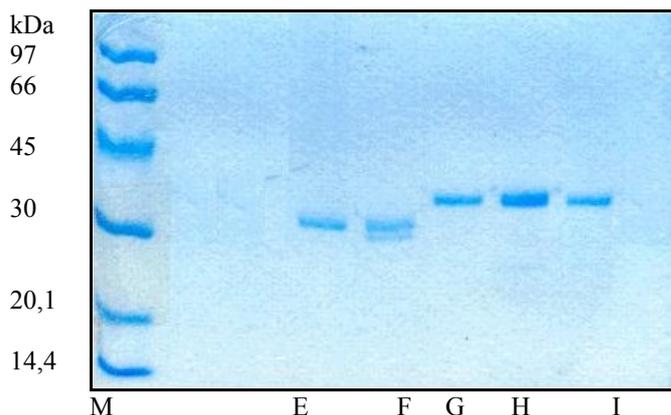


Figure 2 : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide, en présence de SDS des caséines du lait de dromadaire. M : marqueur de poids moléculaire (phosphorylase b, 97 kDa ; Albumine, 66kDa ; Ovalbumine, 45 kDa ; Carbonic anhydrase, 30 kDa ; Trypsin inhibiteur, 20,1 kDa ; α lactalbumine, 14,4 kDa) ; E, F, G, H et I : fractions issues de la chromatographie sur échangeur d'anions de la caséine entière du lait camelin.

La migration de la fraction F montre la présence de deux bandes l'une bien définie de même masse moléculaire que celle de la fraction E et l'autre diffuse de masse moléculaire égale à 30,07 kDa. Les autres fractions (G, H et I) ont donné chacune une bande distincte dont les PM sont respectivement de 37,24 kDa, 38,05 kDa et 37,88 kDa.

Les électrophorogrammes (Fig 2) des fractions issues de la chromatographie échangeuse d'ions révèlent des protéines qui sont spécifiques du lait de dromadaire. Ainsi, toutes ces fractions n'ont donné aucune bande pouvant être identifiée à une caséine du lait bovin dont les masses moléculaires sont généralement de 23,60 ; 25,25 ; 24,00 et 19,00 kDa respectivement pour l' α_{S1} , l' α_{S2} , la β et κ -caséine [16]. Par conséquent, toutes ces caséines issues du lait camelin (30,07 ; 32,76 ; 37,24 ; 37,88 et 38,05 kDa) sont spécifiques du lait de dromadaire. Ces résultats sont partiellement en accord avec ceux de Farah & Farah Reisen [2] qui n'ont isolé que deux bandes 32 et 35 kDa et en désaccord avec ceux de Ochirkhuyag *et al.* [4], qui ont révélé trois caséines de masses moléculaires estimées à 27,5 ; 35,3 et 26,3 kDa identifiées comme étant des homologues respectivement des caséines β , α_{S1} et α_{S2} du lait bovin.

Analyse par RP-HPLC des fractions issues de l'FPLC

Afin d'éliminer toutes contaminations, les fractions collectées à partir de la chromatographie échangeuse d'anions ont été séparées à nouveau, l'une après l'autre, sur la même colonne. Cependant, il fallait appliquer un débit plus faible pour pouvoir collecter que les fractions correspondantes aux sommets des pics. Afin de s'assurer du degré de pureté de ces dernières, une autre méthode de séparation a été préconisée. Il s'agit de la RP-HPLC (HPLC en phase inverse). Les chromatogrammes, des différentes fractions caséiques camelines analysées sont donnés sur la Figure 3.

Détermination des séquences N-terminales et identification des caséines

L'étude de la séquence N-terminale des différentes protéines étudiées a montré que chaque fraction analysée ne renfermait qu'une seule et unique séquence N-terminale. Ce qui justifie la pureté des protéines étudiées.

Les séquences N-terminales ainsi obtenues ont été comparées avec celles des caséines du lait bovin [17, 18] et celles du lait camelin [1]. Les résultats sont donnés dans le Tableau 4.

La région N-terminale de la fraction E paraît hautement homologue à celle de la caséine β cameline isolée par Kappeler *et al.* [1] (environ 86,66 % d'homologie). Cette homologie passe à environ 40 % si on se réfère à la caséine β bovine. Cependant, on note que toutes ses régions préservent strictement des positions en acides aminés conservatifs. La fraction E renferme donc bien la caséine β . Les fractions G, H et I, ont présenté entre eux la même

séquence N-terminale et une homologie de séquence d'environ 16 % par rapport à la caséine α_{S1} bovine et de environ 48 % par rapport à la caséine α_{S1} cameline [1]. La substitution du résidu Q à la position 20 dans la fraction G par le résidu D dans la fraction H ainsi que la substitution du résidu V à la position 23 de la fraction G par le résidu L dans la fraction I, peut suggérer la présence de variants génétiques de la caséine α_{S1} . Ceci est également confirmé par les masses moléculaires très rapprochées obtenues par SDS-PAGE pour les fractions G, H et I (Fig. 2).

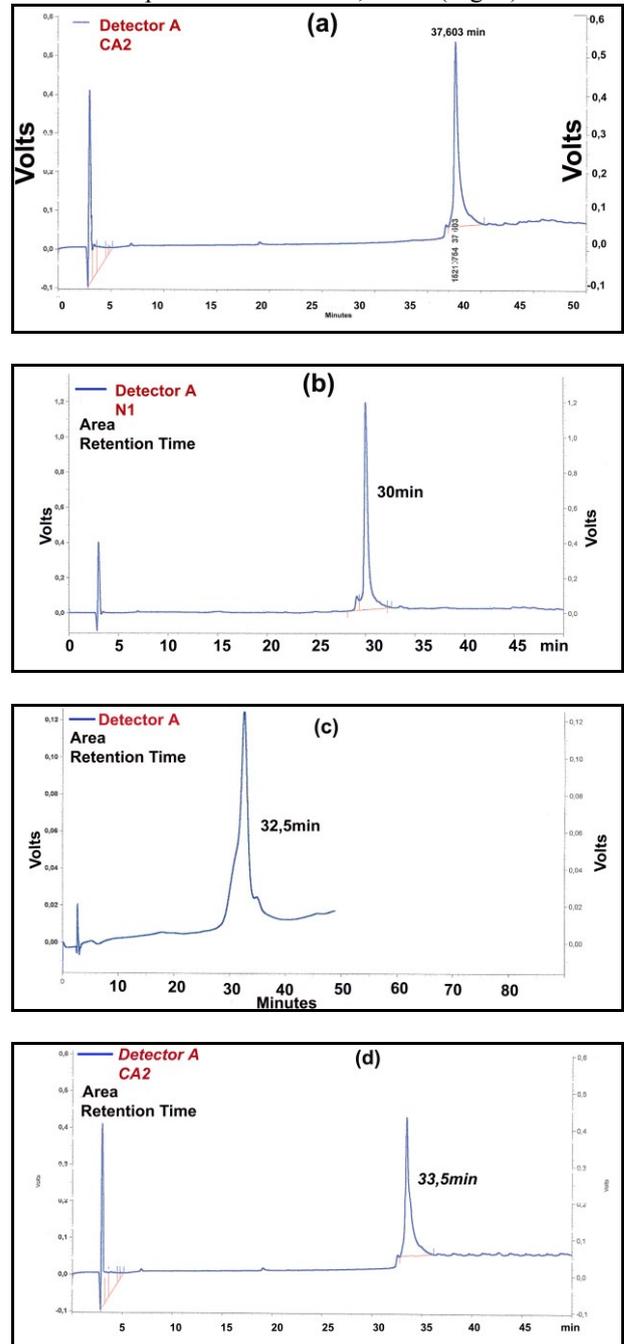


Figure 3: Analyse par HPLC en phase inverse des fractions E, G, H et I collectées à partir de la chromatographie échangeuse d'anions. (Quantité injectée : 20 μ l). (a): fraction E; (b) fraction G; (c): fraction H ; (d) :fraction I.

Tableau 4 : Séquences N-terminales des fractions caséiques camelines E, G, H et I. Comparaison avec les caséines α_{s1} et β bovines [17, 18] et cameline (*Camelus dromedarius*) [1].

Fraction	Séquence
E	R-E-K-E-E-F-K-T-A-G-E-A-L-L-L
Homologie	
β caséine bovine [18]	R-E-L-E-E-L-N-V-P-G-E-I-V-E-S
β caséine cameline [1]	R-E-K-E-E-F-K-T-A-G-E-A-L-E-S
G	R-P-K-Y-P-L-R-Y-P-E-E-F-F-Q-N-N-D-D-D-Q-I-E-V-L-L-
H	R-P-K-Y-P-L-R-Y-P-E-E-F-F-Q-N-N-D-D-D-D-I-E-V-L-L-
I	R-P-K-Y-P-L-R-Y-P-E-E-F-F-Q-N-N-D-D-D-Q-I-E-L-L-L-
Homologie	
α_{s1} caséine bovine [17]	R-P-K-H-P-I-K-H-Q-G-L-P-Q-E-V-L-N-E-N-L-L-R-F-F-V-
α_{s1} caséine cameline [1]	R-P-K-Y-P-L-R-Y-P-E-V-F-Q-N-E-P-D-S-I-E-E-V-L-N-K-

En ce qui concerne la fraction F, on a montré grâce à la migration électrophorétique et à la détermination de la séquence N-terminale que la bande supérieure est similaire à celle renfermée par la fraction E : il s'agit de la caséine β . Quant à la bande inférieure (deuxième bande de faible intensité), elle a fait l'objet d'une étude comparative avec le profil chromatographique obtenu par Larsson-Raznickiewicz & Mohamed [3] lors de la séparation des caséines camelines par chromatographie échangeuse d'anions ; et s'avère être une caséine κ . Ce qui est en désaccord avec les travaux de Alloui- Lombarkia *et al.* [19] qui n'ont obtenu aucune bande électrophorétique correspondant à cette dernière protéine.

Il faut noter qu'aucune protéine homologue à la caséine α_{s2} n'a été détectée parmi les fractions que nous avons analysées. Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer cette absence :

1- le lait issu de la race cameline de notre cheptel serait totalement dépourvu de la caséine α_{s2} dû probablement à un blocage ou une mutation du gène codant pour cette protéine, caractère spécifique de cette race. Ce qui est totalement en désaccord avec les travaux de Ochirkhuyag *et al.* [4] et Kappeler *et al.* [1] qui ont pu isoler une protéine homologue à la caséine α_{s2} bovine et ont déterminé ses caractéristiques structurales et biochimiques.

2- il existerait une quantité très faible de cette protéine qui n'a pas permis sa révélation par les moyens de séparation préconisés suite, peut-être, de la perte de cette protéine dans la phase aqueuse lors de la préparation de la caséine entière.

Ce qui est en accord avec les résultats de Wangoh *et al.* [20] qui a rapporté que l'abaissement du pH à 4,6 n'entraîne pas la précipitation de toutes les caséines camelines et qu'une proportion de ces dernières reste soluble dans le lactosérum entraînant dans ce cas une surestimation du nitrogène non caséinique (NCN) et une sous-estimation de la teneur en caséines. Ceci expliquerait le pourcentage relativement élevé en caséines solubles du lait camelin [5].

Enfin, le dosage des différentes fractions caséiques par la méthode de Lowry *et al.* [9] a montré que le lait de dromadaire renferme bien des quantités prépondérantes en caséines β et α_{s1} (Tableau 1). Ce qui est en accord avec les travaux de Larsson-Raznickiewicz & Mohamed [3] et ceux de Kappeler *et al.* [21].

CONCLUSION

Notre étude a montré que le lait de dromadaire renferme les trois des quatre caséines retrouvées dans le lait bovin, il s'agit des caséines β , κ et α_{s1} . La caséine α_{s2} est absente. Ces différentes protéines présentent beaucoup de différences du point de vue structurales comme le montre nos profils chromatographiques sur colonne échangeuse d'anions ainsi que les électrophorogrammes obtenus pour les deux espèces laitières.

Les caséines α_{s1} et β sont prédominantes dans les deux types de laits. Quant au pic correspondant à la caséine κ , il a présenté une faible absorbance et sa migration électrophorétique a fait apparaître une bande diffuse d'intensité négligeable ; ce qui suggère que le lait camelin renferme une très faible quantité en κ -caséine.

Il est à noter que cette dernière protéine joue plusieurs rôles très spéciaux ; elle représente le facteur de stabilité de la fraction colloïdale ainsi que la cible principale de la chymosine lors de la transformation enzymatique du lait. Sa faible représentation dans le lait camelin, pourrait expliquer les problèmes technologiques liés à la production de certains dérivés lactés. Il serait important, alors, de mettre au point des méthodes qui permettent de purifier la caséine κ et de connaître les propriétés dont elle est dotée.

REFERENCES

[1]- Kappeler, S., Farah, Z. & Puhon, Z. Sequence analysis of *camelus dromedarius* milk caseins. J. Dairy Res., 65, (1998), 209-222.

- [2]- Farah, Z. & Farah-Riesen, M. Separation and characterization of major components of camel milk casein. *Milchwissenschaft*, **40**, (1985), 669-671.
- [3]- Larsson-Raznikiewicz, M. & Mohamed, M.A. Analysis of the casein content in camel (*camelus dromedarius*) milks. *Swed. J. Agric. Res.*, **16**, (1986), 13-18.
- [4]- Ochirkhuyag, B., Chobert, J.M., Dalgalarrrondo, M., Choiset, Y. & Haertlé, T. Characterization of caseins from Mongolian Yak, khainak and bactrian camel. *Lait*, **77**, (1997), 601-613.
- [5]- Attia, H., Kherouatou, N., Nasri, M. & Khorchani, T. Characterization of the dromedary milk casein micelle and study of its changes during acidification. *Lait*, **80**, (2000a), 503-515.
- [6]- Attia, H., Kherouatou, N., Dhoub, A. & Khorchani, T. Dromedary milk fermentation: Microbiological and rheological characteristics. *J. Ind. Mic.*, **26**, (2001), 263-270.
- [7]- Attia, H., Kherouatou, N., Fakhfakh, N., Khorchani, T. & Trigui, N. Dromedary milk fat: Biochemical, microscopic and rheological characteristics. *J. Food Lipids*, **7**, (2000b), 95-112.
- [8]- Guillou, H., Pelissier, J.p. & Grappin, R. Méthodes de dosage des protéines du lait de vache. *Lait*, **66**, (1987), 143.
- [9]- Lowry, o.h., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. Protein measurements with the folin reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, (1951), 265-275.
- [10]- Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, (1970), 680-685.
- [11]- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, (1979), 4350-4354.
- [12]- Hunkapiller, M. W. & Hood, L.E. Direct Microsequence Analysis of polypeptides using an improved sequenator, a non protein carrier (polybrene), and high pressure-liquid chromatography. *Biochemistry*, **17**, (1978), 2124-2133.
- [13]- HEWICK, R.M., HUNKAPILLER, M.W., HOOD, L.E. & DREYER, W.J. A gas-liquid solid phase peptide and protein sequenator. *J. Biol. Chem.*, **256**, (1981), 7990- 7997.
- [14]- DAVIES, F.L. & LAW, A.J.R. An improved method for the quantitative fractionation of casein mixtures using ion exchange chromatography. *J. DairyRes.*, **44**, (1977), 213- 221.
- [15]- Grappin, R. Guide pour l'évaluation des méthodes d'analyses de routine. *Lait*, **56**, (1976), 608-621.
- [16]- Alais, C. Les bactéries lactiques. Les levains. In : *Science du lait. Principes des techniques laitières*. SEPAIC (Ed.), Paris, (1984), 345 – 388.
- [17]- Mercier, J.C., GROSClaude, F. & Ribadeau-Dumas, B. Structure primaire de la caséine α_{S1} bovine. Séquence Complète. *Eur. J. Biochem.*, **23**, (1971), 41- 51.
- [18]- Carles, C., Het, J.C. & Ribadeau Dumas, B. A new strategy for primary structure determination of proteins: application to bovine β -casein, *F.E.B.S. Lett.*, **229**, (1988), 265-272.
- [19]- Alloui-lombarkia, o., Ghenam e.h., bacha, A. & Abdeddaim, M. Caractéristiques physico-chimiques du lait de chamelle et séparation de ses protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. *Renc. Rech. Ruminants.*, **14**, (2007), 108.
- [20]- WANGO, J., FARAH, Z. & PUHAN, Z. Iso-electric focusing of camel milk proteins. *Int. Dairy J.*, **8**, (1998), 617-621.
- [21]- Kappeler, S., Farah, Z. & Puhan, Z. 5'-flanking regions of camel milk genes are highly similar to homologue regions of other species and can be divided into two distinct groups. *J. Dairy Sci.*, **86**, (2003), 498-508.