Zeitschrift: Archives des sciences [1948-1980]

Herausgeber: Société de Physique et d'Histoire Naturelle de Genève

Band: 23 (1970)

Heft: 1

Artikel: Étude des protéines des graines d'une léguminieuse : Lablab niger Medik

Autor: Miège, M.N.

Kapitel: 3: Analyse et fractionnement des extraits : isolement et définition des familles protéiques

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-739136

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 12.07.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

Chapitre 3

ANALYSE ET FRACTIONNEMENT DES EXTRAITS; ISOLEMENT ET DÉFINITION DES FAMILLES PROTÉIQUES.

Nous allons maintenant situer, avec plus de précision, la place des protéines au sein de tous les corps azotés extraits par l'eau et les solutions salines après avoir établi, en première partie, un schéma de fractionnement des extraits conduisant à l'isolement de 3 familles protéiques déterminées par leurs caractères de solubilité. Ensuite la sensibilité propre de chacune de ces familles aux influences révélées dans le second chapitre sera recherchée.

Pour terminer, l'importance des substances phosphorées et glucidiques dans les extraits sera établie ainsi que leur rôle sur la solubilité des protéines.

I. Fractionnement de l'extrait protéique

Les essais précédents ont montré que les 2 premiers extraits salins réunis renfermaient la presque totalité des protéines sels-solubles que nous étudions ici. C'est à la réunion de ces 2 extraits que nous appliquons le terme général extrait protéique.

Nous allons définir les meilleures conditions qui permettent d'individualiser les 3 familles, albumines, pseudoglobulines et globulines, auxquelles appartiennent la majorité des protéines de dolique.

Nous nous sommes adressée à une séparation par voie chimique couramment utilisée dans les études sur les protéines sériques et qui fait intervenir des précipitations par le sulfate d'ammonium à différents degrés de saturation (schéma 1).

Comme nous l'avons signalé antérieurement, l'utilisation de l'électrodialyse en remplacement des dialyses a permis de réduire considérablement les durées d'isolement, d'autant plus que la précipitation de toutes les protéines par le sulfate d'ammonium à saturation, au cours de la première étape, permet d'éliminer d'emblée toutes les molécules gênantes telles que le sucre et la phytine qui dialyseraient lentement. Le nombre d'heures, figurant près de chaque famille protéique, indique le temps écoulé entre la mise en solution et l'obtention de la solution protéique purifiée.

D'autre part, afin d'identifier les différents constituants azotés de l'extrait protéique, nous avons conduit la série des opérations résumées dans le schéma 2.

Le tableau 13, établi à partir des résultats obtenus, donne la proportion et les caractères de solubilité des diverses catégories de corps azotés solubilisés. Il est intéressant de noter l'existence d'une petite quantité de protéines (2,7 % – 2,8 % de l'azote extrait) particulièrement stables ne précipitant ni par saturation des solutions en

SCHÉMA 1

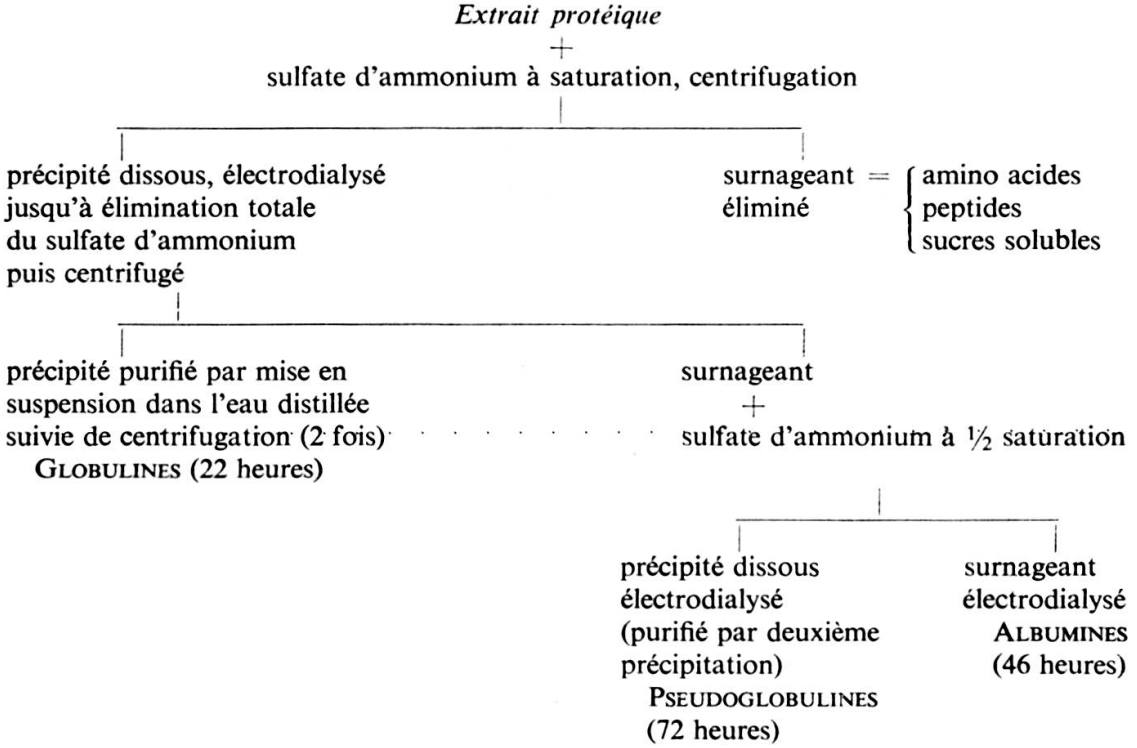
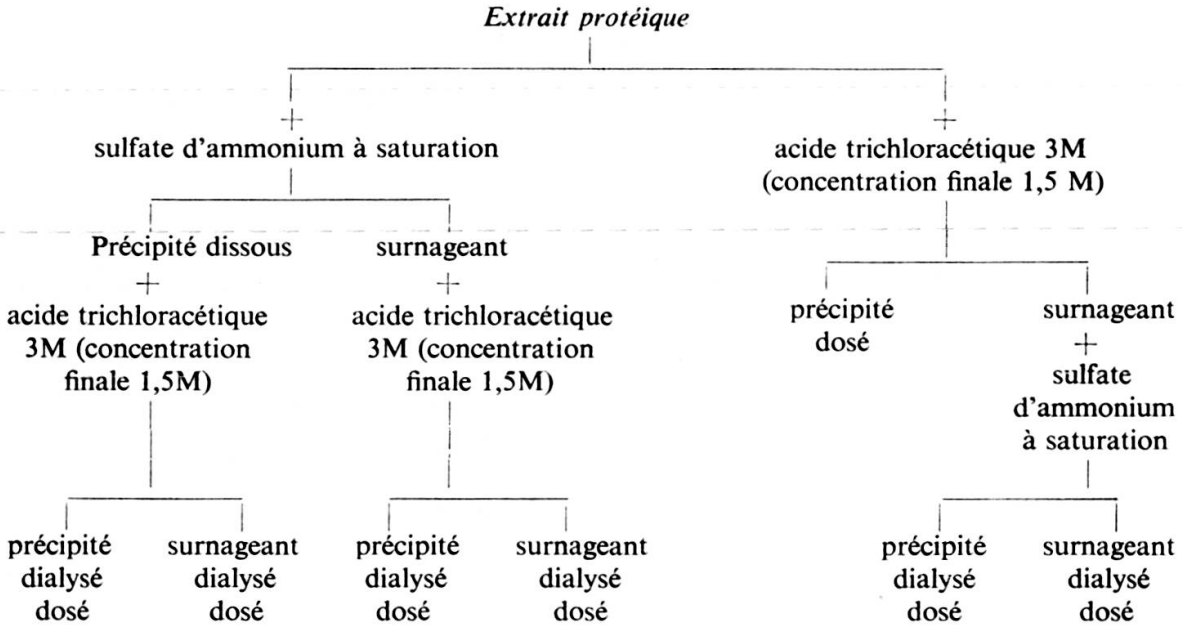


SCHÉMA 2



sulfate d'ammonium seul, ni par l'action de l'acide trichloracétique seule, mais par les 2 actions conjuguées. Par contre, une faible partie des peptides dialysables (3,6 % de l'azote extrait) est précipité par cet acide. Quant aux 3 familles protéiques (albumines, pseudoglobulines, globulines), elles représentent près de 78,8 % de l'azote total d'extrait et sont constituées en majorité de globulines (81 %).

TABLEAU 13

Nature et proportions des différents constituants azotés des cotylédons de graine de dolique extraits par l'eau et les solutions salines.

N total extrait							
100							
N dialysable		N non dialysable					
15,2		84,8					
soluble dans ATC	insoluble dans ATC	soluble dans ATC		insoluble dans ATC			
11,6	3,6	précipitation par le sulfate d'ammonium à saturation					
		non précipitable	précipitable	non précipitable	précipitable		
		0,5	2,7	2,8	78,8		
					ALBUMINES	PSEUDO-GLOBULINES	GLOBULINES
					9,9	4,9	64,0

II. SENSIBILITÉ PROPRE DE CHAQUE FAMILLE AUX DIVERSES INFLUENCES

1) *Nature et proportions des différentes familles protéiques solubilisées aux principales étapes d'une extraction.*

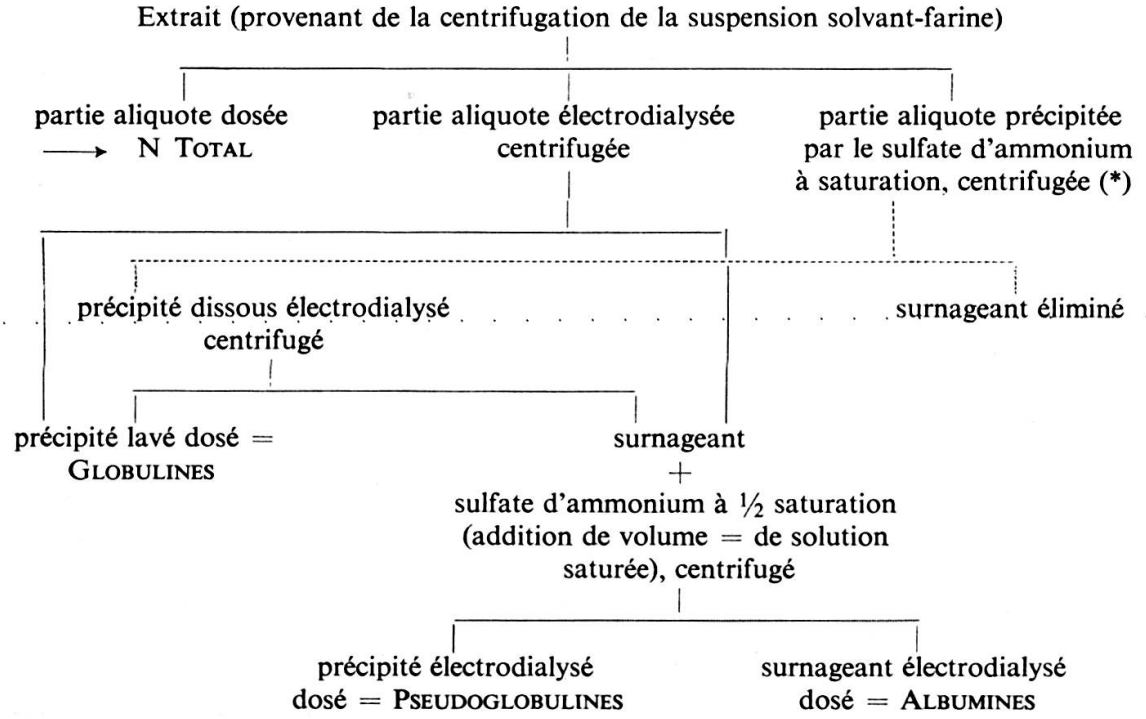
Afin de savoir si l'extraction saline dissout les albumines aussi bien que le fait l'extraction par l'eau, le fractionnement exprimé par le schéma 3 (trait plein) a été appliqué à 3 extraits de farine conservée, l'un utilisant l'eau comme solvant, les deux autres des solutions de chlorure de sodium concentrées respectivement à 0,5 et 4%.

Nous constatons (tableau 14) que les variations du taux d'extraction, provoquées par les changements de force ionique des solvants, sont imputables aux globulines et non aux albumines ou aux pseudoglobulines qui s'extraient aussi facilement en solutions salines qu'en solution aqueuse.

L'aptitude des extraits salins à solubiliser les 3 familles protéiques extractibles est ainsi affirmée. Dans le cas d'une farine conservée 15 jours, les solutions salines de force ionique 0,68 (NaCl 4%) solubilisent autant d'albumines et de pseudo-globulines que l'eau distillée et beaucoup plus de globulines. Un essai ultérieur doit permettre de généraliser la supériorité des extractions salines directes en l'étendant au cas de farines fraîchement moulues.

SCHÉMA 3

Fractionnement d'un extrait conduisant à la détermination des proportions relatives des différentes familles protéiques qu'il contient.



* Le schéma trait plein correspond aux tableaux 14 et 16 et le schéma en partie pointillé au tableau 15.

TABLEAU 14

Répartition de l'azote extrait par des solutions de forces ioniques croissantes au sein des 3 familles protéiques (farine de 15 jours, 1er extrait).
Les teneurs sont exprimées en pourcentage de l'azote total de la farine.

nature du solvant / différentes formes d'N	N total	N après dialyse	
		A + Pg	G
eau	22,5	13,2	1,6
NaCl 0,5%	27,0	13,8	6,0
NaCl 4%	69,0	13,5	48,7

2. *Nature et proportions des protéines affectées par la conservation de la farine*

Trois extractions parallèles par l'eau ont été effectuées, l'une s'adressant à une farine fraîchement moulue, la seconde à une farine conservée 1 jour, la troisième à

une farine de 30 jours. Le fractionnement du schéma 3 (pointillé) a été appliqué au premier extrait de chaque lot. Les résultats sont rapportés dans le tableau 15.

TABLEAU 15

Répartition de l'azote extrait par l'eau, agissant sur des farines plus ou moins fraîches, au sein des 3 familles protéiques

Les teneurs en azote du premier extrait de chaque série sont exprimées en pourcentage de l'azote total de la prise d'essai.

différentes formes d'N / durée de conservation	N total extrait	N après dialyse précédée de précipitation par saturation avec le sulf. d'ammonium	
		A + Pg	G
0 jour	57,4	12,2	31,0
1 jour	43,0	12,0	21,1
15 jours	19,9	10,9	1,8

La encore, ce sont les globulines qui subissent les effets de la durée de conservation de la farine. Ceci n'est pas surprenant. En effet, ce sont les extraits aqueux et non les extraits salins qui manifestent une grande sensibilité à l'action de la conservation. Les globulines ne se dissolvent dans l'eau qu'en présence de molécules solubilisantes. La conservation affecterait la présence de ces molécules. Toutefois, le taux d'albumines décroît légèrement lorsque le temps de conservation se prolonge. La solubilité générale de toutes les protéines, solubilité propre, indépendante des solvants, subit une baisse lente et progressive lorsque la farine est conservée, même à basse température (−10°)[1].

3. *Comparaison des 2 modes d'isolement des familles protéiques*

L'isolement des familles protéiques a été réalisé par dialyse de l'extrait brut et les résultats obtenus ont été comparés à ceux fournis par dialyse précédée du relargage des protéines par le sulfate d'ammonium. Le tableau 16, relatif à l'isolement des protéines sans relargage préalable, montre une perte générale globale supérieure dans le cas où une dialyse simple de 7 jours a succédé à une électrodialyse de 20 heures. Ce fait indique que l'électrodialyse de 20 heures ne suffit pas pour éliminer tout ce qui est éliminable; de nombreuses molécules dialysables, en effet, ne sont pas électriquement chargées. Mais une dialyse prolongée succédant à l'électrodialyse brève, si elle est efficace, devient dénaturante comme le montre l'augmentation relative du

[1] Il convient de remarquer, en outre, la plus forte proportion de substances azotées, dialysables ou non, précipitables par le sulfate d'ammonium que contient l'extrait de farine fraîche.

TABLEAU 16

Teneur en azote albuminique ou globulinique des extraits aqueux bruts dialysés ou électrodialysés. Les teneurs sont exprimées en pourcentage de l'azote total de la prise d'essai.

durée de conservation \ nature et durée de la dialyse	N total	électrodialyse 20 heures		électrodialyse 20 heures suivie dial. simple 7 j.	
		A + Pg	G	A + Pg	G
0 jour	57,4	13,9	34,0	8,8	37,4
1 jour	43,0	13,6	24,1	8,9	26,3
15 jours	19,9	13,5	1,8	9,0	5,0

taux de globulines; ce sont les plus instables des albumines ou des pseudoglobulines qui ont précipité et sont venues grossir le lot des globulines, nous constatons, en effet, une diminution sensible du taux d'albumines-pseudoglobulines. D'ailleurs, la dénaturation, à ce stade, est évidente: on constate un rosissement du surnageant albuminique et un virage au gris du précipité globulinique [1].

L'élimination des molécules non protéiques par dialyse simple ou sous tension de l'extrait aqueux brut est donc un problème insoluble puisque ce procédé s'avère ou inefficace ou dénaturant. Il est donc indispensable de procéder à la précipitation préalable des protéines par saturation de l'extrait brut avec le sulfate d'ammonium.

III. SUBSTANCES PHOSPHORÉES ET GLUCIDIQUES ACCOMPAGNANT LES PROTÉINES EN SOLUTION

1. *Influence des composés phosphorés sur la solubilisation des protéines par l'eau*

Pour préciser le rôle que peuvent jouer les substances organiques phosphorées sur la solubilisation des protéines, les teneurs en phosphore minéral et organique d'extraits diversément riches en protéines ont été déterminées.

En ce qui concerne les extraits, le phosphore total a été dosé après minéralisation de l'échantillon; le phosphore minéral a été évalué directement sur les extraits sans minéralisation préalable.

En ce qui concerne la farine, le phosphore total a été déterminé après minéralisation d'un échantillon; le phosphore minéral a été évalué sur le surnageant prove-

[1] Remarquons ici encore la plus forte proportion d'azote dialysable contenue dans les extraits de farine fraîche. La différence entre teneurs en A+Pg des tableaux 15 et 16 est imputable à la classe de substances azotées non dialysables et non précipitables par le sulfate d'ammonium signalée précédemment.

nant de la centrifugation d'une suspension farine-acide trichloracétique 10% (dans la proportion de 1 g pour 10 ml) après agitation de 10 minutes.

Le phosphore organique extrait, apprécié par différence entre le phosphore total et le phosphore minéral, est vraisemblablement constitué en grande majorité par de la phytine: en effet l'extraction par l'eau de phosphores nucléique et lipidique est négligeable, il resterait à préciser la part de phosphore organique constitué par du phosphore glucidique; cette part est rarement importante. Chez le blé, Mlle Moureaux (1965) précise qu'elle n'atteint pas 4% de la quantité du phosphore total.

Les analyses que nous avons effectuées ont porté sur les extraits aqueux en raison de leur sensibilité aux diverses influences étudiées dans le précédent chapitre. Les teneurs en azote et en phosphore minéral et organique de deux séries d'extraits provenant de lots de farines plus ou moins fraîches ont été établies. Parallèlement, les teneurs en phosphore des farines ont été précisées. Les résultats sont groupés dans le tableau 17.

TABLEAU 17

Comparaison des teneurs en azote et en phosphore de farines présentant des durées de conservation extrêmes, et de leurs extraits aqueux (extractions simultanées, effectuées dans des conditions rigoureusement identiques). Les teneurs sont exprimées en % du poids sec de la prise d'essai.

	durée de conservation de la farine	0 j.	60 j.
farine	N total	4,4	4,4
	P. total	0,24	0,24
	P. minéral	0,04	0,04
	P. organique (par différence)	0,20	0,20
premier extrait	N total	2,42	1,70
	P. total	0,18	0,14
	P. minéral	0,020	0,035
	P. organique (par différence)	0,160	0,105

L'extrait de farine fraîche, conformément aux observations du second chapitre, est beaucoup plus riche en azote total que l'extrait de farine conservée (ce dernier toutefois présente une teneur en azote supérieure à celle constatée dans de précédentes expériences sur des farines moins longtemps conservées, mais ceci n'est qu'une manifestation de plus du cycle endogène de la graine dont nous avons parlé précédemment).

Nous constatons que les variations dans les teneurs en azote des extraits sont liées à des variations de même sens dans les teneurs en phosphore organique. Que le

taux de phosphore organique de la farine reste constant dans les deux cas étudiés n'exclut pas la possibilité de rendre la phytine responsable des variations constatées dans la solubilisation des globulines.

Le lien phytine-protéine, pour des pH supérieurs à 3, a été révélé et commenté par plusieurs auteurs, comme nous l'avons exposé dans l'historique. Helliot et Macheboeuf (1947) pensent que la phytine est préexistante dans la graine indépendamment des protéines et forme des complexes avec ces dernières au cours des extractions et des séparations.

Rondelet et Lontie (1955) d'une part, Smith et Rachis (1957) d'autre part, ont montré que la phytine est liée, dans les solutions protéiques, à 1 ou 2 protéines précises. Le fait que la diminution du taux d'azote extrait, liée à la durée de conservation de la farine, atteint un pallier inférieur qui correspond à une constitution protéique presque uniquement albuminique laisse supposer que, dans les cotylédons de dolique, presque toutes les globulines sont engagées dans un complexe hydrosoluble. Le parallèlisme entre taux de phytine des extraits et taux de globulines indûment solubilisées par l'eau conduit à penser que ce complexe est une association phytine-globuline. Par ailleurs, la force ionique conférée aux solutions aqueuses par les sels minéraux de la farine est inférieure à 0,085 puisque les solutions de NaCl 0,5% accusent une remontée du taux d'extraction de farines conservées.

Il faut remarquer que les complexes entre phytine et protéines dont parlent les auteurs sont des complexes insolubles, précipités généralement irréversibles apparaissant au cours des opérations d'extration ou de fractionnement. Le complexe dont nous supposons l'existence est d'autre nature puisqu'il rend au contraire hydrosolubles des protéines qui ne le sont pas. Nos constatations nous conduisent à supposer que ce complexe phytine-protéine est préexistant dans la graine. Lorsque les structures tissulaires de la graine sont bouleversées par la mouture, le complexe se dissocierait plus ou moins rapidement; la phytine libérée ne se dissoudrait plus entièrement (peut-être engagée dans des combinaisons avec Ca^{++} ou Mg^{++}) et les globulines retrouveraient alors leurs exigences propres vis à vis de la force ionique. Celle qui est conférée aux solutions aqueuses par les sels minéraux de la farine est insuffisante pour les solubiliser toutes.

Ainsi, les différences plus ou moins importantes d'hydrosolubilité constatées entre protéines de farine conservée et protéines de farine fraîche sont une manifestation d'un cycle endogène dont le complexe pourrait être un des moteurs.

2. *Elimination de la phytine et des glucides accompagnant les protéines en solution*

Ainsi que nous l'avons exposé dans l'historique, les auteurs ayant étudié cette question sont unanimes à prôner l'élimination de la phytine des extraits protéiques, ce composé étant rendu responsable de précipitations irréversibles, notamment lors de fractionnements par acidification.

Les procédés employés pour éliminer plus ou moins complètement ce composé sont divers et généralement longs, avec risques de dénaturation; les principales voies suivies étant la dialyse prolongée à pH alcalin de l'extrait brut, la chromatographie, etc... Perles, comme nous l'avons relaté, constate que la combinaison phytine-protéine est dissociée par relargage à 0° C: la protéine précipite, l'acide phytique reste en solution et s'élimine par dialyse. Cette méthode paraît judicieuse pour éliminer à la fois la phytine et les autres substances non protéiques dissoutes.

Rondelet et Lontie déconseillent la précipitation ammonique du fait d'entraînement irréversible de phytine par le précipité formant alors une association insoluble, et aussi à cause de la longueur des dialyses que ce procédé entraîne. Mais le précipité ammonique que nous obtenons se remet intégralement en solution, en outre, la rapidité des opérations de précipitations et de dialyse à laquelle nous parvenons semble devoir annuler les risques de dénaturation.

L'essai suivant rend compte des étapes de l'élimination du phosphore des extraits. Le fractionnement porte sur le premier extrait, par l'eau, d'une farine fraîchement moulue. L'extrait brut fut précipité par le sulfate d'ammonium à saturation; le précipité fut redissous puis électrodialysé contre de l'eau bidistillée pendant 20 heures (l'élimination du sulfate d'ammonium est totale dès 16 heures, les 4 heures supplémentaires garantissent une marge de sécurité); l'adialysat fut alors recueilli quantitativement et dosé.

TABLEAU 18

Taux de phosphore total présent à chaque étape du fractionnement en % du phosphore total de l'extrait; taux de glucides totaux présents à chaque étape du fractionnement en % des glucides totaux de l'extrait.

	Extrait total	précipitation par le sulfate d'ammonium		Electrodialyse du précipité redissous: non dialysé	Elimination par dialyse
		surnageant	précipité		
Phosphore	100	77,8	22,2	13,8	8,4
Glucides	100	81,8	18,2	10,5	7,7

Nous constatons, (tableau 18), que 78% environ du phosphore extrait est éliminé par précipitation ammonique et 38% de ce qui reste est élimité par dialyse. Finalement, 86% du phosphore extrait est éliminé.

La quantité de sucres non négligeable restant dans les protéines fait partie de la molécule, car les glucides non fortement retenus auraient été éliminés. Pour le phosphore, il est difficile de discerner si les faibles quantités restantes font partie de la molécule ou sont des restes phytiniques fortement liés aux protéines.