

Étude des conditions d'extraction des protéines cotylédonaire

Objektyp: **Chapter**

Zeitschrift: **Archives des sciences [1948-1980]**

Band (Jahr): **23 (1970)**

Heft 1

PDF erstellt am: **12.07.2024**

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern. Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

CHAPITRE 2

ÉTUDE DES CONDITIONS D'EXTRACTION DES PROTÉINES COTYLÉDONAIRES

Les caractéristiques générales de la farine seront précisées comparativement pour chacune des deux parties de la graine dans la chapitre 4. Signalons seulement que 4,4% du poids sec des cotylédons est constitué par de l'azote dont nous cherchons, dans ce chapitre, à extraire la plus grande quantité possible.

1. *Influence de la durée d'extraction*

Des prises de 2 g de farine ont été agitées avec 50 ml d'eau à 2° C pendant des périodes variant de 5 à 60 minutes. Le tableau 1 montre que la totalité de ce qui peut être extrait l'est au bout de 5 minutes de contact entre la farine et le solvant.

TABLEAU 1

Pourcentage d'extraction en fonction du temps de contact farine-solvant à 2° C

Temps d'agitation	5 min.	15 min.	30 min.	60 min.
N total de l'extrait aqueux en % de N total de la prise d'essai	58,1	58,0	57,5	56,0

La légère diminution constatée, pour le taux d'extraction, proportionnelle à la durée d'extraction, et se manifestant au delà de 15 minutes, correspond vraisemblablement à un début de précipitation des cryoprotéines.

Les protéines précipitables réversiblement par le froid sont bien connues dans le monde animal. Zigman et Lermans (1964), par exemple, ont montré que le phénomène, constaté chez certains mammifères, d'opacification du cristallin pour des températures inférieure à 10° C, était dû à la précipitation, à cette température, d'une fraction importante des protéines de cet organe. Chez les végétaux, la cryoprécipitation réversible a également été constatée pour les protéines de certaines familles. Ghetie et Buzila (1962) signalent ce phénomène dans les graines de Légumineuses, Cucurbitacées, Rosacées et Crucifères.

Nous même avons observé l'existence de cryoprotéines dans notre matériel. Un séjour de 10 minutes en réfrigérateur d'un extrait limpide provoque l'apparition d'un précipité blanc qui disparaît dès le retour à une température plus élevée. Le seuil de précipitation se situerait aux alentours de 5°. Il y a ici une incohérence: l'extraction ayant lieu à 2° C il semble que ces cryoprotéines ne devraient pas être extraites, or elles le sont. En effet, l'extrait obtenu après 5 minutes d'agitation à 2° C suivie de 30 minutes de centrifugation toujours à 2° C, d'abord limpide se trouble s'il est maintenu quelques temps à basse température. La précipitation des cryoprotéines ne serait donc pas instantanée mais progressive et ce phénomène pourrait expliquer la légère baisse de rendement liée à l'augmentation de la durée d'extraction.

Cette cryoprécipitation est réversible: dès le retour à une température supérieure à 10° la solution troublée redevient limpide.

La conclusion de cet essai est évidente: il faut réduire la durée d'agitation au minimum efficace, c'est-à-dire 5 minutes.

2. *Influence de la dilution*

Nous appelons dilution le rapport volume de solvant en ml/poids de farine en g.

Dans cette expérience, 6 prises d'essai de farine, de poids variant de 0,4 à 16 g, sont agitées pendant 5 minutes dans un même volume d'eau distillée (20 ml), ce qui fournit des dilutions respectivement de 50 — 25 — 12,5 — 5 — 2,5 et 1,25. Les valeurs obtenues sont ramenées d'une part au volume de solvant introduit, d'autre part au volume d'extrait recueilli ce qui permet d'obtenir, dans le premier cas, la quantité d'azote théoriquement extraite, dans le second cas, la quantité pratiquement extraite.

L'examen de la figure 1 révèle une diminution du rendement pratique parallèle à la diminution relative de la quantité de solvant par rapport à la prise d'essai. Ce fait laisserait à penser que le volume exerce une influence limitante sur la mise en solution des protéines de la farine par saturation. Or, les valeurs du rendement théorique montrent qu'au contraire la proportion d'azote extrait — mais non récupéré — varie en fonction inverse du volume de solvant.

Le fort rendement théorique aux faibles dilutions laisse supposer que la richesse en électrolytes du premier extrait aqueux serait telle que certaines globulines passeraient en solution en même temps que les albumines alors que, pour des dilutions élevées, ces mêmes globulines ne seraient pas solubilisées.

La diminution de rendement pratique proportionnelle à la diminution de volume de solvant est due à la rétention, par la farine, d'une partie de l'extrait d'autant plus importante que la dilution est plus faible. Cette fraction des protéines solubilisées et retenues devrait pouvoir être récupérée par des extractions aqueuses successives. Dans ce cas, les variations des rendements pratiques cumulés devraient être parallèles aux variations des rendements théoriques cumulés et non plus inverses. Nous verrons

plus loin les conclusions fournies par l'étude de deux bilans parallèles d'extraction mettant en jeu deux dilutions extrêmes.

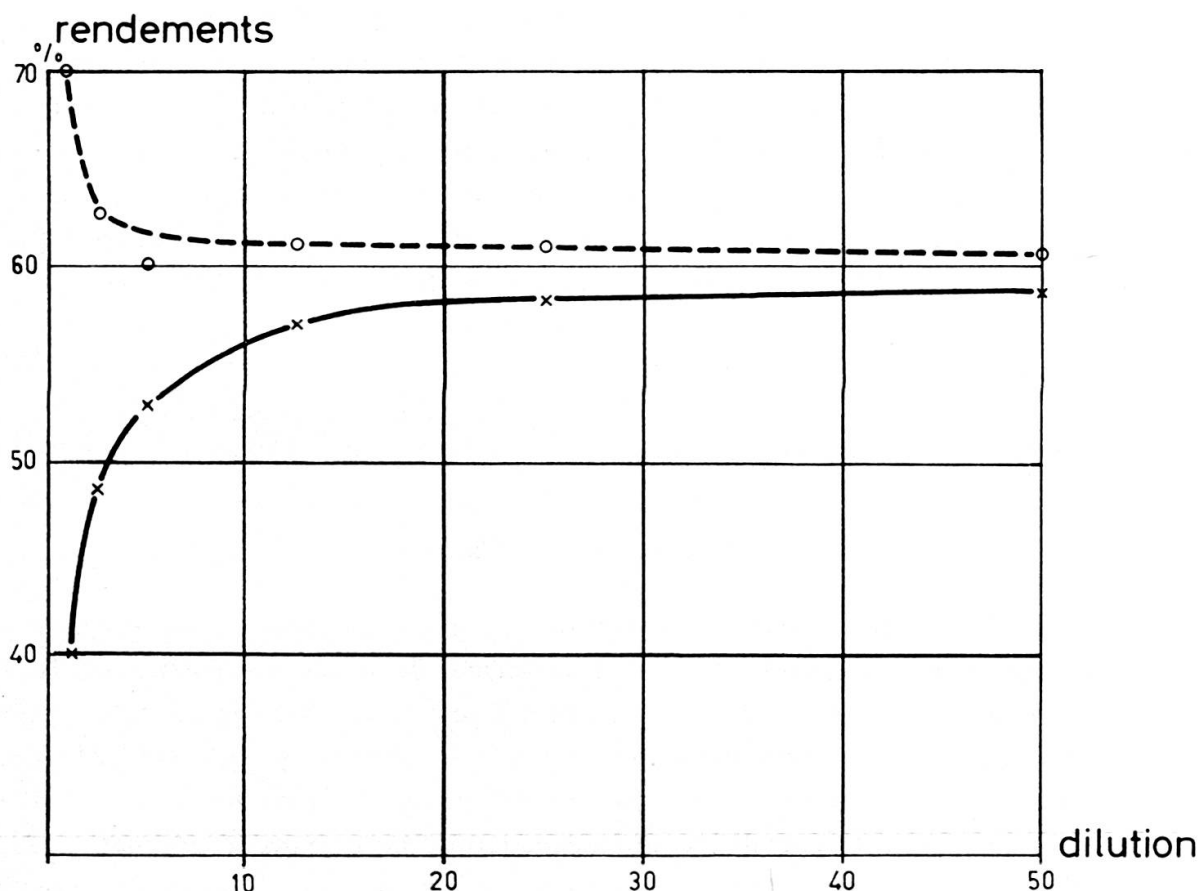


FIG. 1. — Variation des rendements théorique et pratique d'extraction en fonction de la dilution.
 o - - - - o Rendement théorique = N dans 20 ml de solvant en % N prise d'essai.
 x ——— x Rendement pratique = N dans x ml recueilli en % N prise d'essai.

3. Extraction totale par action successive de trois solvants : bilan d'une extraction totale

Des extractions par épuisement à l'aide des 3 solvants — eau, solutions salines, solutions alcalines diluées — utilisés successivement, furent réalisées en observant une dilution moyenne, puis deux dilutions extrêmes.

A) Cas d'une dilution moyenne

Les résultats obtenus, représentés figures 2 et 3, montrent que, dans tous les cas, la majorité du matériel soluble dans un solvant donné est obtenue au cours du premier contact avec ce solvant. D'autre part, si l'extraction saline ne solubilise, dans les conditions où nous avons opéré, qu'une proportion relativement très faible des protéines totales, les solutions alcalines, par contre, permettent de solubiliser une fraction non négligeable des réserves cotylédonaires.

Ces dernières observations sont chiffrées dans le tableau 2 qui permet, par ailleurs, de constater que la technique employée a permis d'extraire 98,3% de l'azote total

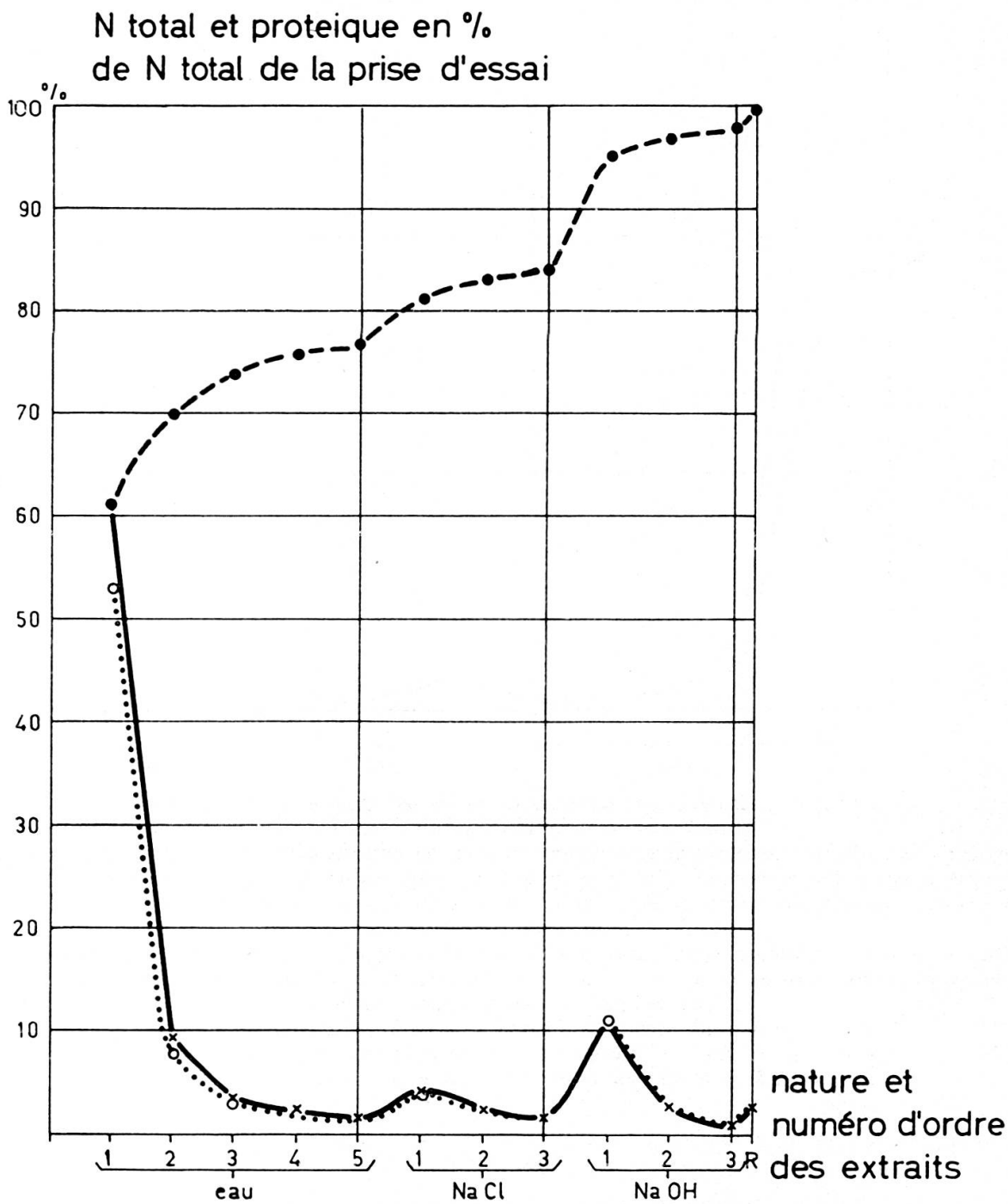


FIG. 2. — Variation des teneurs des extraits en N total et N protéique en fonction de la nature et du numéro d'ordre de l'extrait.
 x ——— x N total extrait à chaque opération en % de N total de la farine.
 o o N protéique (= N après dialyse) extrait à chaque opération en % de N total de la farine.
 ● - - - - ● Valeurs cumulées de l'azote total extrait à chaque opération en % de N total de la farine.

contenu dans la farine. Ajoutons, d'autre part, que 77% environ de l'azote extrait l'est par l'eau.

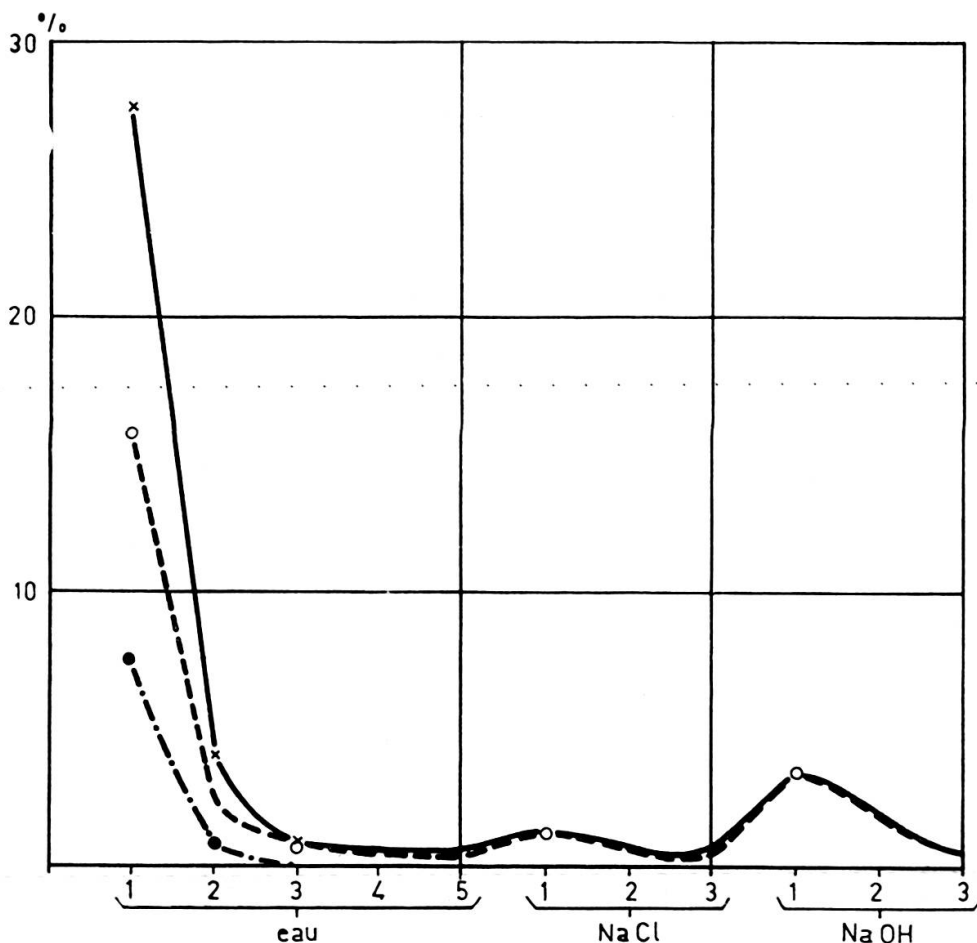


FIG. 3. — Proportions relatives du poids sec, du poids de protéines et du poids de sucre dans les différents extraits.

Les poids secs n'étant pas mesurables directement pour les extraits salins et sodiques ils ne sont pas représentés sur la figure par des points expérimentaux, mais évalués par déduction: en effet, à partir du 3^e extrait aqueux l'écart poids sec — poids de protéine devient très faible et on peut considérer qu'il s'annule pour les extraits suivants.

Parmi les poids de protéine, ceux qui ne sont pas évalués directement en raison de leur très faible valeur sont estimés en multipliant la valeur de N total par 6,3. Ces valeurs approchées ne sont pas représentées par des points figurés sur la courbe.

- x ——— x poids sec en % du poids sec de la prise d'essai.
- o - - - - o poids de protéines en % du poids sec de la prise d'essai.
- — . - . ● poids de sucres en % du poids sec de la prise d'essai.

TABLEAU 2

Bilan d'extraction par les différents solvants.

N total prise d'essai	N total extrait	N total extrait par l'eau	N total extrait par NaCl	N total extrait par NaOH
100	98,3	77,3	7,5	13,5

Le poids de protéines ne représente qu'environ 60% du poids sec extrait (tableau 3), alors que les sucres dialysables atteignent 26,3%. Il convient de noter d'ailleurs que, dès le troisième extrait, il ne subsiste pratiquement plus dans le surnageant que des composés protéiques à poids moléculaire élevé.

TABLEAU 3

Constitution de l'extrait aqueux (calculée sur la somme des trois premiers extraits).

Poids sec extrait	Poids de protéines (= poids sec après dialyse)	Sucres dialysables	Résidu dialysable (sels minéraux, amino acides, etc. par différence)
100	59,7	26,3	14,0

B) Cas de deux valeurs extrêmes de la dilution

Deux prises d'essai, l'une de 8 g, l'autre de 0,2 g de farine ont été mises en suspension dans 10 ml de solvant, ce qui correspond à des dilutions de 1,25 et 50. Ces prises ont été traitées par plusieurs solvants en extractions répétées, comme dans l'expérience précédente. Cet essai ayant pour but de suivre l'extraction des protéines à chaque étape et pour chaque dilution, la teneur en azote total des extraits a seule été évaluée. Le tableau 4 et la figure 4 résument les résultats obtenus.

Remarquons, tout d'abord, que les proportions d'azote total extrait par les deux premiers solvants utilisés varient avec la dilution mais que l'extraction totale par ces solvants est constante et s'élève à 85% environ.

Le tableau 5 met ce fait en évidence. Il permet de constater, en outre, que les valeurs relatives à une dilution moyenne sont intermédiaires entre celles caractéristiques des dilutions extrêmes.

Le fait que le total des quantités d'azote extraites par l'eau et le chlorure de sodium représente, quelle que soit la dilution, une valeur constante de la quantité d'azote initiale, indique que, selon la dilution, une quantité plus ou moins importante de globulines passe dans les extraits aqueux. Une telle situation est normale puisqu'elle dépend de la force ionique existant dans les solutions aqueuses initiales en raison de la teneur en éléments minéraux de la farine. Cette constatation conduit à penser qu'il existe un certain nombre de fractions globuliniques diversement exigeantes à l'égard de la force ionique.

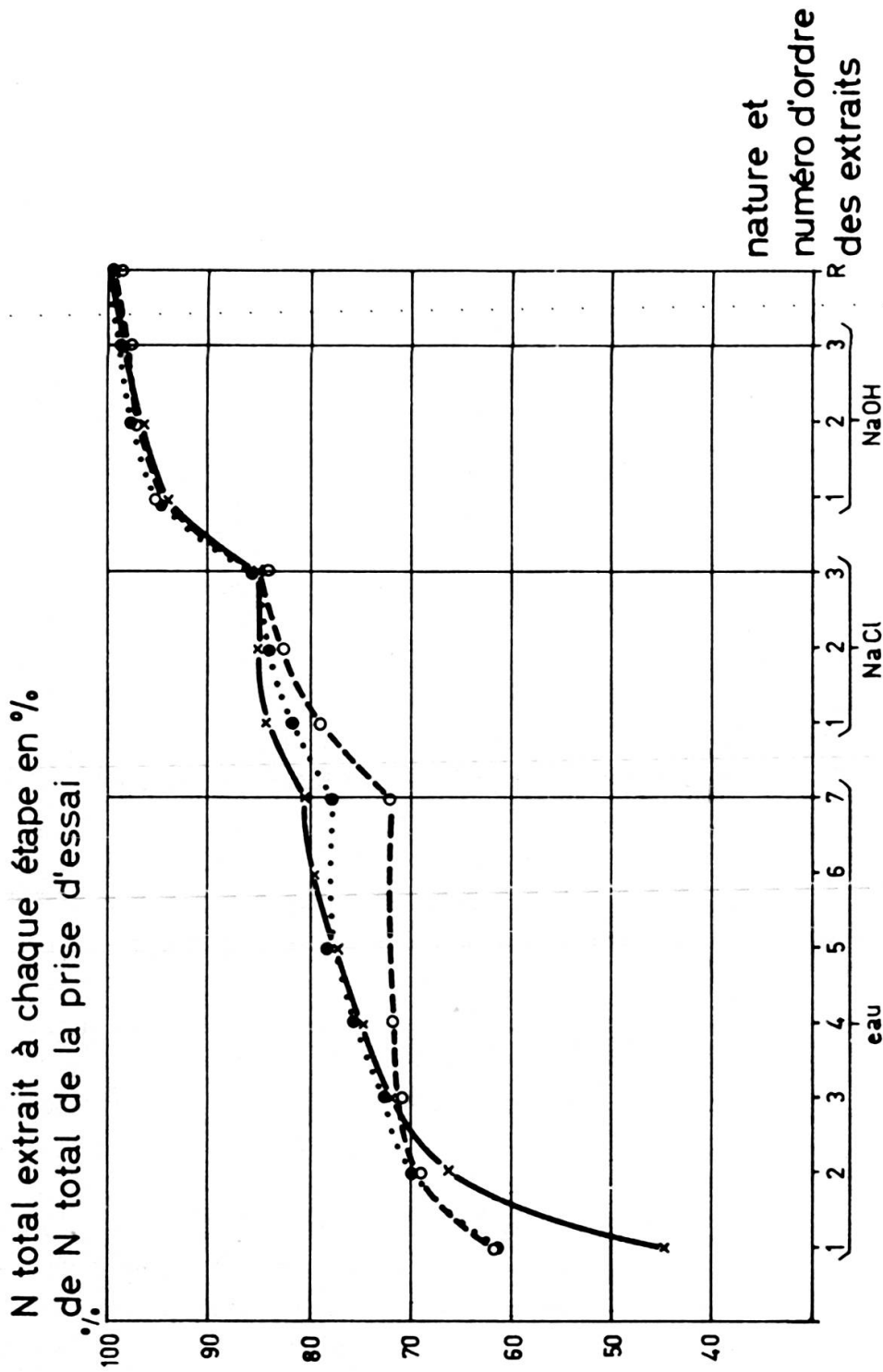


FIG. 4. — Comparaison des valeurs cumulées d'azote total extrait au cours d'extractions complètes mettant en jeu des dilutions différentes.
 x — N total des extraits obtenus à faible dilution $d = 1,25$.
 o — N total des extraits obtenus à forte dilution $d = 50,0$.
 ● — N total des extraits obtenus à dilution moyenne $d = 12,5$.
 (Les points relatifs aux dilutions extrêmes sont tirés du tableau 4, ceux concernant la dilution moyenne du tableau 2).

TABLEAU 4

Rendements d'extractions successives mettant en jeu 2 valeurs extrêmes de la dilution. Les teneurs en azote des extraits sont données en mg et la valeur globale obtenue pour chaque type d'extraction est exprimée en pourcentage de l'azote total de la prise d'essai (sur la base du total trouvé)

Prise d'essai en mg	8000,0	200,0
Dilution	1,25	50,0
Extraits:		
Eau n° 1	146,7	5,1
2	66,7	0,6
3	20,7	0,2
4	10,5	0,1
5	8,0	—
6	6,9	—
7	4,2	—
	<u>263,7 = 81,0%</u>	<u>6,0 = 72,3%</u>
NaCl 4% n° 1	9,4	0,6
2	4,3	0,4
3	2,3	0,1
	<u>16,0 = 4,9%</u>	<u>1,1 = 13,2%</u>
NaOH 0,1 N n° 1	26,3	0,8
2	9,2	0,2
3	3,9	0,1
4	1,1	—
	<u>40,5 = 12,5%</u>	<u>1,1 = 13,2%</u>
N résiduel dosé	5,2 = 1,6%	0,1 = 1,3%
Total trouvé	325,4 = 100%	8,3 = 100%
Total trouvé en % du total déduit du dosage de l'aliquote	= 99,2%	= 101,2%

TABLEAU 5

Variation des taux d'extraction obtenus par l'eau et les solutions salines en fonction de la dilution. Les valeurs du tableau représentent l'azote total extrait exprimé en pourcentage de l'azote total de la prise d'essai (sur la base de la valeur totale mesurée)

Dilution	eau	chlorure de sodium	eau + chlorure de sodium
1,25	81,0	4,9	85,9
*12,5	77,3	7,5	84,8
50,0	72,3	13,2	85,5

* Pour cette dilution, les valeurs sont tirées du tableau 2.

4. Influence de la force ionique

Les essais suivants se proposent de confirmer et de préciser les liens existant entre la force ionique des solvants et leur pouvoir solubilisant.

Des prises d'essai de 1 gramme de farine, fraîchement moulue et homogénéisée provenant du même lot de cotylédons, furent mises en solution simultanément dans des conditions identiques (15 ml de solvant, 10 minutes d'agitation, 30 minutes de centrifugation à 30 000 g à 2° C). Les teneurs en azote total des extraits recueillis furent déterminées. Les résultats sont groupés dans le tableau 6.

TABLEAU 6

Teneur en azote total des 3 premiers extraits recueillis au cours de 6 extractions simultanées mettant en jeu des forces ioniques croissantes. L'azote total de chaque extrait est exprimé en pourcentage de l'azote total de la prise d'essai.

solvant utilisé n° d'ordre des extraits	solvant utilisé					
	eau bidistillée	NaCl 0,5% ($\Gamma_2 = 0,085$)	NaCl 1% (0,17)	NaCl 2% (0,34)	NaCl 4% (0,68)	NaCl 6% (1,02)
1	55,0	42,5	57,0	70,0	74,0	73,1
2	15,8	6,0	8,2	9,0	10,0	10,0
3	8,0	2,0	2,8	2,9	2,9	3,0
Totaux	78,8	50,5	68,0	81,9	86,9	86,1

Il n'est pas surprenant de constater que les solutions salines extraient d'autant plus de protéines que leur force ionique est plus élevée, le minimum de solubilité

étant constaté pour la force ionique la plus faible (0,085). Mais que les extraits aqueux soient plus riches que les extraits salins de force ionique 0,085, voilà qui se conçoit plus difficilement. On peut admettre que le premier extrait aqueux ait une force ionique supérieure à celle des solutions de chlorure de sodium à 0,5% bien qu'encore il soit difficile de concevoir que les électrolytes solubilisés par l'eau ne le soient pas par les solutions salines. Si cela était, on s'attendrait cependant à ce que ce phénomène s'atténue pour les extraits suivants, les électrolytes se raréfiant dans la farine au fur et à mesure que l'extraction avance, or la différence subsiste encore au niveau du troisième extrait.

Mais, s'il semble difficile de concevoir un refus des électrolytes de passer en solution dans d'autres solvants que l'eau distillée, on peut admettre plus facilement que les corps satellites, dissouts préalablement aux protéines et favorisant leur solubilisation, ne sont pas des ions mais des molécules organiques possédant la propriété de se dissoudre beaucoup mieux dans l'eau pure que dans les solutions salines de force ionique si basse soit-elle. On peut admettre aussi que les protéines concernées forment dans la graine, avec ces molécules annexes, un complexe soluble seulement dans l'eau pure; par ailleurs, l'augmentation de la force ionique des solvants favorisant la dissolution des globulines, seules les solutions salines de faible force ionique seraient défavorisées. Nous reviendrons sur ce problème dans un prochain chapitre.

Un dernier point reste à préciser: la concentration en chlorure de sodium nécessaire et suffisante pour conférer aux solutions salines un pouvoir dissolvant maximum est-elle bien la concentration de 4% que révèle l'examen du tableau 6? Un essai complémentaire, permettant de comparer les taux d'extraction obtenus par des solutions allant jusqu'à une concentration en NaCl de 10%, montre qu'il en est bien ainsi.

5. *Influence du pH des solvants*

Des extraits effectués par l'eau suivant le technique habituelle (dilution 15), à un même pH et une même force ionique à l'aide de tampons différents, ont été comparés. Un système tampon réalisable dans la zone de pH 7, autre que le tampon phosphate, est le tampon barbital. Malheureusement, le diéthylbarbital contient de l'azote. Nous l'avons cependant utilisé en prenant soin de réaliser, quant au véronal, un blanc rigoureusement identique. Les résultats figurent dans le tableau 7.

Nous constatons une légère amélioration du taux d'azote extrait par les solutions de pH 7 et c'est bien la seule stabilisation du pH du solvant aux alentours de 7 qui est responsable de l'augmentation constatée, pour une force ionique donnée, du pouvoir dissolvant des solutions salines. Cette augmentation est particulièrement sensible aux faibles forces ioniques.

TABLEAU 7

Comparaison de l'influence de 2 tampons différents de même pH. La teneur en azote total des extraits est exprimée en pourcentage de l'azote total de la prise d'essai.

solvants	force ionique		0,18		0,68
	pH du solvant		farine fraîche	de 3 j.	fraîche
NaCl	6,05		61	52	72
tampon phosphate	7,00		69	68	77
tampon phosphate + NaCl	7,00		69	68	—
tampon véronal	7,00		69	68	77

6. Influence de l'ordre d'entrée en action des deux solvants eau-solutions salines

Le tableau 8, qui groupe les résultats obtenus lors d'extractions totales simultanées dont les conditions ne différaient que par l'ordre d'action des 2 premiers solvants, révèle une augmentation sensible du rendement d'extraction dans le cas où agissent en premier les solutions salines. De cette manière, une seule extraction suffirait pour une étude qualitative (73% des protéines figurant dans cet extrait sur 87 solubilisables) et, lors d'une extraction exhaustive, le nombre d'extraits successifs nécessaires se trouverait également sensiblement réduit.

7. Influence de la durée de conservation de la farine

Des défauts de reproductibilité concernant le taux d'azote extrait par l'eau agissant en premier conduisirent à soupçonner le rôle que peut jouer la durée de conservation de la farine sur la solubilisation des protéines qu'elle contient. Pour préciser cette influence, une farine, fraîchement moulue et homogénéisée, fut en partie soumise immédiatement à l'extraction; le reste fut testé 8 jours plus tard après avoir été conservé en congélateur à -10°C .

Les résultats (tableau 9) révèlent tout d'abord l'accentuation, sur une farine de 8 jours, du contraste qui avait été constaté sur les rendements d'extraction lorsqu'intervient une inversion de l'ordre d'action des 2 premiers solvants: eau, solution saline. Ici, le premier extrait salin solubilise autant d'azote que tous les extraits aqueux réunis.

TABLEAU 8

Comparaison des rendements de 2 extractions totales effectuées en intervertissant l'ordre d'action des 2 premiers solvants : eau, solution saline.
L'azote total de chaque extrait est exprimé en pourcentage de l'azote total de la prise d'essai.

	Eau-NaCl 4 %-NaOH 0,1N	NaCl 4 %-Eau-NaOH 0,1N
<i>1^{er} solvant</i>		
extrait n° 1	55,0	73,1
2	15,8	10,5
3	5,3	2,8
4	2,5	0,6
5	0,9	0,1
	79,5	87,1
<i>2^e solvant</i>		
extrait n° 1	5,2	0,4
2	1,4	0,1
3	0,5	0,0
	7,1	0,5
<i>3^e solvant</i>		
extrait n° 1	10,3	10,1
2	1,0	1,2
3	0,1	0,0
	11,4	11,3
N total extrait	98,0	98,9
N résiduel dosé	1,5	1,4
total trouvé	99,5	100,3

Conjointement est mise en relief l'influence considérable jouée par l'âge de la farine. Nous constatons une diminution générale de la solubilité affectant, tout particulièrement, les protéines extraites par l'eau.

A. Influence de la conservation sur les premiers extraits aqueux.

Pour préciser la portée de cette observation, quatre prises d'essai de 1 gramme chacune, la première de farine fraîchement moulue, les autres de farines conservées après mouture à -10° : 1 jour, 15 jours et 40 jours, ont été mises en extraction dans les conditions habituelles ($d = 15$). Les teneurs en azote des 2 premiers extraits aqueux ont été déterminées. Le tableau 10 groupe les résultats obtenus auxquels ont été ajoutés les chiffres issus du tableau 9.

TABLEAU 9

Comparaison des rendements d'extraction totale faisant intervenir, d'une part, une inversion dans l'ordre de succession des solvants, d'autre part, des farines d'âges différents. Les teneurs en azote sont exprimées en pourcentages de l'azote total de la prise d'essai.

Les chiffres concernant les extractions sur farine fraîche (0 jour) sont repris du tableau 8.

	Eau-NaCl 4%-NaOH 0,1N		NaCl 4%-Eau-NaOH 0,1N	
	0 jour	8 jours	0 jour	8 jours
<i>1^{er} solvant</i>				
extrait n° 1	55,0	34,0	73,1	67,5
2	15,8	18,8	10,5	9,1
3	5,3	8,0	2,8	2,7
4	2,5	2,6	0,6	0,8
5	0,9	1,0	0,1	0,3
	<hr/>	<hr/>	<hr/>	<hr/>
	79,5	64,4	87,1	80,4
<i>2^e solvant</i>				
extrait n° 1	5,2	12,3	0,4	0,4
2	1,4	3,3	0,1	0,4
3	0,5	0,7	0,0	0,3
	<hr/>	<hr/>	<hr/>	<hr/>
	7,1	16,3	0,5	1,1
<i>3^e solvant</i>				
extrait n° 1	10,3	13,1	10,1	13,5
2	1,0	3,0	1,2	2,5
3	0,1	1,1	0,0	1,0
	<hr/>	<hr/>	<hr/>	<hr/>
	11,4	17,2	11,3	17,0
total extrait	98,0	97,9	98,9	98,5
N résiduel dosé	1,5	1,5	1,4	1,6
total trouvé	99,5	99,4	100,3	100,1

L'augmentation de la durée de conservation de la farine diminue la solubilité des protéines et les altérations responsables de cette perte progressive de solubilité se produisent dès le premier jour et atteignent leur plein effet au bout de 15 jours.

On peut entrevoir 2 causes possibles de ce phénomène. Ou bien certaines catégories de protéines, sinon toutes, sont modifiées pendant le vieillissement de la farine et présentent alors d'autres exigences pour passer en solution, ou bien, à la suite d'altérations, les électrolytes ou les molécules solubilisantes que contient la farine ont été progressivement mobilisées dans des combinaisons insolubles et ne passent

TABLEAU 10

Influence de l'âge de la farine sur la solubilisation des protéines par l'eau distillée.
Les teneurs en azote total de chaque extrait sont exprimées en pourcentages de l'azote total de la prise d'essai.

	durée de conservation de la farine après mouture				
	0 jour	1 jour	8 jours	15 jours	40 jours
extrait n° 1	55,0	42,1	34,0	22,0	22,0
extrait n° 2	16,3	17,0	18,8	2,8	2,5
total	71,3	59,1	52,8	24,8	24,5

plus dans les extraits aqueux; cette seconde hypothèse implique que les extraits salins se montrent insensibles au vieillissement, l'examen du tableau 9 révèle une baisse du taux d'extraction, moins importante que celle présentée par les extraits aqueux, mais réelle. L'essai suivant précise la portée de cette perte.

B. *Influence du vieillissement sur les extraits salins*

Cet essai reproduit une extraction totale réalisée exactement dans les mêmes conditions que celle rapportée dans le tableau 9, qui faisait intervenir les solutions salines en premier solvant sur une farine de 8 jours, mais ici, il s'adresse à une farine conservée 18 jours afin de permettre aux altérations consécutives au vieillissement d'atteindre leur plein effet. En outre, une extraction parallèle, mettant en jeu une force ionique double et portant sur les 2 premiers extraits, était effectuée afin de vérifier si une augmentation de la force ionique ne pouvait compenser les effets du vieillissement. Le tableau 11 rend compte des résultats obtenus.

Nous constatons, tout d'abord, que l'augmentation de la force ionique au-delà de 0,68 (NaCl 4%) ne compense pas les effets de la conservation. En outre, la diminution de rendement d'extraction des solutions salines s'est légèrement accentuée par rapport à celle constatée avec une farine de 8 jours, elle n'atteint cependant pas les proportions de la baisse de rendement subie par les extraits aqueux dans les mêmes conditions.

De plus, un fait nouveau se confirme, déjà décelable dans le tableau 9: la quantité globale de protéines extraites par l'eau et les solutions salines varie avec la durée de conservation de la farine cependant que le taux d'azote total extrait reste inchangé et demeure égal à environ 98,5% de l'azote total de la farine. C'est l'extrait sodique qui rétablit l'équilibre. Ce fait semble curieux puisque les solutions alcalines diluées sont censées solubiliser une catégorie spéciale de protéines: les glutélines.

TABLEAU 11

Action du plein effet du vieillissement sur la marche d'une extraction totale réalisée avec intervention prioritaire des solutions salines.

La teneur en azote total de chaque extrait est exprimée en pourcentage de l'azote total de la prise d'essai.

	1 ^{er} solvant NaCl 4%		1 ^{er} solvant NaCl 8%	
	0 jour	18 jours	0 jour	18 jours
<i>1^{er} solvant</i>				
extrait n° 1	73,9	66,9	72,9	66,0
2	10,1	9,7	10,4	10,0
3	2,6	2,5		
4	0,5	0,4		
5	0,1	0,3		
NaCl 8%	0,1	0,3		
	<hr/> 87,3	<hr/> 80,1		
<i>2^e solvant (eau)</i>				
extrait n° 1	0,3	0,3		
2	0,0	0,1		
	<hr/> 0,3	<hr/> 0,4		
<i>3^e solvant (NaOH 0,1 N)</i>				
extrait n° 1	9,6	15,3		
2	1,6	2,1		
3	0,2	0,3		
	<hr/> 11,4	<hr/> 17,7		
total extrait	99,0	98,2		
N résiduel dosé	1,3	1,4		
total trouvé	100,3	99,6		

Voici brièvement résumées les constatations auxquelles a conduit l'étude du facteur « conservation de la farine »: la solubilité des protéines solubles dans l'eau et les solutions salines contenues dans les cotylédons est affectée par le vieillissement de la farine. Les plus touchées sont les protéines extractibles par l'eau, les protéines manquantes, dans ce cas, sont récupérées dans l'extrait salin. Les protéines solubles à force ionique plus élevée sont également touchées et, dans ce cas, l'augmentation de la force ionique ne permet pas d'extraire les protéines manquantes. C'est alors l'extraction alcaline diluée qui, provoquant sans doute une rupture de liaisons dans

la molécule ou la dissociation d'un complexe insoluble, permet de solubiliser ce qui a été affecté.

A la lumière de ces données nouvelles, nous pouvons compléter les observations du chapitre précédent concernant l'influence de la force ionique sur la solubilisation.

Les valeurs extraites des tableaux 6, 9, 10, auxquelles s'ajoutent les résultats d'un essai supplémentaire, sont réunies dans le tableau 12 et permettent de parfaire les conclusions du paragraphe précédent.

TABLEAU 12

Mise en évidence du rôle joué par la durée de conservation de la farine sur la solubilisation des protéines dans des solutions de force ionique croissante (seules ont été étudiées les valeurs critiques de la force ionique : 0,085 et 0,68, correspondant l'une au minimum de solubilité, l'autre au seuil de l'optimum). Dans le tableau figurent les teneurs en azote du premier extrait exprimées en pourcentage de l'azote total de la farine.

durée de conservation de la farine	solvants utilisés		
	Eau	NaCl 0,5 % ($I_x = 0,085$)	NaCl 4 % ($I_x = 0,68$)
0 jour	55,0	42,5	74,0
1 jour	42,1	—	—
8 jours.	34,0	29,0	67,5
15 jours	22,0	27,0	66,9

Nous constatons que, les extraits aqueux étant les plus touchés par les effets de la conservation, l'écart existant entre les teneurs en azote de l'extrait aqueux et de l'extrait salin de force ionique 0,085 s'atténue après 8 jours de conservation et s'inverse après 15 jours. Les hypothèses émises pour expliquer le faible pouvoir solubilisant des solutions de force ionique très basse se trouvent renforcées. Les solutions salines ont un pouvoir solubilisant croissant avec leur force ionique jusqu'à un seuil optimum. Ce pouvoir se trouve diminué dans les mêmes proportions, quelle que soit la force ionique, par la conservation de la farine. L'eau distillée jouit d'un pouvoir solubilisant supérieur à celui des solutions salines de faible force ionique, mais ce pouvoir ne résiste pas aux effets néfastes de la conservation de la farine.

Dans le cas des solutions salines, la légère diminution de solubilité peut être attribuée à une altération générale des protéines de la farine. Dans le cas des solutions aqueuses, la baisse considérable de solubilité pourrait s'expliquer par la perte progressive de l'aptitude de certains ions de la farine à passer en solution; mais nous avons vu que cette hypothèse ne tient pas devant le fait que, lors d'extractions par

épuisement effectuées parallèlement avec l'eau et le chlorure de sodium à 0,5%, la supériorité de l'eau comme solvant se manifeste encore au niveau du troisième extrait dans lequel on ne peut raisonnablement plus soupçonner l'existence d'électrolytes provenant de la farine.

Il est plus vraisemblable de penser que les matières solubilisantes sont des molécules organiques formant dans la graine, avec certaines protéines, un complexe hydrosoluble permettant la solubilisation dans l'eau de protéines qui normalement exigeraient des solutions de force ionique supérieure à 0,085, mais arrangement moléculaire fragile et progressivement dissocié lorsque les structures de la graine sont bouleversées par la mouture.

D'autre part, nous avons été amenée à soupçonner l'importance de l'âge de la graine sur la sensibilité des protéines au facteur conservation de la farine.

8. *Influence de l'âge de la graine et révélation d'un rythme endogène*

Des essais effectués en 1964 et en 1965 sur des graines récoltées en janvier 1964, révélèrent une influence très nette du vieillissement de la farine sur la solubilité lorsque les essais furent effectués en février, mars, avril 1964. En juin, cet effet était déjà très atténué. En 1965, les mêmes constatations laissèrent supposer qu'il existe dans la graine quiescente un cycle au cours duquel il est permis de penser que certaines globulines s'associent à une substance compagne pour former un complexe hydro-soluble¹. Ce complexe se dissocierait à certaines époques pour se reconstituer à d'autres. Toutefois, les constatations sur ce point ayant été faites fortuitement lors d'études d'autres facteurs, les données expérimentales recueillies en 1964 et 1965 ne sont pas assez continues pour préciser les modalités du cycle, mais en révèlent néanmoins l'existence.

Nous avons alors entrepris en 1966 une série d'essais régulièrement échelonnés en étudiant systématiquement la solubilité dans l'eau des protéines de graines stockées provenant de la récolte 1964. Chaque mois un essai a été fait sur un lot de farine fraîchement moulue. Cette même farine était alors conservée 15 jours après lesquels une seconde extraction avait lieu. Nous espérions constater, sur le second essai, une perte de solubilité très marquée en février, mars, avril, comme nous l'avions noté en 1964 et 1965. A notre surprise, les variations furent très faibles et les différences enregistrées ne furent plus significatives contrairement à ce qui avait été constaté les deux années précédentes (fig. 5).

Alors que nous nous attendions à la reproductibilité, la troisième année, du rythme périodique observé les années précédentes, nous constatons l'évanouissement de ce cycle. Mais alors apparaît une autre tendance, en continuité avec l'évolution des années précédentes: c'est la diminution du maximum de solubilité. Ainsi l'éva-

¹ Les rapports entre substances phosphorées organiques et protéines seront étudiés dans le chapitre 3.

nouissement du cycle n'indiquerait peut-être pas la rupture d'un rythme constaté mais son aboutissement; l'écart entre maximum et minimum de solubilité s'atté-

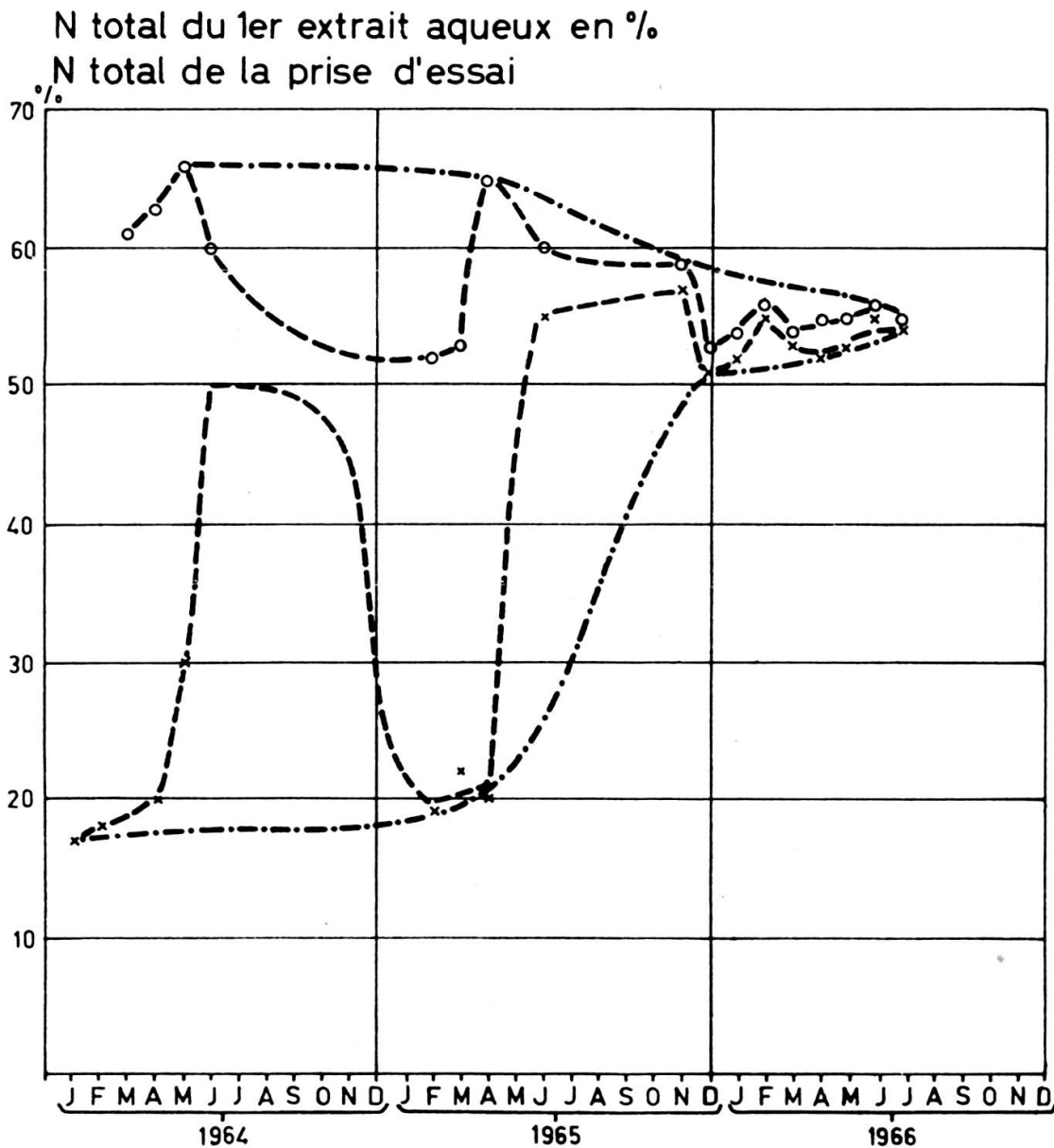


FIG. 5. — Fluctuations de l'hydrosolubilité des protéines mettant en évidence une rythmicité annuelle conjuguée à un effet de sénescence.

- o o o Points expérimentaux figurant la solubilité maximum dans l'eau des protéines de farine fraîchement moulue.
- x x x Points expérimentaux figurant la solubilité correspondante des protéines de la même farine après conservation de 15 jours.
- - - - - Rythmicité périodique.
- . - . - Effet de sénescence.

nuerait jusqu'à disparaître. Il y aurait 3 manifestations conjuguées d'un rythme endogène: premièrement rythme annuel conditionnant la solubilité des globulines avec apparition en février, mars, avril d'un maximum dans l'écart des taux de pro-

téines solubilisées, d'une part en conditions favorables, d'autre part en conditions défavorables; deuxièmement, évolution continue dans le temps vers une diminution progressive allant jusqu'à l'annulation de cet écart; troisièmement, abaissement lent des maximum de solubilité.

Nous ne voulons cependant pas tirer de conclusions définitives des constatations que nous suggère la figure 5 sur laquelle nous n'avons pu figurer des points expérimentaux réguliers qu'à partir de la fin de l'année 1965. Ce n'est, en effet, qu'à cette époque que nous avons pu déceler l'existence d'un cycle et entreprendre alors d'en rechercher systématiquement les manifestations (Signalons la seule différence qui distingue les essais de ces 3 années: en 1964 et 1965 les essais furent effectués à Dakar, en 1966 à Genève).