

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES PROTEINES DES LEGUMES SECS CULTIVES EN ALGERIE (suite).

par B. ANTHELME, S. BEN ALI, A. DJADLI, C. IORDACHE, J. LAMBERT

Département de Technologie Alimentaire et Nutrition.
Institut National Agronomique - El Harrach - Alger.

I. INTRODUCTION.

Dans les travaux antérieurs, nous avons étudié les variétés de légumes secs les plus répandues en Algérie, sur le plan de la valeur protéique biochimique (aminogrammes) et dégagé quelques variétés intéressantes (var. Sidi Moussa, Emeraude, Séville pour *Vicia faba*, Aïn Temouchent 161, Cunin 11, Issers 537 pour *Cicer arietinum*, et Larissa, Syrie 171, Chili 466 pour *Lens esculenta*).

En second lieu, des conditions optimales d'obtention d'isolats de protéines de *Vicia faba* avaient été étudiées; à savoir: température: 20-25°C; pH extraction: 6,5 environ avec l'eau, puis NaCl 0,2M comme solvant; temps d'extraction: 10 mn. Taille des particules de farine inférieure ou égale à 0,14 mm. Rapport solvant sur farine entre 5/1 et 10/1; les deux paramètres les plus importants semblent être le choix du solvant et la finesse de la mouture.

Le pH de précipitation semblerait se situer vers 3,5 qui correspond à une zone isoélectrique d'une fraction importante des protéines extraites. Cependant, nous remarquons aussi qu'un précipité (louche) important se formait déjà quand on atteignait le pH 5.

Nous avons voulu affiner, dans le travail partiel présenté ici, cette deuxième partie en comparant les isolats protéiques de *Vicia faba* (var. Sidi Moussa) et de *Cicer arietinum* (var. Aïn Témouchent) obtenus dans différentes conditions d'extraction et surtout de précipitation.

Les deux meilleurs solvants d'extraction (eau distillée et NaCl 0,2M) ont été repris et comparés.

Différents pH de précipitation, allant de 3 à 5,5, par intervalle de 0,5 degré pH ont été testés. Cela correspond à la gamme des pH cités dans la littérature pour les protéines de légumes secs et notamment des deux principales globulines (légumine et viciline) (1) (2).

Par ailleurs, une précipitation par le sulfate d'ammonium à 100% de saturation a été essayée en vue de servir de « référence », la gamme de protéines précipitées par ce sel étant l'une des plus complètes (1) (2).

Pour ces divers essais, outre le rendement azoté (protéique), il a été effectué des électrophorégrammes, des chromatogrammes sur gel de polyholosides (type « Séphadex »), et des aminogrammes afin d'essayer de mieux cerner le comportement des protéines extraites et précipitées.

Pour l'instant et vu le manque de temps, la lentille n'a pas été étudiée aussi en détail que le pois-chiche et la fève. D'un point de vue économique et également sous l'aspect valeur protéique et biologique, la lentille paraît se classer (5) au-dessous de la fève et du pois-chiche, ce qui explique aussi notre report concernant ce légume sec.

Cependant, concernant la lentille, un essai de rendement azoté avec les différents solvants déjà étudiés dans la première partie a été réalisé pour confirmer ou infirmer les résultats trouvés sur la fève. Ceci fera l'objet du chapitre qui suit.

II. ESSAIS DE DIFFERENTS SOLVANTS D'EXTRACTION DES PROTEINES DANS LE CAS DE LA LENTILLE.

II-1 MATERIELS ET METHODES.

II-1-1 *Matériel.*

Lens esculenta, variété Larissa, qui est l'une des plus répandues en Algérie, tout en étant de bonne valeur nutritionnelle (5) a été choisie comme matériel végétal.

II-1-2 *Méthodes analytiques.*

L'azote a été dosé par un analyseur automatique basé sur la décomposition de la poudre sèche d'isolat protéique par un digesteur (broyage en continu en milieu sulfurique) et minéralisation à chaud en continu.

La détermination de l'azote sous forme ammoniac utilise une réaction colorimétrique par formation d'un complexe de salicylate d'ammonium, mesuré à 660 nm (11).

Le taux de protéine est considéré comme étant 5,7 fois la teneur en azote.

II-1-3 Extraction et précipitation.

Les lentilles triées et nettoyées ont subi un broyage-mouturage, avec 4 recyclages de la mouture, ce qui correspond à 90% des particules de farine de $\varnothing \leq 0,2$ mm (mouture « fine »).

L'extraction fut celle utilisée dans nos premiers essais où 100 ml de solution à pH désiré et 10 g de poudre fine sont placés dans un erlenmeyer de 250 ml. On agite pendant 5 mn, on contrôle le pH que l'on réajuste si nécessaire avec NaOH ou HCl en solution normale.

Ensuite on procède à une séparation de la solution protéique par centrifugation pendant 10 mn à environ 400 g.

La solution protéique obtenue est décantée et le résidu est rejeté.

Le pH de la solution protéique est ramené à 3,5 par HClN, et la solution laiteuse obtenue est centrifugée à environ 400 g pendant 10 mn. Le précipité obtenu est lavé, séché dans un séchoir à air chaud à 40°C et constitue l'isolat protéique.

Les solvants d'extraction suivants furent utilisés:

- NaOH dans eau; pH: 9,6.
- Na₂CO₃ 0,2M dans eau; pH: 10,5.
- NaCl 0,2M dans eau; pH: 6,5.
- Eau distillée: pH: 6,4.

II-2 RESULTATS ET DISCUSSIONS.

Le tableau ci-après (tableau 1) illustre l'influence des différents solutés sur le rendement en protéines.

Solvants	pH de l'extraction	Lentille Larissa: teneurs en protéines des isolats % de matières sèches			moyenne des essais
		essai 1	essai 2	essai 3	
Solvant NaOH	9,6	53	52,5	54	53,2
Solvant Na ₂ CO ₃ 0,2 M	10,5	49	51	53	51
Solvant NaCl 0,2 M	6,5	55	57	57	56,3
H ₂ O distillée	6,4	55	59	60	58

N. B. Il s'agit du pH en fin de la phase d'extraction. Les conditions d'extraction et de précipitation (pH 3,5) ainsi que de moutures (4 recyclages) sont les mêmes.

Des quatre solvants testés, il apparait pour la lentille comme c'était le cas pour la fève, et comme nous le retrouverons pour le pois-chiche plus loin, que l'extraction à l'eau distillée donne les meilleurs résultats, suivie de près par celle avec NaCl 0,2M, puis avec NaOH et enfin avec Na₂CO₃ 0,2M.

Cependant, les rendements d'extraction restent inférieurs à ceux obtenus pour la fève et le pois-chiche, ce qui laisse supposer que les protéines seraient plus difficilement extractibles pour la lentille.

III. ETUDE COMPARATIVE DES ISOLATS PROTEIQUES DE POIS-CHICHE ET DE FEVE.

III-1 MATERIEL ET METHODES.

III-1-1 *Matériel.*

Nous avons étudié pour la fève, *Vicia faba*, la variété Sidi Moussa 49/25, qui est sans doute la plus répandue en Algérie actuellement, et d'une bonne valeur protéique.

En ce qui concerne le pois-chiche (*Cicer arietinum*), nous avons travaillé sur la variété Ain Témouchent 161, qui est également la plus répandue et parmi les meilleures sur le plan protéique.

III-1-2 *Obtention des isolats protéiques de fèves et de pois-chiches.*

Les graines de pois-chiche ont été nettoyées et triées, celles de fèves dépelliculées manuellement avant le broyage mouturage, avec 4 recyclages de mouture, ce qui donne un taux d'extraction de 75% pour les fèves, et 72% pour les pois-chiches, correspondant à des conditions industrielles d'utilisation, tout en ayant 90% $\varnothing \leq 0,2$ mm (cf idem II-1-3).

L'extraction et la précipitation furent identiques à celles décrites pour la lentille (cf § II-1-3).

Deux solvants furent utilisés, identifiés comme les meilleurs, l'eau distillée pH d'extraction 6,4 et une solution de NaCl dans l'eau à une concentration de 0,2M, pH 6,5.

Les pH de précipitation utilisés furent les suivants: 3 - 3,5 - 4 - 4,5 - 5 - 5,5 - afin de couvrir la gamme des pHi probables.

En outre, le sulfate d'ammonium à 100% de saturation fut utilisé comme agent précipitant — pH de précipitation: 5,8 — mais seulement en vue de la chromatographie d'exclusion sur gel, en tant que méthode de « référence ».

Dans ce dernier cas, la centrifugation après ajout du sulfate d'ammonium est plus poussée (800 g au lieu de 400) que lors de précipitations par simple abaissement du pH, afin d'obtenir une décantation correcte.

Les isolats protéiques obtenus sont lavés, séchés à l'air chaud (40° C) comme précédemment (cf § II-1-3).

III-1-3 *Méthodes analytiques.*

III-1-3-1 *Azote.*

La méthode employée fut celle de Kjeldahl, et un coefficient de 5,7 a été appliqué pour le calcul de la teneur en protéines.

III-1-3-2 *Acides aminés totaux.*

a) *hydrolyse*: les échantillons sont hydrolysés par 100 ml HCl 6N à reflux pendant 24h, à partir de 500 mg de prise d'essai, auquel nous avons ajouté 60 mg de chlorure d'étain stanneux, catalyseur de la réaction et anti-oxydant.

L'hydrolysate obtenu est immédiatement refroidi et filtré. L'HCl est éliminé au moyen d'un évaporateur rotatif sous vide (chauffage à 38-44° C). L'hydrolysate est évaporé jusqu'à consistance sirupeuse, puis repris et amené jusqu'à 50 ml avec un tampon citrate à pH 2,75; les solutions obtenues sont stockées à + 4° C.

b) *séparation et dosage*: les acides aminés des hydrolysats ainsi préparés sont séparés par le procédé chromatographique sur colonne de résine fortement acide.

Le dosage est basé sur la réaction de Spackman, Stein et Moore, et s'effectue sur les acides aminés élus par la méthode automatique de Piez et Morris, adaptée par Doutrevaux, au fur et à mesure de l'élution grâce à un autoanalyseur spécialement adapté à cet usage.

Une électrophorèse en tubes des différents isolats protéiques a été effectuée sur gel de polyacrylamide (12) à 10%, dans un appareil d'électrophorèse en tubes type Acrylophor « Pleuger » modèle 140 avec des tubes de 65 mm de longueur et 9 mm de diamètre.

III-1-3-3-1 *Préparation des solutions protéiques*: 10 mg de protéines isolées sont dissous dans 1 ml de tampon phosphate 0,01M à pH 7. L'incubation est effectuée à partir de 100 ml de solution protéique à 1 mg/ml et 10 de tampon phosphate 0,01M contenant du sodium dodécyl sulfate (S.D.S.) à 1% et 1% de mercapto-éthanol pendant 2 heures à 37° C.

III-1-3-3-2 *Préparation des gels*: On utilise une solution d'acrylamide à 10% (22,6 g d'acrylamide et 0,6 g de méthylebis acrylamide pour 100 ml d'eau).

Pour 13,5 ml de cette solution, on ajoute 15 ml de solution tampon phosphate (7,8 g NaH₂PO₄, H₂O + 25,2 g Na₂HPO₄, 2H₂O + 2 g S.D.S. pour 1 litre) et 1,5 ml de peroxydisulfate d'ammonium préparé extemporanément.

Les tubes sont remplis avec ce mélange à l'aide d'une pipette Pasteur jusqu'à 3 ou 4 mm du bord supérieur. Quelques gouttes d'eau distillée sont ajoutées par dessus. Après 1 h, l'apparition de l'interface démontre que le gel s'est solidifié.

L'eau est retirée avec une pipette Pasteur et les tubes sont placés dans l'appareil.

III-1-3-3-3 *Préparation des échantillons protéiques et conduite de l'électrophorèse*: Pour chaque gel, on mélange 5 µl de solution à 0,05% de bleu de bromophénol dans l'eau, quelques cristaux de saccharose, 5 µl de mercapto-éthanol, 50 µl de solution tampon phosphate auquel on ajoute 20 µl de solution protéique, préalablement incubé à 37°C pendant 2 h.

L'appareil d'électrophorèse est rempli de 300 ml de solution tampon diluée de moitié. La solution protéique est déposée à l'aide d'une pipette Pasteur dans chaque tube, et par-dessus on dépose la solution tampon diluée de moitié, toujours avec la pipette Pasteur.

La cuve du haut de l'appareil est ensuite remplie avec 150 ml de sol. tampon diluée de moitié.

L'appareil est branché à courant constant sous 8 mA par tube pendant 4 h.

Après sortie du gel et mesure du front d'éluion, les tubes sont mis en coloration dans une solution colorante (1,25 g de bleu de Coomassie, 453 ml méthanol 50% et 46 ml d'acide acétique glacial) pendant 2 h.

Une décoloration est effectuée ensuite sur les tubes lavés à l'eau distillée, pendant 24 h avec une solution décolorante (75 ml acide acétique glacial, 50 ml méthanol et Q.S.P. 1 litre dans H₂O distillée).

Les migrations des bandes protéiques sont alors mesurées; les mobilités qui sont égales à:

$$\frac{\text{distance migration de la prot.}}{\text{longueur après décoloration}} \times \frac{\text{longueur avant décoloration}}{\text{distance migration colorant}}$$

sont calculées et mises sur une échelle semi-logarithmique où se trouvent les poids moléculaires des protéines de référence.

III-1-3-4 Chromatographie sur gel de polyholoside (3).

Les isolats protéiques secs ont été remis en solution dans du tampon TRIS HCl à pH 7,95 à raison de 10 mg/ml de solution tampon.

Un dépôt de 0,5 ml de solution protéique, soit 5 mg d'isolat a été effectué sur une colonne de gel de dextrane type « Séphadex G 100 » (5 g de « bed gel ») de hauteur de gel 35,5 cm et de diamètre 1,6 cm.

Le débit de la colonne était de 15 ml/h et le solvant d'éluion était celui utilisé pour l'isolat protéique (tampon TRIS HCl pH 7,95).

Le gel « G 100 Séphadex » a été choisi pour cette première approche, parce qu'il a une capacité de séparation entre les poids moléculaires compris entre 3.000 et 150.000, ce qui d'après la littérature (1) (2) englobe la plupart des protéines de légumineuses, du moins les globulines qui en sont la fraction la plus importante quantitativement.

Cependant un essai a été effectué sur un gel « Séphadex G200 » qui permet de déceler les protéines de hauts poids moléculaires (jusqu'à 800.000), avec un isolat protéique de fève, extrait à l'eau et précipité au sulfate d'ammonium à saturation, c'est à dire dans des conditions où l'on peut supposer qu'un maximum de protéines sont extraites d'après la littérature.

Avec le gel G 200 une même quantité d'isolat protéique a été déposée (5 mg) sur un lit de gel de 1g, avec une colonne de diamètre 1,5 cm sur 23 cm de hauteur. Le débit était de 35 ml/h et l'éluant était également du tampon TRIS HCl pH 7,95.

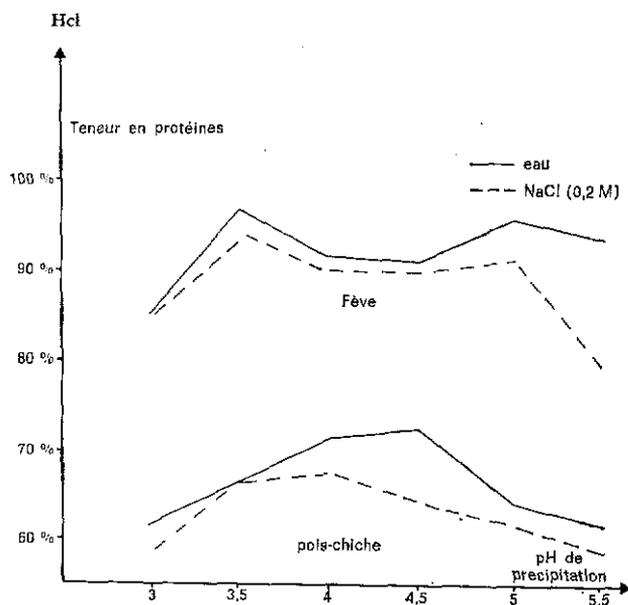


Figure 1 - Evolution de la teneur en protéine des isolats protéiques de la fève et du pois-chiche en fonction du solvant d'extraction et du pH de précipitation.

Un essai a été aussi effectué avec du gel « Séphadex G 75 » pour un isolat protéique de fève extrait à l'eau et précipité à pH 3,50, c'est à dire dans les conditions optimales définies par nos premiers travaux, ceci dans le but de comparer les pouvoirs séparateurs des gels « G 75 » et « G 100 ».

Le dépôt d'isolat protéique fut le même ainsi que l'éluant; 7 g de lit de gel dans une colonne de \varnothing : 1,6 cm et une hauteur de gel de 60 cm. Le débit était de 10 ml/h.

Dans tous les cas, les fractions recueillies sont passées en U.V. à 225 nm, maximum d'absorbance des protéines. Une solution de bleu de bromophénol sert à repérer la fin de l'éluion et divers étalons ont été élus afin de tester les colonnes et mesurer le volume d'exclusion V_0 (cytochrome C, S.A.B., ovalbumine, trypsine, ferritine...).

Les divers rapports V_e/V_0 (V_e =volume d'éluion pour une fraction protéique donnée) nous ont permis de cerner les poids moléculaires de ces fractions.

III-2 RESULTATS ET DISCUSSION.

III-2-1 Fève.

III-2-1-1 *Rendement en protéines des différents isolats protéiques* (cf fig. 1).

III-2-1-1-1 *extraction par l'eau*: le taux moyen de protéines des isolats est de l'ordre de 88%. L'évolution en fonction des différents pH de précipitation révèle 2 maxima aux alentours de pH 3,5 et des pH 5-5,5 où l'on atteint respectivement 93% et 92% (erreur relative sur ces dosages = + ou - 2%).

Le taux moyen d'extraction se situe à 84% et comme pour l'extraction à l'eau, on retrouve deux Z^{ones} optimales vers les pH 3,5 et 5 (respectivement 90 et 88%).

De la comparaison entre les deux types d'extraction ressort une légère supériorité de celles effectuées à l'eau, ce qui confirme nos résultats antérieurs.

L'existence de deux maxima apparaît pour les deux solvants, à deux pH bien différents (3,5 et 5-5,5), et confirme la présence de deux types de protéines ainsi que l'observation faite antérieurement d'une précipitation déjà importante à l'approche de pH 5.

D'après la littérature (1) (2) (13) et les conditions d'extraction qui sont les nôtres, nous avons essentiellement affaire à des globulines constituants protéiques majeurs des légumes secs —, en second lieu à des albumines et fort peu de prolamines et glutélines.

Il semblerait déjà, à ce stade, que deux zones de pH_i (3,5 et 5-5,5) correspondent aux rendements maxima et aux deux types principaux de globulines, la légumine vers pH 3,5 et la viciline vers pH 5-5,5 et ce, pour les deux types d'extraction.

III-2-1-2 *Acides aminés (cf tableau 2).*

III-2-1-2-1 *Extraction à l'eau.* Les meilleures teneurs en acides aminés totaux et essentiels sont trouvées pour la précipitation à pH 5,5 et 5, puis 3,5.

L'indice chimique de la méthionine est maximum aux pH 3,5 et 5.

L'indice chimique de la lysine augmente progressivement depuis les pH les plus acides jusqu'au pH 5,5 où il est maximum.

Or, d'après la littérature (6), la teneur en lysine de la viciline est nettement supérieure d'environ (40%) à celle de la légumine pour *Vicia faba*; cela confirmerait la prédominance de la viciline à pH 5,5.

TABLEAU 2 - *Teneur en protéines et composition en acides aminés des isolats protéiques de fève*

Paramètres	Extraction à l'eau				Extraction à NaCl 0,2 M			
	3,5	4	5	5,5	3,5	4	5	5,5
pH d'extraction	3,5	4	5	5,5	3,5	4	5	5,5
Teneur en protéines	92,8	87,6	91,9	89,4	89,8	85,9	88	75,6
Total ac. aminés	71,3	65,4	84,5	84,5	79,5	72,8	83,8	87,9
Total ac. am. essent.	24,2	23,9	27,3	28,9	27,6	26	28,2	28,5
Ind. chim. MET	26,1	18,8	28,5	18,8	20,6	23	14,8	19
Ind. chim. LYS	53	68,5	74,3	79,8	77,2	73,5	76,5	69,5

III-2-1-2-2 *Extraction par NaCl 0,2 M.*

Comme pour l'extraction à l'eau, les meilleurs scores en acides aminés totaux se rencontrent pour les pH 5 et 5,5 et sont même légèrement supérieurs à ceux que l'on obtient avec l'eau. Il en est de même pour la teneur en acides aminés essentiels.

L'indice chimique de la méthionine est, à la différence de l'eau, maxima à pH 4. Celui de la lysine est ici maxima aux pH 5 et 3,5. L'extraction par NaCl sauvegarde mieux la lysine que par l'eau, mais c'est l'inverse pour la méthionine.

Or, le facteur important apporté par les légumineuses est la lysine, d'où l'intérêt accru pour l'extraction au sel, surtout à pH 5, malgré un rendement global légèrement inférieur.

Par ailleurs, les protéines paraissent mieux fournies et plus équilibrées vers les pH 5 et 5,5 (surtout pour l'eau) qu'à pH 3,5 qui reste cependant intéressant étant donné le rendement global.

III-2-1-3 Comportement électrophorétique (cf fig. 2 et 3).

III-2-1-3-1 *Extraction à l'eau.* Le fractionnement sur gel de polyacrylamide donne une moyenne de 15 bandes (fractions), dont le plus grand nombre aux pH 3,5 et 5,5 (respectivement 16, 15 et 16 bandes).

L'existence de larges bandes correspondant à de fortes concentrations, avec migrations relativement importantes, correspond aux fractions protéiques

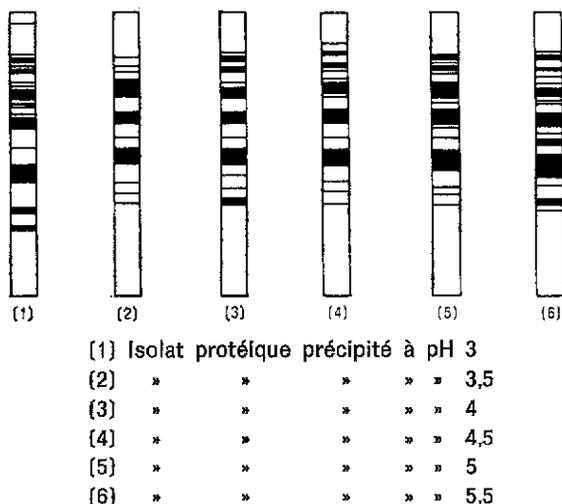


Figure 2 - Comportement électrophorétique des différents isolats protéiques extraits de la farine de fève avec l'eau distillée et précipités à différents pH (3 à 5,5).

à faible poids moléculaire (ici entre 5.000 et 30.000 vu les conditions de l'expérience).

Tous les isolats extraits à l'eau en sont pourvus abondamment et d'autant plus pour ceux précipités à pH 3,5 et surtout 5,5. Par contre les fractions ayant peu migré à poids moléculaires plus élevés (vers 50.000-60.000 ici se trouvent en quantité restreinte, sauf pour l'isolat précipité à pH 3 qui apparaît comme le plus complet avec celui précipité à pH 5,5 (le moins complet se situant à pH 3,5).

Cela confirme la tendance qui s'esquissait avec les teneurs en amino-acides; les protéines sont plus variées vers le pH 5,5 et 5; beaucoup moins à pH 3,5 mais pour ce dernier pH, le rendement quantitatif est élevé.

TABLEAU 3 - Protéines de fèves: A) Extraction par l'eau.

pH Poids moléc.	3,4	3,5	4	4,5	5	5,5	+ sulf. ammon.
	G 75	G 100	G 200				
Fractions lourdes		<u>130000</u>	<u>120000</u>	<u>140000</u>	<u>130000</u>	<u>140000</u>	<u>450000</u>
	<u>55000</u>						<u>200000</u>
Fractions moyennes		40000			40000	40000	<u>35000</u>
	23000	<u>26000</u>	24000	24000	26000	30000	<u>100000</u>
Fractions légères	18000	15000		13000	17000	15000	<u>13000</u>
	<u>55000</u>	11000	9500	6000	4000	4500	<u>7000</u>
Fractions légères	2800	<u>3250</u>	2800	3000		2800	3500
	1000		<u>1700</u>			2000	
Fractions légères	800	500			800		
	<u>350</u>		250	250	250		

B) Extraction par NaCl 0,2 M.

pH Poids moléc.	3	3,5	4,5	5	5,5	+ sulf. ammon.	
	G 100	G 100	G 100	G 100	G 100	G 100	
Fractions lourdes		<u>120000</u>	<u>120000</u>	<u>140000</u>	<u>120000</u>	<u>130000</u>	<u>120000</u>
			85000				<u>75000</u>
Fractions moyennes			48000		48000		
			30000			38000	<u>30000</u>
Fractions légères		<u>28000</u>					
		20000	20000			20000	<u>18000</u>
Fractions légères		11000		15000	13000	13000	
			9500	8000	6500	7500	
Fractions légères		2800	3500		3500	6000	<u>5000</u>
			1800		2800	3000	
Fractions légères		1000		2200	2800		<u>2000</u>
		1000		1200	2000		<u>1000</u>
Fractions légères				500		900	

Répartition par poids moléculaires estimés par chromatographie d'exclusion sur gel des diverses fractions des isolats protéiques de fève. (Cf. pages suivantes). Les PM soulignés en traits pleins correspondent à des fractions décelées en quantités importantes, ceux soulignés en pointillés sont en quantités non négligeables.

III-2-1-3-2 *Extraction avec NaCl 0,2 M* (fig. 3). Ici, le nombre de fractions devient moins important (13 bandes en moyenne), sauf pour l'isolat à pH 3,5 qui en comporte 17. Les fractions à poids moléculaires entre 30.000 et 5.000 sont les plus représentées ici aussi, surtout aux pH 5-5,5 et 3,5 dans une moindre mesure.

Des fractions plus lourdes (50.000) n'apparaissent fortement qu'à pH 3 et un peu à 3,5. Ce dernier pH apparaît ici comme le plus complet.

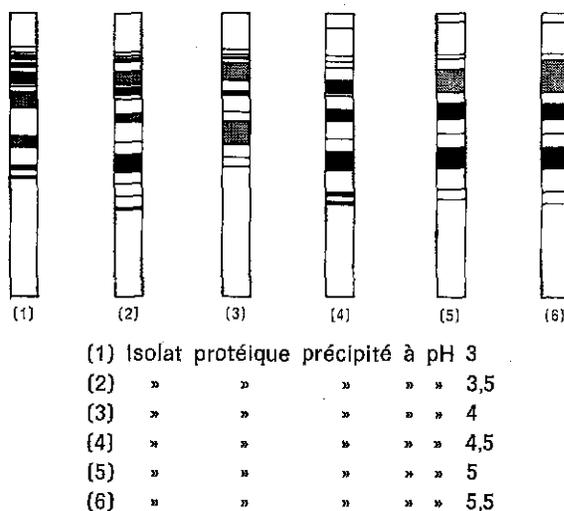


Figure 3 - Comportement électrophorétique des différents isolats protéiques extraits de la farine de fève avec NaCl (0,2 M) et précipités à différents pH (3 à 5,5).

III-2-1-4 *Chromatographie sur gel de dextrane* (Séphadex). Cf fig. 4 à 13 et tableau 3.

III-2-1-4-1 *Extraction à l'eau*. Cf. fig. 4 à 8. A un pH de précipitation de 3,3, c'est à dire dans la zone optimale délimitée par nos travaux antérieurs, nous avons utilisé un gel G 75 qui permet une bonne séparation entre 3.000 et 70.000, ce qui correspond à peu près aux limites de l'électrophorèse décrite aux § III-1-3-3.

Pour les pH 3,5 et au-delà jusqu'à 5,5, il a été utilisé un gel type G 100 permettant de déceler des fractions plus lourdes (jusqu'à 140-150.000).

Au pH 3,3 (G 75) (fig. 4), une fraction protéique de poids mol. d'environ 55.000 constitue la part la plus importante; les fractions moyennes (p. mol. environ 23.000 et 18.000) et légères (p. mol. 5.500, 2.800 et moins de 1.000) apparaissent aussi très nettement.

Au pH 3,5 (G 100) (fig. 5) une fraction lourde apparaît encore plus nettement (p. mol. 130.000) et les fractions moyennes (p. mol. 40.000,

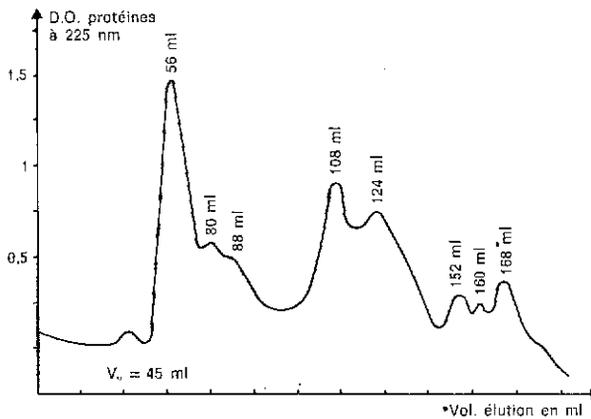


Figure 4 - Profil d'élution sur « G 75 Sephadex » d'un isolat protéique de fève, extrait à l'eau et précipité à pH 3,4.

25.000 à 10.000) et légères (inférieures à 10.000) sont moins nombreuses qu'à pH 3,3. On peut remarquer, à l'appui de cette tendance, que les fractions à l'électrophorèse sont moins nombreuses (13) à pH 3,5 et réaugmentent à pH 3 (16).

Le rendement protéique maxima à pH 3,5 est essentiellement dû à cette fraction de p. mol. élevé (env. 130.000) qui pourrait correspondre à la

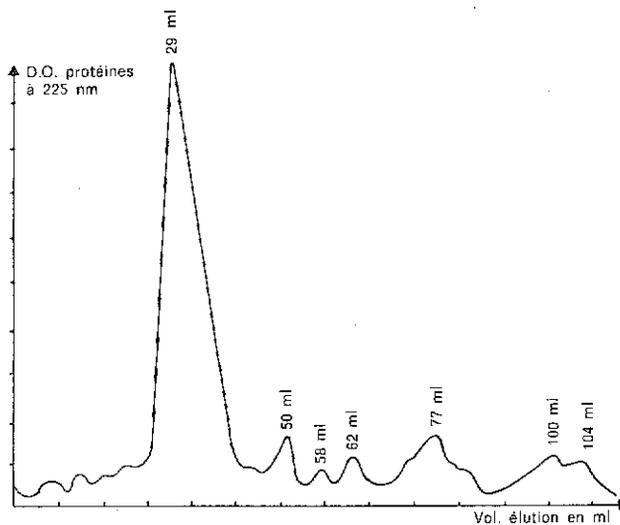


Figure 5 - Profil d'évolution sur gel « Sephadex G 100 » d'un isolat protéiques de fève, extrait à l'eau et précipité à pH 3,5 ($V_0 = 28$ ml).

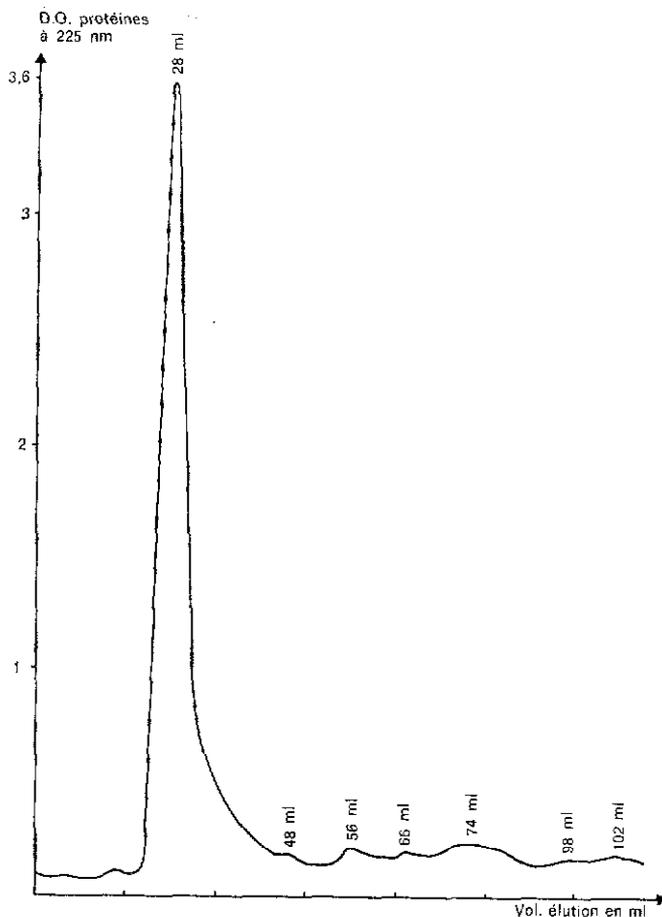


Figure 6 - Profil d'évolution sur gel « Séphadex G 100 » d'un isolat protéique de fève extrait à l'eau et précipité à pH 4,5 ($V_0 = 2,6$ ml)

légumine (ou à l'un de ses polymères, le dimère) d'après la littérature (1)(2).

A un pH un peu plus bas (3,3), un monomère (?), de la légumine (p. mol. 55.000) serait également dominant.

Il semblerait donc qu'à pH 3,5 et dans une moindre mesure quand on se rapproche de pH 3, le rendement protéique est essentiellement dû à des (ou une) fractions de type légumine, ce qui entraîne un profil en amino-acide peu varié à pH 3,5, notamment par rapport aux pH 5 et 5,5. (cf § III-2-1-2-1).

Aux pH 4 et 4,5 (fig. 6), où les rendements protéiques sont les plus faibles, les chromatographies d'exclusion sur gel (G 100) révèlent encore plus nettement la prépondérance d'une fraction quasiment unique (surtout

à pH 4,5) de p. mol. env. 140.000-120.000, analogue à celle citée plus haut et probablement du genre légumine, dont le pH serait de 4,7 (1).

Ceci est confirmé par la diminution de la variété des amino-acides et du nombre de bandes à l'électrophorèse dans une moindre mesure, à ces pH de précipitation; une seule protéine qui n'apparaît pas dans les conditions de l'électrophorèse, sa migration étant nulle, est précipitée à ces pH.

Aux pH et 5,5 qui sont les optima de rendement azoté (fig. 7), la fraction à p. mol. env. 130.000 demeure prépondérante, surtout à pH 5; les fractions moyennes restent très faibles; seules les fractions légères (5 10.000 et jusqu'à 3.000) augmentent par rapport aux pH et 4,5 et 3,5 mais demeurent inférieures à celles décelées à pH 3,3.

Effectivement, aux pH 5 et 5,5, les bandes correspondant à des fractions légères augmentent au niveau des électrophorégrammes et les acides aminés se diversifient avec cette multiplication des fractions protéiques.

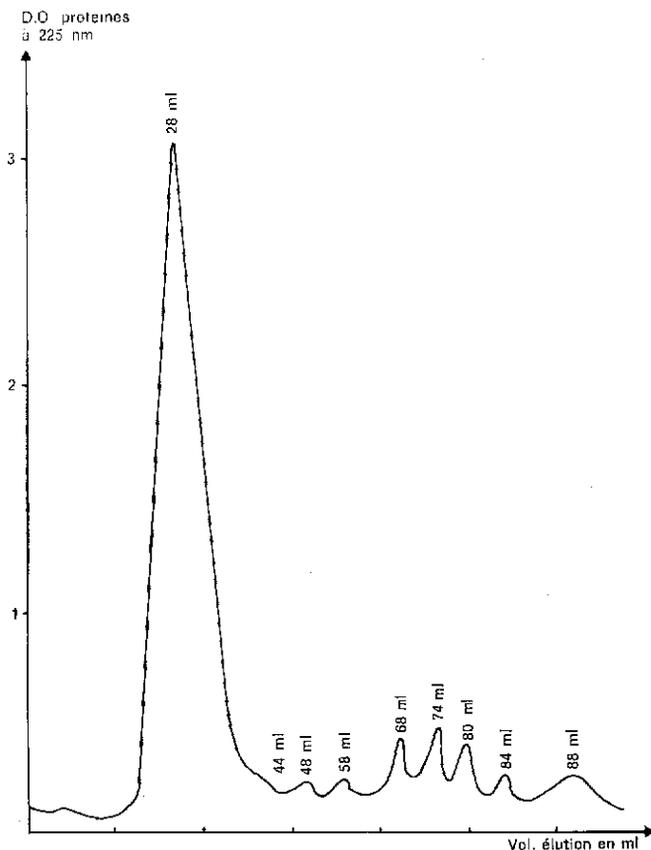


Figure 7 - Profil d'éluition sur gel « Sepadex G 100 » d'un isolat protéiques de fève extrait à l'eau et précipité à pH 5 ($V_0 = 2,8$ ml).

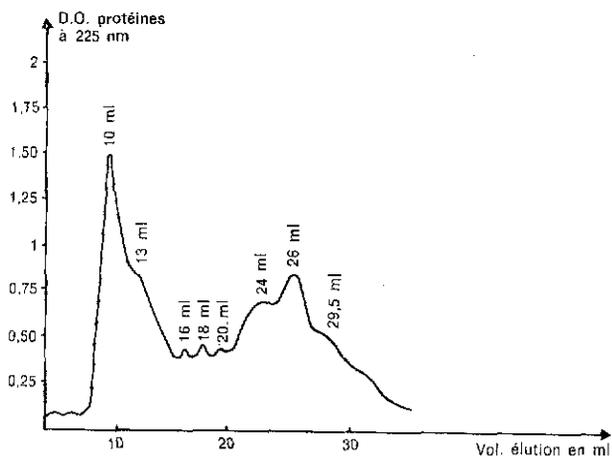


Figure 8 - Profil d'éluion sur gel «Sephadex G 200» d'un isolat proteique de fève extrait à l'eau et précipité au sulfate d'ammonium 100 % de saturation (pH = 9,8) ($V_0 = 9,3$ ml).

Ces pH de précipitation 5 et 5,5 apparaissent ici comme optima du point de vue diversité des protéines récupérées, tout en maintenant un rendement quantitatif à peine inférieur à celui obtenu vers pH 3,5.

Les fractions légères relevées à pH 5 et 5,5 (p. mol. env. 10.000) pourraient être des éléments analogues à la viciline.

Une précipitation au sulfate d'ammonium (cf § III-1-2) a été testée, mais seulement en chromatographie, sur gel G 200, afin de déceler les hauts p. mol. Cette méthode de précipitation est l'une des plus complètes

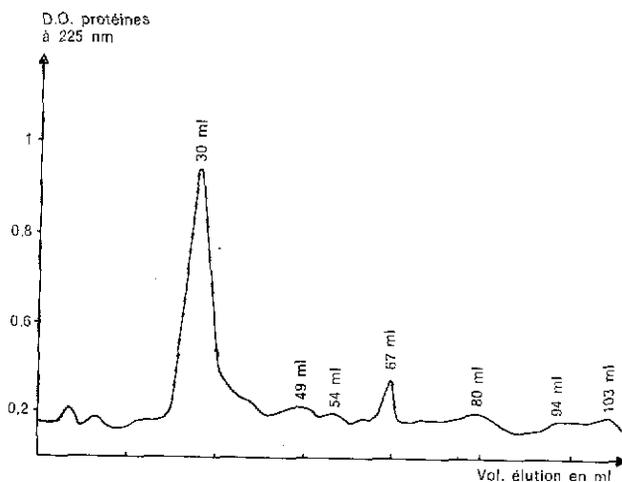


Figure 9 - Profil d'éluion sur gel «Sephadex G 100» d'un isolat proteiques de fève extrait par NaCl 0,2 M, précipité à pH 3 ($V_0 = 2,8$ ml).

(1)(2) et révèle ici (fig. 8) une fraction protéique importante de p. mol. 400.000 et vers 200.000 aussi sans doute.

Des fractions apparaissent aussi vers les p. mol. de 100.000 60.000 et 35.000; des protéines légères (p. mol. 13.000, 7.000 et 4.000) constituent aussi une part importante de l'isolat.

Cette précipitation au sulfate à 100% de saturation donne des fractions très variées, mais nous n'avons pu encore effectuer d'électrophorégrammes et d'aminogrammes notamment. Notons que le pH de précipitation avec le sulfate d'ammonium est de 5,8, donc proche du pH 5,5.

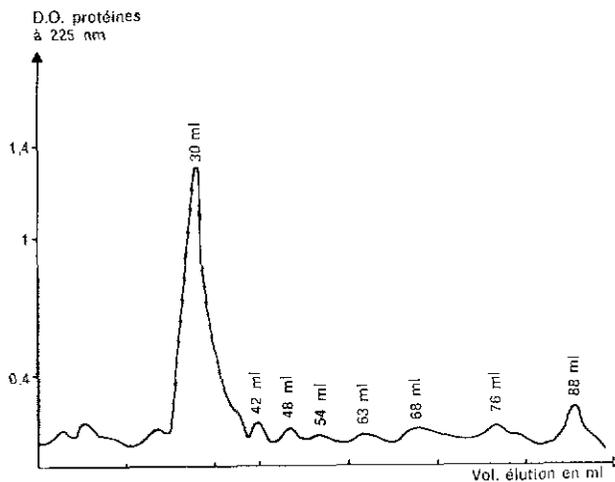


Figure 10 - Profil d'éluion sur gel « Sephadex G 100 » d'un isolat protéique de fève extrait par NaCl 0,2 M, précipité à pH 3,5 ($V_0 = 28$ ml).

La viciline doit se retrouver parmi les fractions importantes décelées vers p. moléculaire 10.000.

Les fractions de haut poids mol. qui, d'après le chromatogramme, constituent plus du tiers de l'isolat (entre 200.000 et 500.000) pourraient être des polymères de la légumine auxquels pourraient être mélangées (séparation insuffisante) des glutélines et prolamines.

III-2-1-4-2 *Extraction avec NaCl 0,2 M* (cf fig. 9 et 13). La précipitation à pH 3 (fig. 9) (gel G 100) révèle une fraction importante vers 120.000 de p. mol. (dimère de la légumine probablement), et une seconde fraction, mais nettement moins importante, vers 11.000 de p. mol. (viciline).

Ces quantités sont cependant faibles, comme le confirment les rendements azotés et l'électrophorèse également ne fait apparaître qu'un nombre limité de bandes (12).

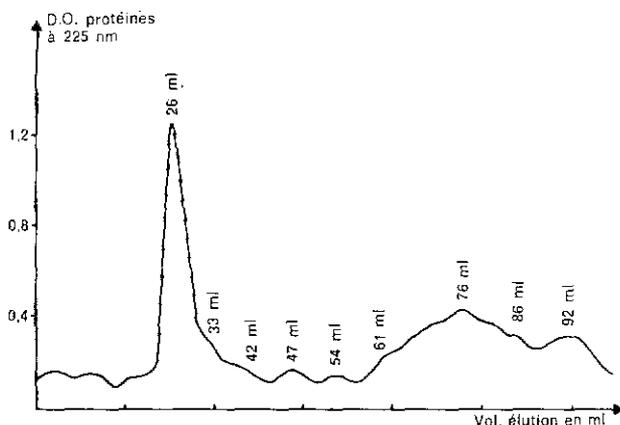


Figure 11 - Profil d'éluion sur gel «Sephadex G 100» d'un isolat protéique de fève extrait par NaCl 0,2 M, précipité à pH 4,5 ($V^{\circ} = 26$ ml).

À pH 3,5 (fig. 10), la fraction de p. mol. env. 120.000 est plus importante et fournit l'essentiel du rendement protéique (légumine). Cependant, de nombreux pics de faibles intensités apparaissent confirmés par l'électrophorèse (17 bandes) mais cela ne suffit pas à enrichir la composition en acides aminés.

Les fractions légères de PM 1.000 à 8.000 sont importantes comme le laisse supposer la largeur des bandes détectées par électrophorèse. Cela contribue à enrichir l'isolat protéique en acides aminés, mais le rendement azoté teste à des taux bas, le pic principal n'étant pas suffisant quantitativement.

Aux pH 5 et 5,5, la fraction essentielle se situe aux PM de l'ordre

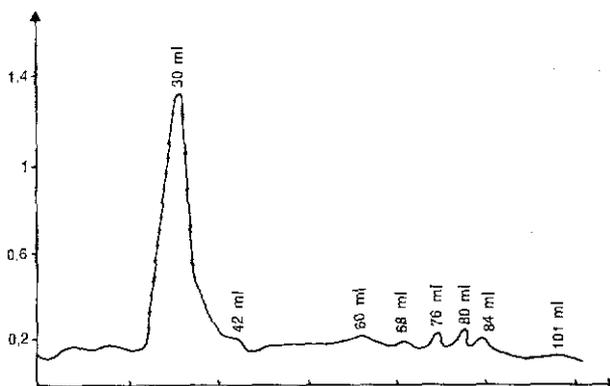


Figure 12 - Profil d'éluion sur gel «Sephadex G 100» d'un isolat protéique de fève extrait par NaCl 0,2 M, précipité à pH 5 ($V^{\circ} = 28$ ml).

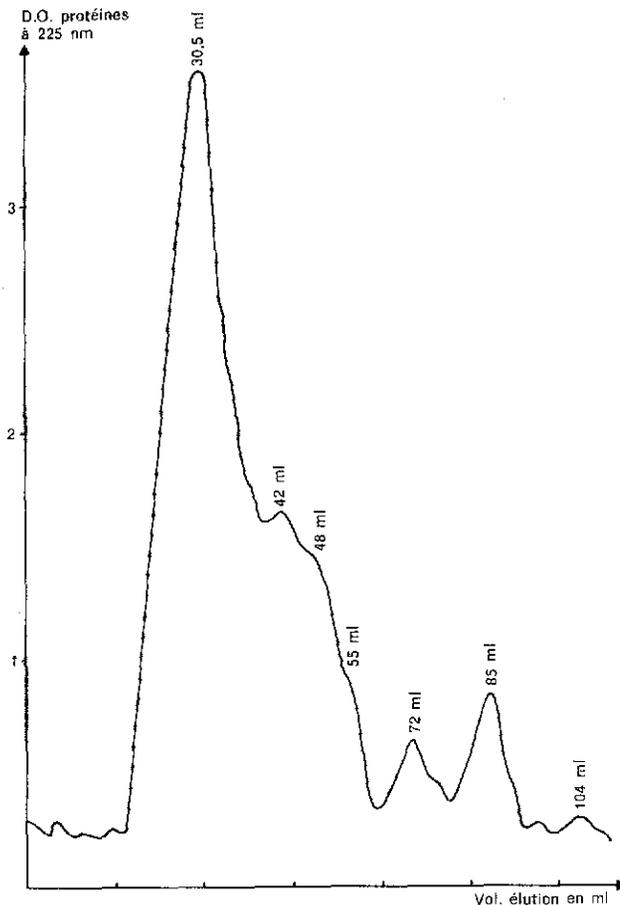


Figure 13 - Profil d'élution sur gel «Sephadex G 100» d'un isolat protéique de fève extrait par NaCl 0,2 M, précipité au sulfate d'ammonium à 100 % de saturation (pH 5,7) ($V_0=28$ ml).

de 130.000 et peu de pics apparaissent pour les PM moyens et bas; cependant, on retrouve, nettement différenciées, trois bandes vers 10.000 qui correspondraient à la viciline (pH_i proche de 5,5). Cette zone se retrouve aux électrophorèses correspondantes aux pH 5 et 5,5.

Le nombre de bandes en électrophorèse n'étant pas plus élevée à ces pH, le rendement important à pH 5 proviendrait essentiellement de la fraction à PM 120.000 et non pas de celle analogue à la viciline dont le pH_i est pourtant proche.

La précipitation au sulfate d'ammonium sur G 100 (fig. 13) à pH 5,7 révèle un pic très important à PM 120.000, des fractions importantes aux PM 48.000, 30.000, et 18.000, et aussi des fractions légères entre les PM 6.000 et 2.000. On retrouve ici un profil aussi riche que dans le cas

de l'extraction à l'eau et précipitation au sulfate, avec des fractions légumineuses, surtout, et viciline importantes.

Les profils chromatographiques apparaissent sensiblement plus complets (comme ceux de l'électrophorèse) avec les extractions à l'eau, comparativement à celles par NaCl. La précipitation au sulfate donne les profils les plus complets, suivis par les précipitations à de pH proches de 3,5 et 5, c'est à dire donnant de bons rendements azotés et proches des pH_i des deux fractions principales des globulines (légumine et viciline).

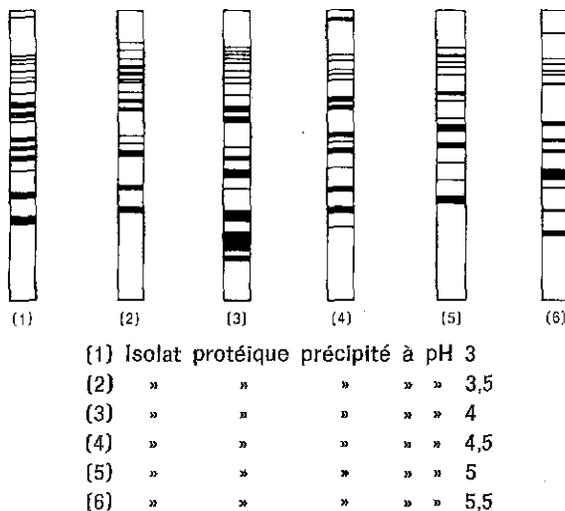


Figure 14 - Comportement électrophorétique des différents isolats protéiques extraits de la farine de pois-chiche avec l'eau distillée et précipités à différents pH (3 à 5,5).

Les extractions, notamment à l'eau, vers pH 5 de précipitation apparaissent comme particulièrement intéressantes (variété des protéines, amino-acides et rendements élevés).

III-2-2 *Pois-chiche.*

III-2-2-1 *Rendement en protéines des différents isolats (cf fig. 1).*

III-2-2-1-1 *Extraction à l'eau.* Le taux moyen de protéines des différents isolats se situe autour de 66%, ce qui est nettement inférieur à celui de la fève.

Un seuil maximum se présente ici en fonction du pH de précipitation, étalé dans la zone de pH 4 à 4,5 (72% de protéines). Cela pourrait faire supposer l'existence de protéines ayant des pH plus rapprochés que pour la fève.

TABLEAU 4 - Composition d'isolats protéiques extraits à partir de la farine de pois chiche en acides aminés.

Solution d'extraction	Eau				NaCl 0,2 M			
pH de précipitation	4,0	4,5	5,5	3,5	4	4,5	5,5	
Teneur en protéines	71,2	72,4	61,7	66,5	67,6	64,1	58,8	
Total ac. aminés	87,4	95,2	80,7	80,4	83	91,7	88,3	
Total ac. am. assent.	23,3	33,3	30,1	29,5	30,8	33,5	27,1	
Ind. chim. MET	49	53	40	33	45	42	23	
Ind. chim. LYS	102	108	88	90	94	91	72	

III-2-2-1-2 *Extraction par NaCl*. Le taux moyen d'extraction s'abaisse à 63%. Un seuil maximum se présente là-aussi, étalé mais décalé vers les pH plus acides (3,5-4) avec un rendement maximum de 67%, ce qui confirme l'existence de pH_i plus rapprochés.

Il ressort ici aussi que l'extraction à l'eau est plus efficace qu'avec NaCl 0,2 M, mais le pois-chiche se prêterait moins bien à l'extraction que la fève; le taux de lipides plus élevé chez le pois-chiche pourrait être un des facteurs gênants.

III-2-2-2 *Acides aminés* (cf tableau 4).

III-2-2-2-1 *Extraction à l'eau* (tab. 4). Les meilleures teneurs en acides aminés totaux et essentiels se situent aux pH 4,5 qui correspond au maximum de rendement protéique.

L'indice chimique méthionine est maxima à ce même pH 4,5, ainsi que celui de la lysine.

Il apparait donc que la richesse maximal en acides aminés coïncide avec la zone optima de rendement azoté.

III-2-2-2-2 *Extraction avec NaCl* (id). Les meilleures teneurs en acides aminés totaux et essentiels se situent aussi à pH 4,5 qui se trouve dans la zone (étalée) optimale de rendement.

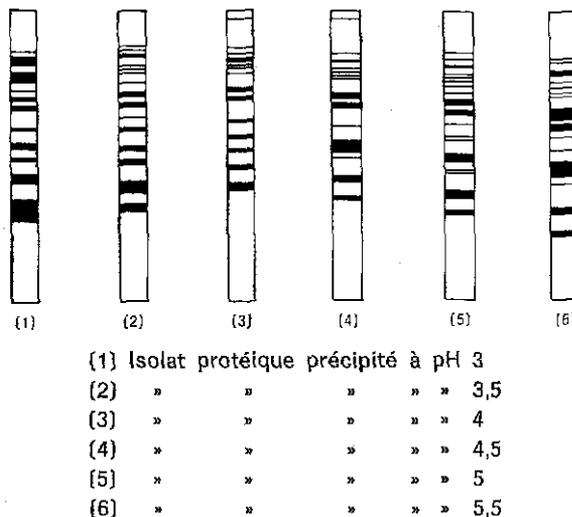


Figure 15 - Comportement électrophorétique des différents isolats protéiques extraits de la farine de pois-chiche avec NaCl (0,2 M) et précipités à différents pH (3 à 5,5).

Les indices chimiques méthionine et lysine sont maxima à pH 4, toujours dans la zone des rendements élevés.

Une analogie entre les deux genres de fractions protéiques extraites avec NaCl et H₂O apparaît.

Les protéines extraites dans les deux cas sont à la fois de bonne teneur en lysine mais aussi et surtout assez peu déficientes en méthionine, notamment pour l'extraction à l'eau; ce qui est particulièrement intéressant pour cette légumineuse et très différent du cas de la fève.

III-2-2-3 Comportement électrophorétique (cf fig. 14 et 15).

III-2-2-3-1 *Extraction à l'eau* (fig. 14). Pour tous les isolats protéiques, l'apparition de larges bandes est beaucoup moins importante que dans le cas de la fève. Néanmoins elles sont beaucoup plus séparées et correspondent à un nombre important de fractions protéiques.

Les fractions légères (poids mol. 20.000) sont les mieux représentées, surtout au niveau des pH optima (rendement et amino-acides), soit pH 4 et 4,5.

Egalement, les fractions ayant peu migré, de p. mol. entre 30.000 et 60.000, sont nombreuses mais à de faibles teneurs, vers pH 4, ce qui entraîne pour cette zone de pH optima, un nombre de fractions protéiques bien supérieur par rapport aux pH « extrêmes » 3 et 5-5,5.

TABLEAU 5 - Répartition des poids moléculaires. Protéines de pois-chiches.

Fraction protéiques	Extraction à l'eau			Extraction par NaCl 0,2 M		
	pH 4	pH 4,5	$+(NH_4)_2SO_4$	pH 4	pH 4,5	$+(NH_4)_2SO_4$
	G 100	G 100	G 100	G 100	G 100	G 100
Fractions lourdes			<u>130000</u>	<u>130000</u>	<u>140000</u>	<u>130000</u>
	<u>100000</u>	<u>115000</u>	<u>67000</u>			
	<u>40000</u>	<u>40000</u>				
Fractions intermédiaires			<u>33000</u>	<u>28000</u>	<u>33000</u>	<u>38000</u>
		<u>26000</u>			<u>20000</u>	
		<u>17000</u>	<u>17000</u>			<u>15000</u>
Fractions légères	<u>13000</u>		<u>13000</u>	<u>10000</u>	<u>10000</u>	
		<u>9000</u>				<u>8500</u>
	<u>8000</u>			<u>7500</u>	<u>7000</u>	
Fractions légères			<u>4800</u>	<u>4800</u>		
	<u>4500</u>					<u>4000</u>
		<u>2800</u>	<u>3000</u>			
Fractions légères	<u>2000</u>					<u>2000</u>
			<u>1700</u>	<u>1700</u>	<u>1500</u>	
			<u>1400</u>			
Fractions légères			<u>900</u>			
	<u>750</u>		<u>750</u>			
	<u>500</u>	<u>500</u>			<u>500</u>	<u>500</u>
Fractions légères			<u>250</u>		<u>250</u>	
	<u>250</u>		<u>250</u>	<u>250</u>		<u>250</u>

Répartition par poids moléculaires estimés par chromatographie d'exclusion sur gel des diverses fractions des isolats protéiques de pois chiche. (Cf. page suivante).

Les PM soulignés en traits pleins sont ceux des fractions décelées en quantités importantes; les PM soulignés en pointillés sont ceux des fractions décelées en quantités non négligeables.

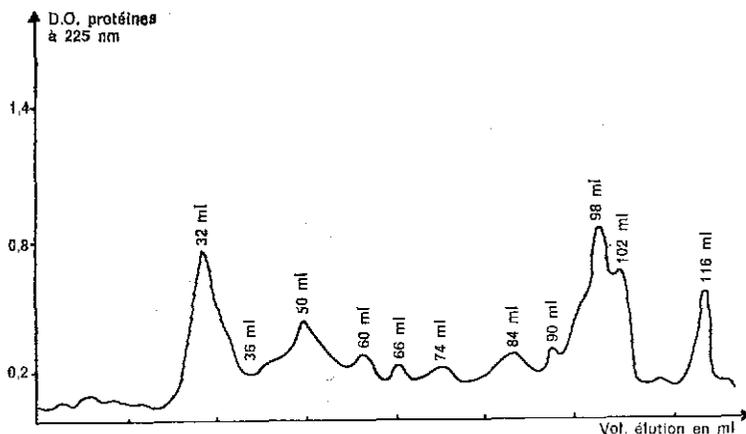


Figure 16 - Profil d'élution sur gel « Sepadex G 100 » d'un isolat protéique de pois-chiche extrait par l'eau, précipité au pH 4 ($V^{\circ} = 28$ ml).

III-2-2-3-2 *Extraction avec NaCl* (fig. 15). Le nombre de fractions demeure élevé (entre 15 et 17 bandes); il y a aussi moins de larges bandes que dans le cas de la fève, mais plus cependant que par extraction à l'eau.

Les fractions les plus légères (p. mol. ≤ 10.000) sont aussi les mieux représentées, surtout pour les pH optima (3,5-4) pour l'aspect rendement azoté et teneur en acides aminés.

Des fractions plus lourdes n'apparaissent en quantité assez importante qu'à pH 3, ce qui n'est pas le cas pour l'extraction à l'eau.

Il ressort de ce qui précède, que les protéines de pois-chiche présentent des comportements sensiblement différents de celles des fèves.

Les extraits protéiques apparaissent beaucoup plus équilibrés et variés avec de nombreuses fractions protéiques, notamment vers 30.000 de p. mol. et de pH_i assez proches.

III-2-2-4 *Chromatographie sur gel type Séphadex G 100* (fig. 16 à 21 et tab. 5).

III-2-2-4-1 *Extraction à l'eau* (fig. 16 à 18). Aux pH de précipitation 4 et 4,5 (fig. 16 et 17), qui ont été les seuls testés pour l'instant, et qui correspondent à la zone optimale de rendement azoté et en acides aminés également, les chromatogrammes apparaissent beaucoup plus variés qu'avec la fève, et confirment les électrophorégrammes.

A pH 4 (fig. 16), il apparaît autant de fractions lourdes (p. mol. 100.000 à 40.000) que légères (de 2.000 à 250), sans négliger plusieurs fractions moyennes (de 15.000 à 5.000).

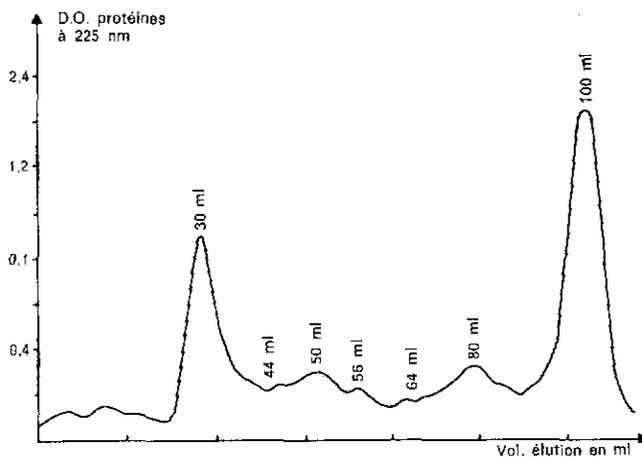


Figure 17 - Profil d'élution sur gel « Sepadex G 100 » d'un isolat protéique de pois-chiche extrait par l'eau, précipité à pH 4,5 ($V^{\circ} = 28$ ml).

A pH 4,5 (fig. 17), le profil est encore plus accentué aux 2 extrêmes de p. mol., avec une fraction lourde (environ 115.00) et une fraction légère de p. mol. env. 500 (peptides) très accentuée.

Cela correspond à un optima du nombre de fractions en électrophorèse, ainsi que sur les plans rendements azoté et en acides aminés.

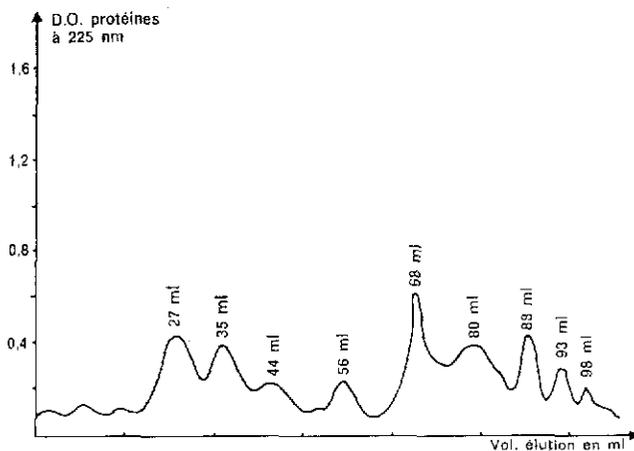


Figure 18 - Profil d'élution sur gel « Sepadex G 100 » d'un isolat protéique de pois-chiche extrait à l'eau et précipité au sulfate d'ammonium à 100 % de saturation ($V^{\circ} = 26$ ml).

La précipitation au sulfate d'ammonium à 100% de saturation montre un profil chromatographique (fig. 18) encore plus varié et homogène, très diversifié en fractions d'importance à peu près égale, depuis poids mol.

130.000 jusqu'à moins de 250, avec une prédominance cependant de fractions légères (p. mol. $\leq 3.000 \rightarrow$ peptides).

III-2-2-4-2 *Extraction avec NaCl 0,2 M* (fig. 19-21). A pH 4 (fig. 19), le profil est moins riche en fractions diverses et la part de la fraction lourde s'accroît (poids mol. environ 130.000), ainsi que celle de la plus légère (p. mol. environ 1.000).

Mais les quantités demeurent élevées, suffisamment pour être dans la zone optimal de rendement, grâce surtout à la fraction lourde (analogue de la légumine?).

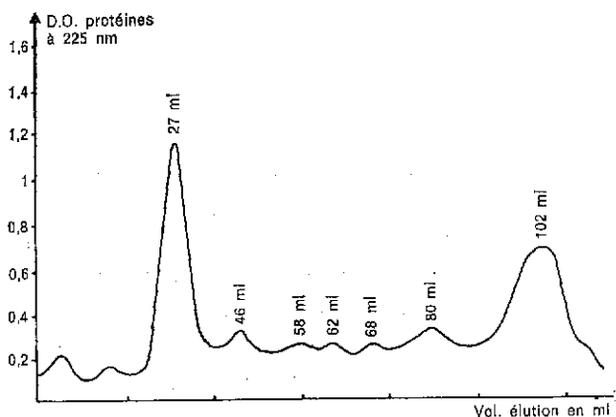


Figure 19 - Profil d'éluion sur gel « Sepadex G 100 » d'un isolat protéique de pois-chiche extrait par Na Cl 0,2 M, et précipité à pH 4 ($V^{\circ} = 26$ ml).

A pH 4,5 (fig. 20), le profil rest varié mais d'intensité plus faible; le rendement protéique et en amino-acides commencent à diminuer à ce niveau. La fraction lourde (p. mol. d'env. 140.000) devient dominante, et de nombreuses fractions moyennes et légères sont d'intensités faibles comme le montre aussi l'électrophorogramme.

Avec la précipitation au sulfate (fig. 21), la fraction lourde devient totalement prépondérante (p. mol. env. 130.000). Le profil est beaucoup moins riche (bien qu'il s'agisse d'une précipitation au sulfate) que ceux obtenus dans la zone des pH optima.

Il apparaît qu'avec NaCl 0,2 M comme solvant d'extraction, les isolats sont beaucoup moins riches en fractions protéiques diverses et pourtant en amino-acides, ainsi qu'en quantité de protéines, qu'avec l'extraction à l'eau.

La part prise par les fractions lourdes (analogues de la légumine) s'accroît avec l'emploi de NaCl et d'autant plus que l'on remonte le pH de précipitation (avec le sulfate, la précipitation a lieu à pH 5,7).

C'est la tendance inverse qui se dégagerait avec la fève.

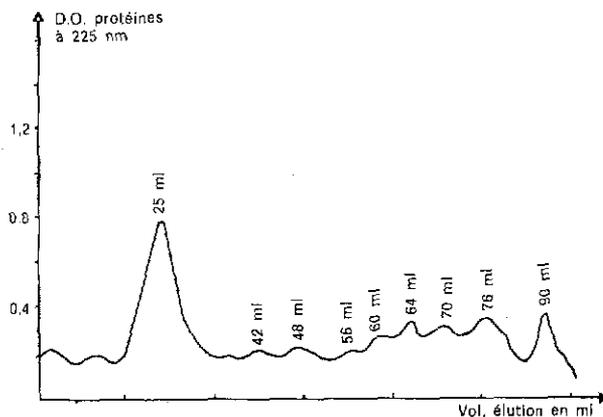


Figure 20 - Profil d'éluion sur gel « Sepadex G 100 » d'un isolat protéique de pois-chiche extrait par NaCl 0,2 M, et précipité à pH 4,5 ($V_0 = 25$ ml).

Les extraits protéiques de pois-chiche se confirment comme plus équilibrés que ceux de la fève, en acides aminés et protéines variées, notamment moyennes et légères (donc plus solubles et plus assimilables).

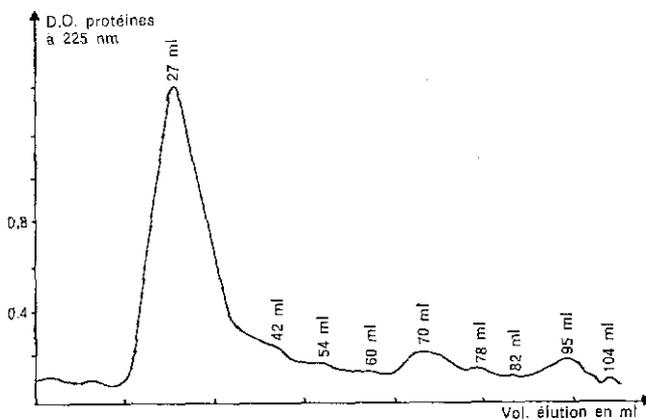


Figure 21 - Profil d'éluion sur gel « Sepadex G 100 » d'un isolat protéique de pois-chiche extrait avec NaCl 0,2 M et précipité au sulfate d'ammonium à 100 % de saturation ($V_0 = 26$ ml).

Seul le rendement azoté reste inférieur, malgré cette solubilité accrue d'une part au moins des protéines de pois-chiche, ce qui peut s'expliquer par la teneur en lipides plus élevée et peut-être aussi par la présence de protéines plus lourdes, non extraites ici, et qui constituent une part importante du profil protéique (la littérature dont nous disposons à ce sujet étant assez restreinte...).

Il apparaît que les protéines de fèves se différencient nettement en deux groupes; l'un vers 130.000 de poids moléculaire (légumine), l'autre vers 30.000 à 10.000 de p. mol. (viciline), quelles que soient les conditions d'extraction et de précipitation.

Ce n'est pas le cas pour le pois-chiche où les fractions sont beaucoup moins différenciées en groupes distincts. Les protéines extraites sont généralement moins lourdes que dans le cas de la fève.

La fraction analogue de la légumine (poids mol. 130.000) est toujours extraite en quantité notable pour les deux espèces.

Des pH de précipitation optima (on dehors de celle au sulfate: référence) se situent vers 5 et 3,5 pour la fève. La zone de pH proche de 5 donne des isolats de compositions protéiques plus variées qu'à pH 3,5, pour des rendements sensiblement équivalents.

Pour le pois-chiche, la zone optimale de précipitation se situerait aux alentours de pH 4 et serait même très comparable à celles au sulfate. Les isolats obtenus sont plus variés que pour la fève (la teneur en méthionine notamment s'améliore); mais les rendements quantitatifs restent inférieurs (présence de lipides?).

Les extractions à l'eau sont sensiblement plus riches (acide aminés) que celles avec NaCl 0,2 M.

Cette étude est évidemment très partielle et incomplète; nombre de tendances restent à confirmer.

Il serait notamment nécessaire de reprendre les fractions protéiques principales séparées aux pH intéressants cités plus haut, pour l'analyse électrophorétique (avec une échelle de séparation plus large qu'actuellement), pour évaluer les amino-acides, non seulement par hydrolyse acide, mais basique et enzymatique.

Des chromatographies sur divers types de gel de dextrane devraient compléter celles effectuées essentiellement sur G 100.

Des éléments et propriétés caractéristiques de protéines devraient être entrpris sur les fractions principales (teneur en soufre, phosphore, caractérisation des glyco et lipo-protéiques, acides nucléiques, tests immunologique, facteurs antinutritionnels: inhibiteurs trypsiques, phosphore phytique, vicine, convicine, propriétés fonctionnelles).

Parallèlement, les oses et oligosaccharides pourraient être décelés sur les surnageants.

Des tests biologiques in-vivo devraient accompagner l'étude biochimique de ces fractions protéiques.

L'étude sur le pois-chiche apparaît comme la plus intéressante surtout si les rendements quantitatifs sont améliorés.

Il s'agit donc ici d'un préambule à un travail de longue haleine et dont les applications pour la fabrication de concentrés protéiques ou de préparations nouvelles de ces légumes secs pourraient être des plus prometteuses.

RESUME.

Dans la première partie, la supériorité de l'extraction des protéines à l'eau, suivie de celle avec NaCl 9,2 M, sont confirmées sur la lentille comme c'était déjà le cas pour la fève et le pois-chiche.

L'emploi de moyens analytiques plus complets que dans nos premiers travaux sur les isolats protéiques, laisse apparaître des comportements très différents pour la fève et le pois-chiche.

Les pH de précipitation optima (en dehors de celle au sulfate: référence) se situent vers 5 et 3,5 pour la fève. La zone de pH proche de 5 donne des isolats de compositions protéiques plus variées qu'à pH 3,5, pour des rendements sensiblement équivalents.

Pour le pois-chiche, la zone optimale de précipitation se situerait aux alentours de pH 4 et serait même très comparable à celles au sulfate. Les isolats obtenus sont plus variés que pour la fève (la teneur en méthionine notamment s'améliore) mais les rendements quantitatifs restent inférieurs (présence de lipides?).

Les extractions à l'eau sont sensiblement plus riches (acides aminés) que celles avec NaCl 0,2 M.

Une étude plus fine des principales fractions protéiques est envisagée.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) BOULTER D., JACKSON P., TURNER D. A., 1968 - *Comparison of some properties of vicilin and legumin isolated from seeds of Pisum sativum, Vicia faba and Cicer arietinum.* « New Physiologist », 68, 25-33.
- (2) DANIELSON C. E., 1949 - *Seed globuline of the gramineae and leguminoseae.* « The Biochemical Journal », 44, 385-400.
- (3) LETERMAN H., 199 - *Chromatographie sur gel.* Masson ed.
- (4) FAN T. Y., SOSULKI F. W., 1974 - *Dispersibility and isolation of proteins from legume flours.* « Can. Inst. Food Sci. Techno. J. », 7, n. 4, 236-293.
- (5) KANDE J., 1967 - *Valeur nutritionnelle de deux graines de légumineuses: le pois chiche et la lentille.* « Ann. Nut. Alim. », Vol. XXI, n. 2, 45-47.
- (6) MAC LESTERS R. C., HALL T. C., SUN M. S., BLISS A., 1973 - *Comparison of globulin proteins from Phaseolus vulgaris with those from Vicia faba.* « Phytochemistry », 12, 85-93. Pergamon press.
- (7) OSBORNE T. B., 1974 - *The vegetable proteins.* Chez Longmas, Green and Co., London.
- (8) RADHA PANT, TULSIANI D. R. P., 1969 - *Solubility amino acid composition and biological evaluation of proteins isolated from leguminous seeds.* « J. Agr. Food Chem. », 17, n. 2, 361-366.

- (9) SATTERLEE L. D., BEMBERS M. and KENDRICK J. G., 1975 - *Fonctionnal propertis of the great northern bean protein isolate*. « J. of Food Sc. », 0D, 81-84.
- (10) SCHOLTZ G., RICHER J., MANTEUFEL R., 1974 - *Studies on seed globulins from legumes preparation and purification of legumin and vicilin from Vicia faba by zone precipitation*. « Biochem. Physiol. Pflanzen », Bd 166, 163.
- (11) WEBER R., 1972 - *Analytical nitrogen determination by the automated method*. « Technicon report », n. 6.
- (12) WEBER R., 1969 - *Molecular weight determination on polyacrylamide gel electrophoresis*. « Biol. Chem. », 244, n. 16, 4408-4412.
- (13) WERMER G., JAFFE, HANNONG K., 1965 - *Fractionation of proteins from kidney beans*. « Archives of Biochemistry and Biophysics », 109, 80-91.