

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

(Obtention de concentrates et isolats protéiques).

par BERNARD ANTHELME

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

RESUME.

Les paramètres optima d'extractions des protéines ont été étudiés pour le pois-chiche et la fève. Pour cette dernière, le pH optimum d'extraction se situe à pH 8 (le minimum de solubilité étant à pH 3,8).

Pour le pois-chiche, le pH optimum se situe à 10 (mais pour ne pas altérer trop les protéines, un pH pratique de 8,5 paraît soutable) et le pH minimum se situe à 4. En outre, la mouture doit être la plus fine possible.

Un rapport solvant/solide de 10/1 est recommandé. Un délipidage préalable, un chauffage léger (40 °C.) améliorent légèrement l'extraction.

La durée pratique optimale d'extraction est de 30 mn.

Environ 3/4 des protéines initiales peuvent être ainsi extraites.

Celles-ci appartiennent à peu d'espèces moléculaires (globulines surtout) et on extrait essentiellement deux groupes, l'un vers 130.000 de poids moléculaire, l'autre vers 30.000 de P.M..

L'extraction par des solutions salines (NaCl 0,5 et 1 Molaire) apparaît également prometteuse.

En outre, ces traitements d'extraction feraient sensiblement baisser les teneurs en facteurs anti-nutritionnels propres à ces légumineuses.

I. INTRODUCTION.

Dans les travaux antérieurs (cf. 1 et 1 bis), nous avons essentiellement abordé les conditions optimales d'obtention d'isolats protéiques de légumes secs sous l'angle de la pureté maximale du précipitat en protéines. Le rendement réel par rapport à la quantité de protéine de l'échantillon de farine testé n'avait pas été étudié.

Dans le compte-rendu exposé ci-après, nous avons essentiellement étudié les divers paramètres influant sur le rendement protéique de la première phase d'obtention de l'isolat protéique, à savoir l'extraction des protéines de la farine sous la forme d'un « concentrat » liquide.

Nous avons également revu les rendements protéiques finals au niveau de l'isolat protéique (après sa précipitation) des essais effectués auparavant (cf. 1 et 1bis).

En outre, nous avons abordé l'évolution de quelques facteurs anti-nutritionnels au niveau du « concentrat » protéique (phase initiale d'extraction) par rapport à la farine non traitée, à savoir:

- les glucides fermentescibles;
- le facteur anti-trypsique;
- les hémagglutinines;
- l'acide phytique.

Cet ensemble d'essais a porté surtout sur le pois-chiche (variété Aïn Témouchent) et sur la fève (variété Sidi Moussa), seulement pour l'étude de l'influence du pH sur le rendement d'extraction protéique.

II. MATERIELS ET METHODES.

II-1 MATERIELS.

Le pois-chiche (*Cicer arietinum*), variété Aïn Témouchent, l'une des plus répandues en Algérie, a été notre matériel principal d'essais. La fève (*Vicia faba*), variété Sidi Moussa, également l'une des plus répandues en Algérie, a servi seulement pour des essais de rendement d'extraction en fonction du pH (cf. III-1-1-2).

Ces deux espèces végétales pures provenaient des champs d'essais de l'Institut de Développement des Grandes cultures (récolte 1976) et ont été stockées en bocaux de verre à + 4°C.

II-2 METHODES.

II-2-1 Méthodes d'extraction des protéines.

Les pois-chiches et fèves triées, nettoyées et dépelliculées manuellement, ont subi un broyage-mouturage donnant 90% des particules de farine de $\varnothing \leq 0,2$ mm (mouture « fine »).

Les farines obtenues ont été également stockées à + 4°C.

L'extraction a été réalisée selon le procédé de base suivant:

10 g de farine fine sont mélangés à 100 ml de solution (eau distillée + HCl ou NaOHN pour ajuster le pH, ou + NaCl 0,5 ou 1 M) dans un bécher de 300 ml.

L'échantillon est agité par agitation magnétique réglée sur une intensité fixe mais non évaluée, pour tous les essais.

Pour l'étude du paramètre température, le bécher a été calorifugé et mis sur une plaque chauffante magnétisée réglée à la température désirée. La solution d'extraction était aussi ajoutée à la température voulue.

Le pH de la suspension agitée est mesuré en début et fin d'extraction. L'échantillon est ensuite centrifugé à 3500 t/mn dans une centrifugeuse réfrigérée à + 4° C. pendant 10 mn (environ 1.000 g).

Le surnageant est recueilli, son volume mesuré et trois prélèvements de 2 ml sont effectués pour le dosage de l'azote, pour chaque échantillon.

II-2-2 METHODES D'ANALYSES.

*II-2-2-1 *Humidité*: elle a été effectuée sur les farines stockées par séchage à l'étuve à 103° C. des échantillons pendant 5h (pesée avant et après séchage).

*II-2-2-2 *Azote*: la méthode employée est celle de Kjeldahl (minéralisation de 2 ml d'H₂SO₄ concentré et une pincée de catalyseur de Dumazer et Marcellet; puis distillation par entrainement à la vapeur dans un appareil « Büchi », recueil du distillat dans l'acide borique à 4% et titrage par H₂SO₄ N/50 au moyen d'une burette automatique « dosimat » en revenant au pH de la solution d'acide borique diluée initiale — titrage plus précis qu'avec l'indicateur de Tashiro —).

Le taux de protéines a été calculé comme étant égal à 6,25 fois le taux d'azote trouvé.

*II-2-2-3 *Délipidation*: un échantillon de farine de pois-chiche a été délipidé par extraction à l'appareil de Soxhlet durant 6h. avec l'éther, avant d'en extraire les protéines.

*II-2-2-4 *Chromatographie sur gel de polyholoside*: deux extraits protéiques de pois-chiches furent chromatographiés sur gel G 100 de dextrane (« Séphadex »).

1 ml de concentrat liquide (surnageant) à teneur en protéine connue, fut amené à pH 8,2 par addition de TRIS en poudre, et dilué par 1 ml de tampon TRIS-HCl à pH 8,2 (ajout aussi de 2 mg/ml de Bleu Dextran 2.000 et de 2 gouttes de bleu de bromophénol).

0,5 ml de cette solution protéique a été déposé sur une colonne de gel « G 100 » de hauteur de gel égale à 210 mm et de Ø: 16 mm. Le débit de cette colonne était de 30 ml/h et le solvant d'éluion était du tampon TRIS-HCl à pH 8,2.

Les fractions recueillies étaient passées en U.V. à 225 nm, et des étalons protéiques ont été passés pour tester et étalonner la colonne.

*II-2-2-5 Facteurs anti-nutritionnels.

§§ II-2-2-5-1 *Glucides fermentescibles*. Nous avons étudié les sucres éthanosolubles totaux, extraits par la méthode de Cerning (2) et dosés par l'anthrone dans l'extrait protéique et la farine de pois-chiche.

Nous avons également dosé les sucres réducteurs simples et disaccharides par la méthode de Bertrand dans les deux produits.

La différence entre les sucres éthanosolubles totaux et la somme des sucres réducteurs + les disaccharides donne une évaluation des sucres fermentescibles.

(En effet, les sucres éthanosolubles comprennent essentiellement les sucres réducteurs, les disaccharides et les sucres fermentescibles; ainsi par différence d'avec les sucres réducteurs + les disaccharides, il est possible d'évaluer les sucres fermentescibles).

(Pour des raisons matérielles — manque de bio-gel P2 — nous n'avons pu effectuer une analyse plus précise des divers sucres fermentescibles sur une colonne de bio-gel - Tollier (3) et révélation à l'orcinol).

§§ II-2-2-5-2 *Facteur anti-trypsique*. Nous avons déterminé l'activité de l'inhibiteur trypsique par la méthode de Kunitz, modifiée par Kakade, Simons et Liener (4) et qui consiste à mesurer l'activité trypsique in vitro de l'extrait végétal (1 g de farine de pois-chiche, ou le volume d'extrait protéique correspondant à 1 g de farine, soit 8 ml dans le cas de l'essai, sont traités par NaOH 0,01 N pour extraire l'inhibiteur).

Le substrat employé est la BAPA (N-Benzoyl-DL-Arginine p. nitroaniline hydro chlorhydrique) qui par hydrolyse donne une coloration jaune à 410 nm, proportionnelle à la quantité de trypsine présente. Nous avons utilisé de la trypsine d'origine bovine (3,5 U/g).

§§ II-2-2-5-3 *Hémagglutinines*. Nous avons utilisé la méthode de Liener (5) qui consiste à mesurer l'activité des hémagglutinines par leur pouvoir d'agglutiner les hématies.

L'extraction des hémagglutinines a été effectuée sur 10 g de farine de pois-chiche. Pour l'extrait protéique, l'extraction préalable ne nous a pas parue utile et nous avons dosé directement sur le surnageant protéique.

Le dosage s'effectue par lecture visuelle de l'agglutination dans une série de tubes contenant du sang de rat dilué et des dilutions de 1 à 1/800 de l'extrait végétal après 3 h de repos des tubes.

§§ II-2-2-5-4 *Acide phytique*. La méthode utilisée est celle de Holt (6). Il s'agit d'une extraction à l'acide nitrique sur 5 g de farine de pois-chiche ou sur l'équivalent en volume d'extrait protéique, soit ici: 40 ml.

A une prise d'essai de l'extrait contenant les phytates, préalablement filtré, on ajoute une solution de fer et on chauffe pour former une complexe phytate-fer. On dose ensuite le fer en excès par spectrophotométrie à 580 nm, par rapport à une solution témoin de phytate de sodium traitée dans les mêmes conditions (courbe-étalon).

L'ensemble de ces dosages a été réalisé trois fois pour chaque essai, et la moyenne des trois mesures a été prise comme résultat; seule, la chromatographie sur gel de dextrane n'a été réalisée qu'une fois par essai.

III. RESULTATS ET DISCUSSION.

III-1 ETUDE DES CONDITIONS D'EXTRACTION.

III-1-1 *Influence du pH du milieu d'extraction.*

*III-1-1-1 *Cas du pois-chiche* (cf. graphique 1 et tableau 1) les différentes extractions ont été réalisées dans la gamme des pH de 2 à 11, dans les conditions suivantes:

- temps d'extraction: 30';
- température: 22° C;;
- solvant: eau distillée;
- rapport solvant/solide: 10/1 (10 g de farine pour 100 ml de solution aqueuse au pH voulu);
- centrifugation: 10' à environ 1.000 g.

Il apparait, d'après la figure 1, que le rendement minima, correspondant au pH_i global des protéines se situe à pH 4. C'est également le pH correspondant à la plus grande pureté de l'isolat protéique dans nos travaux antérieurs (cf. 1 et 1bis).

Le minimum de solubilité serait donc à pH 4 pour les protéines de pois-chiche prises dans leur ensemble.

La solubilité maximale des protéines se situerait à pH 10 (optima du graphe). Mais à ces pH fortement alcalins, les dénaturations des protéines risquent d'être importantes (7) et abaisseraient ainsi la valeur biologique du concentrat.

Un pH d'environ 8,5 donne un bon rendement d'extraction en limitant les risques de dénaturation alcaline. Au-delà de 8,5, l'augmentation de solubilité est faible.

Un pH supérieur à 7-7,5 apparait comme étant le pH minima d'extraction pour obtenir un rendement suffisant.

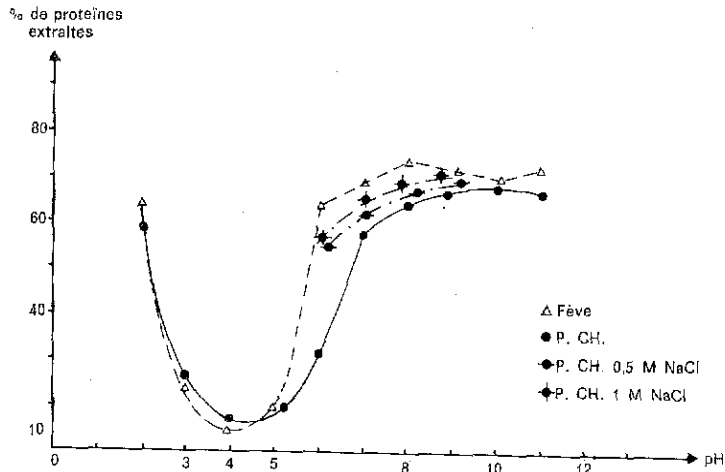


Figure 1 - Rendement d'extraction protéique en fonction du pH.

La précipitation devra s'effectuer, elle, à un pH de 4.

Il est à remarquer aussi que le volume de l'extrait recueilli (V_R) n'est jamais identique au volume de solvant initial et que V_R diminue à peu près linéairement au fur et à mesure que le pH s'élève (cf. fig. 1bis).

*III-1-1-2 *Cas de la fève* (cf. tabl. 2 et figures 2 et 1bis) il s'agit des mêmes conditions d'extractions que pour le pois chiche.

La solubilité minimum des protéines, correspondant au pH isoélectrique global de l'ensemble des protéines se situe à un pH très voisin de celui du pois-chiche, quoique sans doute légèrement inférieur, vers 3,8.

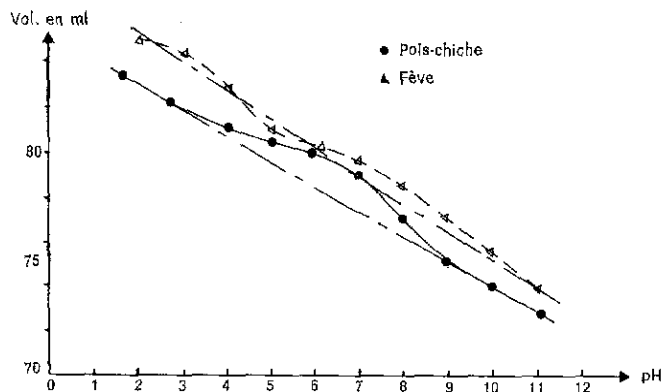


Figure 1 b - Variation du volume d'extrait en fonction du pH.

TABLEAU 1 - Influence du pH sur la solubilité des protéinases (rendement d'extraction) dans le surnageant. Cas du pois-chiche.

pH initial	pH final	volume du milieu d'extraction en ml: V	volume de l'extrait recueilli en ml: V _r	protéines extraites en mg/ml	protéines totales extraites en mg	% de protéines extraites	V/V _r	% de prot. ex. / V _r extrait
2,10	2,05	101	83	15,91	1320,90	59,5	0,82	72,5
3,05	3,10	101	82	7,04	577,20	26	0,81	32,1
4,00	4,10	102	81	4,27	346,30	15,5	0,79	19,6
5,00	5,10	101	80,5	5,04	406,25	18,3	0,797	22,9
6,10	6,05	100	80,2	8,72	699,30	31,5	0,802	39,3
7,05	6,90	100,8	79	16,55	1307,58	58,9	0,783	75,2
8,05	7,90	100,6	77	18,74	1443	65	0,765	85
9,00	8,85	101	75	20,13	1509,6	68	0,743	91,5
9,95	9,80	100,5	74	21,30	1576,20	71	0,736	96,4
11,00	10,80	100,5	73	20,38	1487,40	67	0,726	92,3

N. B.: La quantité de protéines contenues dans l'échantillon de 10 g de farine à 12% d'humidité, est dans tous les cas de 2220 mg, soit 22,2 % ou 25,22 % en poids sec.

Nous avons trouvé dans nos précédents travaux (fig 1, 1bis), deux zones de pH donnant les plus fortes teneurs en protéines pour l'isolat protéique, l'une à 3,5, l'autre à pH 5. Mais l'extraction se faisait dans ces essais, avec de l'eau distillée, ou de l'eau + NaCl, à un pH de 6,5 où le maximum de protéines n'étaient pas extraites. Le pH_i que nous trouvions pour l'isolat protéique ne correspondait qu'à une partie des protéines extraites.

Ici, l'extractibilité maximale se situe à pH 8 et s'abaisse légèrement ensuite aux pH très alcalins (et donc dénaturants). La solubilité est déjà forte à partir du pH 6, et ces deux points différencient la fève du pois-chiche.

Une extraction à l'eau ou avec NaCl, c'est à dire à des pH plus faibles (vers 6,5), pourraient convenir pour les farines de fèves. (bien qu'une alcalinité légère à pH 8 soit préférable); alors qu'un pH d'extraction de 8 minimum est nécessaire pour optimiser le rendement quantitatif en azote.

Par ailleurs là aussi, le volume d'extrait recueilli décroît linéairement avec l'augmentation du pH du milieu d'extraction (fig. 1bis).

Cela signifierait que dans les deux cas, plus le pH augmente et plus la rétention d'eau par le culot qui contient des protéines (environ 30% dans

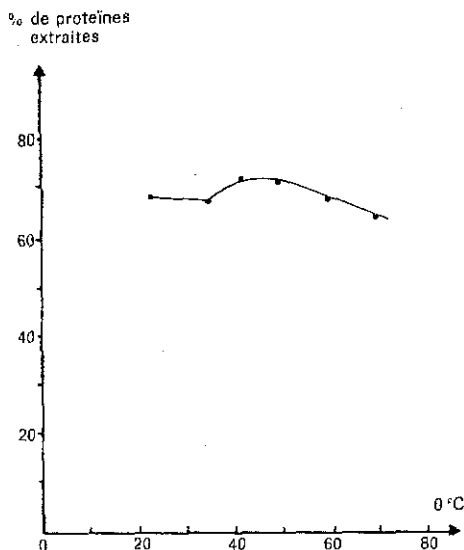


Figure 2 - Rendement d'extraction protéique en fonction de la température (P. CH.).

les cas les plus faibles) et surtout de l'amidon et des glucides divers, est importante.

Une étude plus détaillée des protéines extraites, de celles restant dans le culot, et des autres composants (amidon, cellulose, etc) serait nécessaire pour expliciter cette évolution de la capacité de rétention d'eau.

Par ailleurs, 25 à 30% des protéines seraient difficilement extractibles par le biais de la seule influence du pH et environ 15% apparaissent comme très difficilement précipitables par le pH, et ce pour les deux espèces végétales.

Il serait intéressant d'analyser plus finement les protéines des deux phases (surnageant et culot) pour ces deux cas opposés (pH optima de précipitation et d'extraction).

TABLEAU 2 - Influence du pH sur la solubilité des protéines de fèves (rendement d'extraction protéique dans le surnageant).

pH initial	pH final	volume de milieu d'extraction en ml: V	volume de l'extrait recueilli en ml: V _R	protéines extraites en mg/ml	protéines totales extraites en mg	% de protéines extraites	V/V _R	% de pr. ex. vol. extr.
2,00	2,15	101	85	20,58	1749,6	64,8	0,84	77,1
3,00	3,20	100	84,5	5,21	444,0	20,0	0,845	23,6
4,05	4,20	100	83	5,04	418,5	15,5	0,83	18,7
5,00	5,10	100	81	6,87	556,2	20,6	0,81	25,4
6,05	6,10	100	80	21,87	1749,6	64,8	0,80	81
7,00	6,85	100	79,5	23,54	1871,1	69,3	0,795	87,2
8,10	7,80	100	78,5	25,66	2014,2	74,6	0,785	95,03
9,05	8,70	100	77	25,18	1938,6	71,8	0,770	93,25
10,10	9,70	100	75,5	25,18	1900,8	70,4	0,755	93,25
11	10,85	100	74	26,64	1971,0	73	0,74	98,65

N. B.: Chaque échantillon de 10 g de farine de fève contient 2700 mg de protéines. Toutes les farines sont à 12 % de teneur en eau (31 % de protéines par rapport à la matière sèche).

III-1-2 Influence de la concentration saline: (avec NaCl et seulement pour le pois-chiche) cf. tableau 3 et figure 1.

Les conditions d'extraction sont identiques aux précédentes; mais il a été ajouté à la solution d'extraction du chlorure de sodium, soit à la concentration de 0,5 M, soit à celle de 1 M.

Les pH étudiés n'ont été que de 6 à 9 dans ces deux cas.

Il est à remarquer ici, que le volume de surnageant recueilli est, dans tous les cas, pratiquement identique et égal à 82 ml.

La rétention d'eau par le culot est identique quel que soit le pH.

Les différences de rendements d'extraction protéique sont assez faibles, que l'on ait affaire à une solution saline M, 0,5 M ou sans NaCl, avec cependant une légère amélioration de l'extractibilité quand la concentration en NaCl augmente; ceci pour les pH entre 7 et 9.

Au pH 6 par contre, le rendement est nettement amélioré par l'ajout de NaCl à la solution d'extraction (presque doublé).

Cette différence importante serait à vérifier pour les pH inférieurs à 7 et

TABLEAU 3 - Influence de la concentration saline à différents pH sur l'extractibilité des protéines de pois-chiche.

NaCl	pH initial	pH final	% de protéines extraites	protéines extraites en mg	protéines en mg/ml de surnageant
0 M	6,10	6,05	31,5	699,30	8,72
	7,05	6,90	58,9	1307,6	16,55
	8,05	8,00	65	1443,1	18,74
	8,95	8,85	68	1509,6	20,13
0,5 M	6,20	6,20	55,8	1238,7	15,11
	7,15	7,15	63,5	1409,7	17,19
	8,10	7,85	66,5	1476,3	18,00
	9,00	8,85	68,5	1520,7	18,55
1 M	6,20	6,15	56,6	1256,52	15,32
	7,15	7,10	66	1465,20	17,87
	8,10	7,65	68,2	1514,04	18,46
	9,05	8,70	70	1554,00	18,95

TABLEAU 4 - Influence de la température d'extraction sur la solubilité des protéines dans le surnageant (pois-chiche).

température extraction en °C.	pH initial	pH final	V vol. en ml du milieu d'extraction	V _R vol. d'extrait recueilli en ml	V/V _R	protéines totales en mg ds l'extrait	protéines en mg/ml ds l'extrait	% d'extraction	% d'extraction vol. recueilli
23	8,9	8,5	100	82	0,82	1509,6	18,40	68	82,9
35	9,1	8,6	101	82,5	0,816	1487,4	18,02	67	82,1
42	9,0	8,6	100	80	0,80	1593,9	19,92	71,8	89,75
50	8,6	8,1	100	77	0,77	1576,2	20,47	71	92,2
60	8,8	8,4	100	74	0,74	1487,4	20,10	67	90,54
70	8,6	8,1	100	70	0,70	1398,6	19,98	63,5	90,71

pourrait entraîner un pH_i (pH de précipitation des protéines) beaucoup plus faible quand la force ionique du milieu s'accroît.

Il serait nécessaire aussi pour optimiser la concentration en NaCl, d'établir les courbes de relargage des protéines, en fonction du pH et de la température.

III-1-3 Influence de la température d'extraction: (pois-chiche) cf. tableau 4 et figure.

Nous sommes placés ici dans un cas d'extraction optimale; c'est à dire à un pH de 8,5 à 9 (tabl. 4), avec par ailleurs, des conditions identiques aux précédentes et dans une plage de température allant de 23°C. à 70°C.

Au-delà, et même à 70°C., les risques d'altération par la chaleur et surtout le coût calorique rendent les essais peu intéressants pour une application industrielle.

Le rendement d'extraction protéique passe par un optima (cf. fig. 2) entre 40° et 50°C. (vers 42°C.); cependant l'augmentation de solubilité des protéines à ces températures n'est pas très importante par rapport à l'échan-

tillon non chauffé. D'autant plus qu'à ces températures, les risques de prolifération des germes mésophiles sont importants.

Il est à noter que le volume d'extrait recueilli diminue fortement quand la température s'élève. Une évaporation de vapeur d'eau démarre en fait vers 60°C. Par rapport au coût calorifique, le chauffage ne paraît pas très probant pour augmenter le rendement.

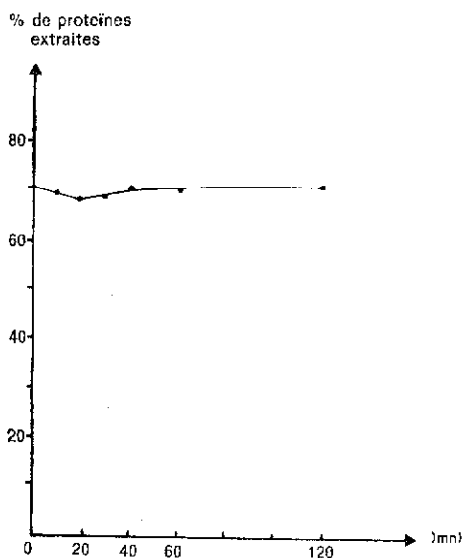


Figure 3 - Rendement d'extraction protéique en fonction de la durée (P. CH.).

III-1-4 Influence du temps d'extraction: (cf. tabl. 5 et fig 3).

Les conditions d'extraction, là aussi, sont identiques aux précédentes, sauf la durée de celle-ci qui varie de 10 mn à 120 mn.

Le pH d'extraction est de 8,5 environ dans tous les cas (tab. 5).

Seul, le pois-chiche a été testé.

On peut remarquer que le volume recueilli diminue très légèrement avec la durée d'extraction; un contact prolongé permettrait un accroissement des liaisons de l'eau avec les macro-molécules du culot et ainsi une plus grande rétention d'eau.

Le prolongement de l'extraction n'augmente que très légèrement et sans que cela soit significatif, le rendement d'extraction. Par contre, cela alourdirait les coûts de façon importante.

Une durée de 10-15' suffit pratiquement à assurer une extr. satisfaisante.

TABLEAU 5 - Rendement d'extraction protéique en fonction de la durée d'extraction (cas du pois-chiche).

temps en mn	pH initial	pH final	V volume d'extraction en ml	V _R volume recueilli en ml	V/V _R	protéines en mg/ml ds l'extrait	protéines totales en mg ds l'extrait	% d'extraction	% d'extraction $\frac{V}{V_R}$
10'	8,7	8,4	100	82	0,82	18,68	1531,8	69,5	84,7
20'	8,8	8,4	100	82	0,82	18,41	1509,6	68	82,9
30'	8,6	8,3	101	81,5	0,806	18,79	1531,8	69	85,6
40'	8,9	8,5	100	82	0,82	18,95	1554	70	85,4
60'	8,8	8,4	100	81	0,81	19,24	1558,4	70,2	86,7
120'	8,9	8,5	100	80	0,80	19,54	1562,9	70,4	88

N. B.: La température est de 23 °C. dans tous les cas.

III-1-5 Influence du rapport solvant sur solide: (pois-chiche) (cf. tabl. 6).

Les conditions d'extraction demeurent identiques, mais l'on n'a pris, ici, que 5 g de fraine de pois-chiche, dilués respectivement dans 25,00 et 100 ml de solution basique (pH 8,6 environ) pour obtenir les rapports 5/1, 10/1, 20/1.

TABLEAU 6 - Influence du rapport solvant/solide sur la solubilité des protéines du pois-chiche.

rapport solvant/solide	pH initial	pH final	volume d'extract. en ml	V _R en ml	protéines ds l'extrait en mg/ml	protéines extraites en mg	rendement d'extraction en %
5/1	8,7	8,5	25	20,5	25,5	522,75	47
10/1	8,7	8,5	50	40	19,01	760,35	68,5
20/1	8,7	8,5	100	80	9,68	774,78	69,8

Quand le volume d'extraction est faible (5/1), la quantité de protéines extraites est faible; mais une augmentation de la dilution (20/1) n'entraîne qu'une très légère amélioration de l'extractibilité, alors qu'elle nécessiterait industriellement, des appareils de capacité double.

La concentration de 25 mg/ml de protéine dans l'extrait, apparaît comme voisin d'un seuil de saturation en protéine.

Le rapport de 10/1 apparaît comme le plus compatible avec les exigences de rendement et d'économie.

III-1-6 *Influence de la délipidation sur l'extractibilité des protéines du pois-chiche.*

Nous avons opéré dans les mêmes conditions que les essais précédents (conditions « optimales »), mais avec une farine délipidée au préalable. (0,56 g de lipides ont été enlevés par une extraction au Soxhlet de 6 h sur 10 g de farine).

— pH initial: 8,7	— volume recueilli: 84 ml
— pH final: 8,5	— teneur protéique de l'extrait: 20,27 mg/ml
— température: 23°C.	— quantité de protéines: 1682,76 mg (90%/vol. recueilli)
— durée: 30 mn	
— volume d'extraction: 100 ml	
— rendement: 75,8%	

L'extractibilité s'améliore d'environ 10% par rapport à l'extraction « optimale » sur une farine non délipidée.

Il s'agit donc d'un facteur non négligeable dans le cas du pois-chiche où la teneur en lipides est plus importante que pour la fève ou la lentille par exemple.

Les lipides entraveraient quelque peu l'extraction des protéines en solution basique (cela n'a pas été vérifié en solution saline), mais il est possible que ces lipides aient un rôle à jouer en ce qui concerne les propriétés fonctionnelles du concentrat protéique (rôle de liant...); leur analyse pourrait se révéler intéressante à ce sujet.

III-1-7 *Influence du degré de finesse de la mouture de farine de pois-chiche.*

Là encore, les conditions d'extraction sont « optimales » avec un pH initial de 8,5, un pH final de 8,25 (durée: 30 mn; température: 23°C.; solvant/solide: 10/1, etc.).

Dans un cas (1), 90% des particules de farine avaient un $\varnothing \leq 0,2$ mm (mouture « fine » qui est d'ailleurs celle utilisée dans tous les essais); dans l'autre cas (2), il y avait seulement 30% des particules de farine à avoir un $\varnothing \leq 0,2$ mm; 30% étaient comprises entre 0,2 et 0,5 mm et 40% $\geq 0,5$ mm (farine dite « grossière »).

Nous avons déjà vu l'importance de ce facteur, degré de finesse de la mouture, pour l'obtention d'un isolat de pureté maximale en protéines (cf. 1, 1b); nous le retrouvons ici pour l'optimisation de l'extraction.

Les résultats (toujours moyenne sur trois essais) furent les suivants:

moutures	volume extraction en ml	volume recueilli	V/V _R	protéines mg/ml	protéines totales en mg	rendement en %	$\frac{\text{rendement}}{V_R}$
(1) Farine fine	100	80	0,80	18,65	1491,8	67,2	84
(2) Farine grossière	100	82	0,82	11,91	976,8	44,1	53,8

III-2 CHROMATOGRAPHIES SUR GEL DE DEXTRANE D'EXTRAITS PROTEIQUES DE POIS-CHICHE (cf. fig. 4 et 5).

Nous avons effectué deux chromatographies sur gel type « Séphadex »

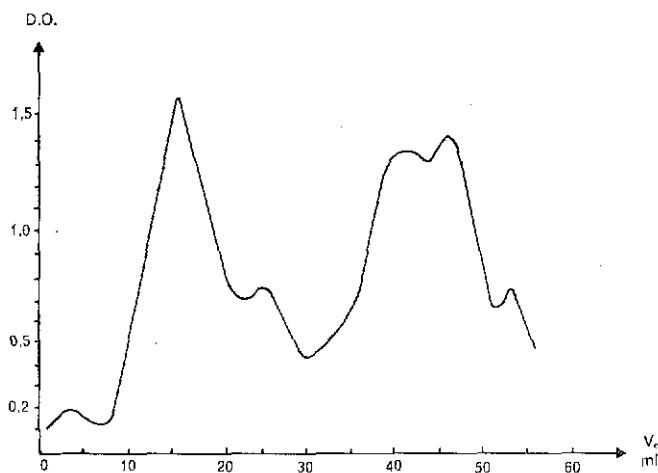


Figure 4 - Profil d'éluion sur gel « Séphadex G 100 » d'un extrait protéique dans les conditions « optimales » de rendement (P. CH.).

G 100" (cf. méthodes), l'une sur un extrait protéique préparé dans des conditions « optima » d'extraction:

- | | |
|-------------------|------------------------|
| — pH initial: 8,5 | — solvant/solide: 10/1 |
| — pH final: 8,2 | — température: 23° C. |
| — durée: 30 mn | — mouture fine |

l'autre, dans les mêmes conditions, mais avec une farine délipidée au préalable.

Dans les deux cas, il n'y a eu qu'un seul essai de chromatographie, et d'autre part, la hauteur de gel n'était pas suffisante pour une séparation fine (notre débit d'élution était trop rapide par conséquence).

Cependant, comparativement notamment aux chromatogrammes des isolats protéiques de nos travaux antérieurs (cf. 1, 1b), on peut établir quelques remarques.

Dans tous les cas, apparaît un pic important vers 120-13.000 de poids moléculaire qui correspondrait à un analogue de la légumine.

La délipidation favoriserait cette extraction de la légumine, qui est la protéine quantitativement la plus importante; d'où un rendement quantitatif amélioré lorsque l'extraction porte sur une farine délipidée.

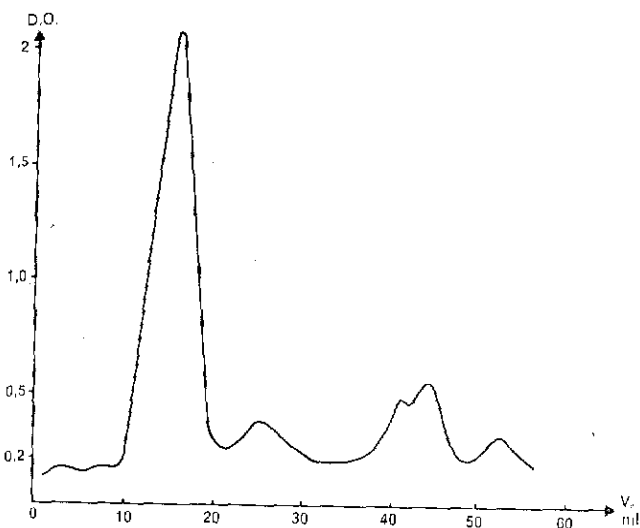


Figure 5 - Profil d'élution sur gel « Sephadex G 100 » d'un extrait protéique (condition « optimales ») issu d'une farine délipidée de P. CH.

Pour les protéines de poids moléculaires plus bas, vers 35.000 (analogue de la viciline?) et vers 6.000 et en-deça, l'extrait protéique non délipidé semblerait en contenir beaucoup plus que l'isolat protéique.

Par contre, l'extrait protéique délipidé serait moins riche en ces protéines de poids moléculaires plus bas. La délipidation ne favoriserait pas l'extraction des protéines légères (et notamment de l'analogue de la viciline), mais ces protéines influent peu sur le rendement quantitatif.

Globalement, le concentrat (extrait) protéique non délipidé, pour un rendement quantitatif satisfaisant, apparaît plus riche en protéines diverses, avec 4 grands groupes de molécules protéiques, l'un vers 120.000 (analogue de la légumine?)

le second vers 35.000 (analogue de la viciline?);

le troisième vers 6.000 (fractions mal séparées de 4.000 à 10.000 environ);

et une dernière fraction, assez mal séparée aussi, vers 1.000 de poids moléculaire;

que l'extrait issu de farine délipidée (où l'on retrouve cependant ces 4 groupes principaux).

Il semblerait aussi, comparativement aux essais antérieurs, qu'ensuite, lors de la précipitation de l'extrait protéique, la perte soit plus importante, relativement, pour les fractions de poids moléculaires 35.000 environ (analogue de la viciline?), et aussi pour les fractions allant de 4.000 à 10.000.

Mais ces deux essais chromatographiques demeurent insuffisants; une meilleure séparation est nécessaire (emploi d'autres types de gel), ainsi qu'une étude de chacune des principales fractions (aminogrammes).

Il serait intéressant aussi, de comparer avec un extrait protéique par une solution saline.

III-3 ETUDE DE QUELQUES FACTEURS ANTI-NUTRITIONNELS DE L'EXTRAIT PROTEIQUE DE POIS-CHICHE.

Cette étude des facteurs anti-alimentaires, qui n'est qu'un dégrossissage, a seulement porté sur l'extrait protéique (le culot n'a pas été étudié) d'une seule espèce végétale, le pois-chiche.

Nous avons procédé à une extraction dans les conditions dites «optimales», avec un pH initial de 8,5 et un pH final de 8,2, au bout de 30 mn d'extraction.

III-3-1 *Sucres fermentescibles.*

Nous avons dosé les sucres éthanisolubles et les sucres réducteurs et

dissaccharides (cf. méthodes), et par différence, une évaluation approchée des sucres fermentescibles (cf. tableau 7).

TABLEAU 7 - *Evolution des sucres dans l'extrait protéique.
Farine de pois-chiche.*

Echantillons	Sucres éthanosolubles	Sucres réducteurs + dissaccharides	Sucres fermentescibles (par différence)
Farine (sur 10 g)	850 mg	570 mg	280 mg
Extrait protéique issu de 10 g de farine	120 mg	95 mg	25 mg

L'extrait protéique renfermerait environ le 1/10 des sucres fermentescibles de la farine initiale (mais nous n'avons pas encore vérifié si le culot retenait la majeure partie des galactosides fermentescibles).

D'autre part, cette évaluation par différence n'est qu'une approche pour évaluer les sucres fermentescibles; une chromatographie sur gel type Bio-gel P2 reste à effectuer.

III-3-2 *Facteur anti-trypsique.*

Nous avons dosé ce facteur dans 1 g de farine de pois-chiche non traitée, et dans la quantité d'extrait (surnageant) correspondant à 1 g de farine.

Une unité trypsique est définie, arbitrairement, comme une augmentation de 0,01 unité d'absorbance à 410 nm et à la température du laboratoire (T.U. = Trypsine Unité).

L'activité de l'inhibiteur trypsique est ensuite considérée comme étant le nombre d'unités trypsiques inhibées (T.U.I.).

Nous avons trouvé 8.500 T.U.I./g de farine non traitée et 6.600 T.U.I. dans le volume d'extrait correspondant à 1 g de farine (c'est à dire dans 8 ml d'extrait, 10 g de farine ayant abouti à un volume d'extrait de 80 ml).

Le pois-chiche contient peu d'inhibiteur trypsique (et peu de facteurs anti-alimentaires) comparativement aux autres légumineuses; cependant la majeure partie de l'inhibiteur se retrouve dans l'extrait (environ les 3/4). Nous n'avons pas là aussi, effectué encore une vérification dans le culot. L'inhibiteur trypsique étant de nature protéique (du type globuline de poids moléculaire assez bas, environ 10.000), la majeure partie serait donc extraite avec les protéines du surnageant.

Le traitement d'extraction alcaline ne serait donc pas efficace à ce niveau; il faudrait vérifier si la précipitation en vue d'obtenir l'isolat apporterait une évolution différente.

III-3-3 *Hémagglutinines.*

La détermination de l'activité hémagglutinique par l'agglutination observée visuellement sur l'extrait protéique permet de voir que sans aucune dilution, cette agglutination est déjà pratiquement inexistante, alors que pour la farine non traitée il faut diluer au 1/100 pour n'avoir plus d'activité agglutinante.

Les hémagglutinines du pois-chiche, faiblement présentes de toutes façons, ne sont que très peu extraites par la solution alcaline contrairement au facteur anti-trypsique vu précédemment. Pourtant il s'agit de glycoprotéines de P.M. environ 130.000 qui devrait bien s'extraire par le procédé employé.

III-3-4 *Acide phytique.*

Nous avons trouvé ici 36,3 mg d'acide hpytique pour 10 g de farine brute, et seulement 15,1 mg dans l'extrait protéique correspondant à ces 10 g de farine. Un peu moins de la moitié environ de l'acide phytique initiale, se retrouve donc dans l'extrait protéique.

L'extraction des composés phytiques est facilitée en milieu acide; nous sommes ici en milieu alcalin (pH 8,2) et l'extraction est donc relativement faible.

III-4 ETUDE DES RENDEMENTS PROTEIQUES OBTENUS SUR LES ISOLATS DE POIS-CHICHE ET FEVE PREPARES DANS LES TRAVAUX PRECEDENTS (1, 1b).

Avant d'entamer les conclusions générales qui se dégagent de l'étude de l'extrait protéique (surnageant) de fève et surtout de pois-chiche, et afin de les compléter, nous avons repris les teneurs en protéines et matières sèches des isolats (précipitats issus du surnageant protéique) étudiés précédemment (cf. 1; 1b) pour déterminer les rendements finals en protéines (cf. tab. 8 et 9 ci après).

A la lumière de ces deux tableaux 8 et 9, on mesure tout d'abord la différence entre pureté de l'isolat (par exemple 93% dans le cas de la fève extraite à l'eau à pH 6,3 et précipitée à pH 3,5) et le rendement final en protéines par rapport aux protéines de la farine brute (35% pour ce même cas).

(Il est à signaler que les rendements intermédiaires, au niveau de l'extrait

TABLEAU 8 - *Rendement protéique des isolats de pois-chiche (extraits par l'eau distillée et par NaCl 0,2 M et précipités à différents pH).*

pH de précipitation	Isolat protéique extrait avec eau à pH final de 6,4		Isolat protéique extrait avec NaCl 9,2 M dans eau à pH final de 6,5	
	teneur en protéines de l'isolat en %	rendement protéique en %/ farine initiale	teneur en protéines de l'isolat en %	rendement protéique en %/ farine initiale
4	71,2	37	67,6	43
4,5	72,4	39	64,1	39,8
5	70	40	62,2	38,9
5,5	61,7	35,5	58,8	37,9

TABLEAU 9 - *Rendement protéique des isolats de fève (extraits par l'eau distillée et par NaCl 0,2 M et précipités à différents pH).*

pH de précipitation	Isolat protéique extrait avec eau à pH final de 6,3		Isolat protéique extrait avec NaCl 9,2 M à pH final de 6,4	
	teneur en protéines de l'isolat en %	rendement protéique en %/ farine initiale	teneur en protéines de l'isolat en %	rendement protéique en %/ farine initiale
3,5	93	35	89,8	37
4	87,5	33,2	86	34,6
4,5	87	32,8	87	34
5	92	33,7	88	35
5,5	89,5	33,2	76	32,8

protéique — surnageant —, n'avaient pas été étudiés dans ces essais antérieurs).

Pour l'isolat de pois-chiche extrait à l'eau, le rendement protéique est de 40% à pH 5 (maximum); le rendement est légèrement meilleur (43%) par une extraction avec NaCl 0,2 M, mais précipité à pH 4, ce qui correspond au minimum du graphique 1 (cf. plus haut).

Dans les deux cas, l'extraction ne s'est effectuée ni à un pH ou à une concentration saline optima, d'après nos essais d'extraction évoqués plus haut, et les pertes sont importantes surtout à l'extraction (qui ne doit pas dépasser 50% de rendement), et aussi à la précipitation.

Dans le cas des isolats issus de fève, le rendement final le meilleur n'excède pas 35% et est dans l'ensemble, très légèrement meilleur avec une extraction préalable avec NaCl.

Le pH optima de précipitation se situe à 3,5 pour les deux types d'extraction, ce qui correspond assez bien au minimum du graphique 2 (cf. pages antérieures).

Le pH d'extraction serait ici plus proche des pH optima d'après le tableau 1 bis évoqué précédemment, le rendement d'extraction devait se situer vraisemblablement vers 60-65%. Les pertes ont dû ici se produire surtout à la phase de précipitation, puisque le rendement final est faible, plus encore que pour le pois-chiche.

Ainsi, la phase de précipitation apparaît comme une source de pertes importantes; de là, l'intérêt qu'il pourrait y avoir à s'arrêter au stade du concentrat.

III-5 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.

Les paramètres d'extraction les plus importants sont le degré de finesse de la mouture et le pH. Ceci était déjà valable pour obtenir des isolats protéiques les plus purs possibles.

L'extraction par NaCl paraît également intéressante, notamment quand il s'agit d'une extraction à l'eau distillée, sans ajout de soude pour augmenter le pH jusque vers 8,5.

Cette influence positive des solutions salines serait encore plus accentuée pour le cas du pois-chiche que pour la fève; les rendements terminaux au niveau de l'isolat protéique sont supérieurs pour le pois-chiche (40% en moyenne pour les différents pH de précipitation) que pour la fève (35%).

Les autres paramètres (durée, température, rapport solvant/solide, délipidage préalable) n'ont pas eu d'effet déterminants.

Un léger chauffage vers 40° C. et une délipidation améliorent d'environ

10% le rendement; mais, étant donné leur coût économique, leurs intérêts apparaissent très discutables.

Dans le cas du délipidage, en outre, l'extrait protéique, s'il est légèrement plus concentré (+10% environ), apparaît moins riche en protéines diverses comme le révèle le chromatogramme sur gel de dextrane.

L'extraction protéique permet pour les deux espèces étudiées, de récupérer 3/4 des protéines initiales; ce qui laisse supposer que celles-ci appartiennent à peu d'espèces moléculaires, d'où une récupération relativement aisée. Cela est d'ailleurs confirmé par les profils chromatographiques.

L'extraction protéique est intéressante aussi en tant que traitement entraînant une perte de facteurs anti-nutritionnels; ceci serait surtout le cas pour les sucres fermentescibles, les hémagglutinines, également pour l'acide phytique, et dans une moindre mesure, pour le facteur anti-trypsique.

La précipitation qui suit pour obtenir l'isolat confirmera-t-elle ces tendances? Cela reste à vérifier.

Cette étude a surtout porté sur le pois-chiche, légumineuse peu fournie en facteurs anti-alimentaires; il sera nécessaire d'étudier cela sur la fève qui est beaucoup plus riche en facteurs gênants.

Cependant, cette étude a été pour l'instant, localisée à la phase d'extraction où d'ailleurs certains paramètres restent à inventorier, tels l'influence du dépelliculage, du type et de l'intensité de l'agitation, recyclage du culot pour une nouvelle extraction...

La phase de précipitation n'a été étudiée que partiellement dans les travaux précédents, sous l'angle pureté de l'isolat et non du rendement.

Les différents culots ou surnageants intermédiaires qui ne sont pas repris, n'ont pas été étudiés.

Nous ne connaissons pas le type de protéines restant dans le culot par exemple.

L'aspect valeur qualitative de l'extrait, reste aussi à aborder, la composition en acides aminés, étude plus détaillée sur gel de dextrane et électrophorogrammes, la composition en sucres et amidon, en lipides, ceci comparativement à l'isolat protéique final.

Enfin, les propriétés fonctionnelles de l'extrait et de l'isolat restent à inventorier (taux de réhydratation, pouvoir gélifiant, moussant, etc.).

Mais les rendements trouvés à l'extraction sont encourageants et laissent augurer des applications économiquement possibles.

BIBLIOGRAPHIE

(dans l'ordre d'apparition dans l'exposé)

- * (1) ANTHELME B., BEN ALI S., DJADLI A., IORDACHE C., LAMBERT J., 1976 - *Contribution à l'étude des légumes secs cultivés en Algérie*. Rapport juin 1976, I.N.A., El Harrach.
- * (1 bis) ANTHELME B., BEN ALI S., IORDACHE C., 1975 - *Contribution à l'étude des légumes secs cultivés en Algérie*. Rapport juin 1975. Annales de l'I.N.A., El Harrach.
- (2) CERNING J., 1970 - *Contribution à l'étude de l'évolution de la composition glucidique des céréales au cours de leur maturation*. Thèse doctorat, Lille.
- (3) TOLLIER et MERCIER, 1973 - *Travaux de l'INRA sur la composition glucidique des végétaux*. Station de Massy, I.N.R.A.
- (4) KAKADE et coll., 1969 - *Dosage des inhibiteurs de la trypsine et des hémagglutinines*. « Cereal chemistry », 46, 518.
- (5) LIENER I. E., 1955 - *Méthodes de dosage des hémagglutinines*. « A.B.B. », 54, 223.
- (6) HOLT R., 1955 - *The determination of phytate phosphorates on dried peas*. « J. Sci. Food Agric. », 136-142.
- (7) ANDRE Y., 1976 - *Mémoire sur l'extraction des protéines de pois fourrager*. Laboratoire de biochimie et technologie alimentaire. Univ. des Sci. et Tech. du Languedoc, Montpellier, France.
- (8) PROVANSAL M., CUQ J. L., CHEFTEL J. C., 1975 - *Chemical and Nutritional Modifications of sunflower Proteins due to alkaline Processing*. « Agricul. and food chemistry », Vol. 23, n. 5, 938-943.
- (9) FLINK J., CHRISTIANSEN L., 1973 - *The production of a protein isolate from Vicia faba*. « Science + Technologie alimentaire », Zurich, Vol. 6, n. 3, 102-106.
- (10) POMPEI C., MARA L., 1976 - *Le lupin comme source de protéine pour l'alimentation humaine*. Parties I et II. « Science et Technologie alimentaire », Zurich, Vol. 9, n. 5, 289-295 et n. 6, 338-344.
- (11) MEGLOULI S., 1977 - *Influence de quelques pré-traitements sur la composition biochimique de légumes secs*. Thèse d'ingénieur, I.N.A., El Harrach.