



POLYTECH[®]
MONTPELLIER

TECHNOLOGIE DES PROTEINES VEGETALES

Professeur Jean-Louis CUQ



**UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER**

Tables des matières

<u>I - INTRODUCTION</u>	8
<u>II - BESOINS PROTEIQUES</u>	10
<u>III. PRODUCTION, RENDEMENTS ET PRIX DE QUELQUES PROTEINES ALIMENTAIRES</u>	11
III.1. RENDEMENTS DE PRODUCTION	11
III.2. PRODUCTION MONDIALE DE PROTEINES	11
III.3. PRIX DES PROTEINES	12
<u>IV. CONSOMMATION PROTEIQUE</u>	13
IV.1. CONSOMMATION PROTEIQUE ET NIVEAU DE VIE	13
IV.2. BILAN DE CONSOMMATION PROTEIQUE EN FRANCE	15
<u>V. PRINCIPALES SOURCES DE PROTEINES VEGETALE</u>	17
V.1. PROTEINES DE GRAINES	17
V.1.1. Les graines monocotylédones	18
V.1.2. Les graines dicotylédones	18
V.2. PROTEINES DE FEUILLES ET DE TIGES	18
V.3. PROTEINES DE RACINES, TUBERCULES OU FRUITS	19
<u>VI. TECHNOLOGIES D'EXTRACTION DES PROTEINES</u>	20
VI.1. GENERALITES. CONDITIONS NECESSAIRES AU DEVELOPPEMENT DE CES TECHNOLOGIES	20
VI.2. MATIERES PREMIERES D'ORIGINE ANIMALE	20
VI.2.1. Viandes	20
VI.2.2. Produits laitiers	21
VI.2.3. Poissons	21
VI.2.4. Sang	21
VI.3. MATIERES PREMIERES D'ORIGINE VEGETALE	21
VI.4. TERMINOLOGIE	21
VI. 5. EXTRACTION & PURIFICATION - GENERALITES	22
<u>VII. LES PROTEINES DE FEUILLES</u>	23
VII.1. GENERALITES	23
VII.2. NATURE DES PROTEINES FOLIAIRES	24
VII.2.1. Les protéines hydrosolubles	25
VII.2.2. Les protéines membranaires des chloroplastes	26
VII.3. COMPOSES LIPIDIQUES DES FEUILLES	26
VII.4. FACTEURS ANTINUTRITIONNELS DES FEUILLES	27
VII.4.1. Composés mineurs	27
Dérivés des chlorophylles, les acides nucléiques, les composés minéraux, alcaloïdes.	
VII.4.2. Protéines	27
a) inhibiteurs de protéases b) les lectines	
c) les agents moussants	
VII.4.3. Glycosides	27
Glycosides cyanogénétiques, glycosides goïtrigènes, l'agent du favisme, les glucides indigestibles	
VII.4.4. Saponines	28
VI.4.5. Polyphénols	28
VII.4.6. Fibres (celluloses, hémicelluloses, lignines, pectines)	
VII.5. COMPOSITION DES FEUILLES DE LUZERNE SECHEES	28
VII.6. TECHNOLOGIES D'EXTRACTION	29
VII.6.1. Solubilisation	29
a) Extraction par pression après broyage	
b) Augmentation de l'extractibilité des protéines	
VII.6.2. Récupération des protéines par coagulation thermique	30
VII.6.3 . Autres technologies d'extraction/purification des protéines de feuilles	32
a) ultracentrifugation	
b) précipitation au pH _i .	
c) Utilisation de flocculants	
d) Filtration sur gel	
e) Chromatographie d'échange d'ions.	
f) Ultrafiltration	
g) Fractionnement des protéines par des solvants ou décoloration	
h) Procédé chimiomicrobiologique (STARON)	
VII.7. UTILISATIONS ACTUELLES ET POTENTIELLES DES PROTEINES FOLIAIRES	34
VII.8. JACINTHE D'EAU	36
<u>VIII. LES PROTEINES DES TUBERCULES ET RACINES</u>	37

<u>IX - LES PROTEINES DE RESERVE DES CEREALES</u>	38
<u>X - LES PROTEINES DE GRAINES DE LEGUMINEUSES</u>	44
X.1. GENERALITES	44
X.2. PRODUCTIONS, RENDEMENTS, ECONOMIE	44
X.3. MORPHOLOGIE ET COMPOSITION DE QUELQUES GRAINES DE LEGUMINEUSES	46
X.4. VALEUR NUTRITIONNELLE DES PROTEINES DE GRAINES - COMPOSES ANTINUTRITIONNELS OU TOXIQUES	49
X.4.1. Les inhibiteurs de protéases	50
X.4.2. Les hémagglutinines ou lectines	50
X.4.3. Les facteurs de flatulence	50
X.4.4. Les thioglycosides ou glucosinolates	51
X.4.5. L'acide phytique	51
X.4.6. Les composés cyanogénétiques	52
X.4.7. Les facteurs du favisme	53
X.4.8 Les glycosides isoflavoniques et coumestanes	53
X.4.9. Le gossypol	53
X.4.10. Les allergènes	54
X.4.11. Les antivitamines	54
X.4.12. Les mycotoxines	55
X.4.13. Enzymes diverses	55
X.4.14. Les polyphénols	55
X.5. UTILISATIONS TRADITIONNELLES DES PROTEAGINEUX	57
X.5.1. Le lait de soja	60
X.5.2. Le tofu	60
X.5.3. Le koji	60
X.5.4. Le tempeh	60
X.5.5. Le miso	60
X.5.6. Le shoyu	60
X.6. PRINCIPALES PROTEINES DE GRAINES DE LEGUMINEUSES	61
X.6.1. Généralités	61
X.6.2. Albumines	61
X.6.3. Prolamines	61
X.6.4. Globulines	62
a) les globulines 11 S	62
Exemple : la glycinine du soja	62
b) Les globulines 7 S	67
X.6.5. Glutélines	68
X.6.6. Distribution de quelques classes de protéines dans les graines de légumineuses	68
X.6.7. Les principales protéines du soja	69
X.6.8. Interactions glycinine / β - conglycinine	70
X.7. TECHNOLOGIES MODERNES DE VALORISATION	71
X.7.1. Fractionnement des composants des graines de légumineuses	72
a) nettoyage et dépelliculage	72
b) Mise en flocons ou Broyage	73
c) Fractionnement par voie sèche ou turboséparation	73
d) Fractionnement par voie humide	73
1. Extraction de l'huile par solvants	74
2. Toastage, cuisson, texturation et/ou broyage des flocons	75
3. Fabrication de concentrats	75
4. Fabrication d'isolats	76
e) Méthodes microbiologiques ou chimiomicrobiologiques	76
X.7.2. Optimisation de la fabrication d'isolats	77
<u>XI - SOLUBILISATION ET PRECIPITATION DES PROTEINES</u>	77
XI.1.1. L'extractibilité	78
XI.1.2. la solubilité	78
XI.2. PROPRIETES DE L'EAU	81
XI.3. PROPRIETES DES PROTEINES	83
XI.3.1. Principales structures spatiales protéiques	85
a) Structures secondaires	88
L'hélice α Les feuillets β Conformation β Pelote statistique	89
b) Structures tertiaires	89
c) Structures quaternaires et structures supramoléculaires (Le muscle - la viande)	90
d) Moyens d'études de ces structures	91
1) Méthodes physiques	91
2) Méthodes chimiques	91
3) Méthodes biologiques	91
IX.3.2. Interactions mises en jeu dans ces structures	91
a) Les interactions de Van der Waals	91
b) Les interactions dipolaires	91
c) Les interactions ioniques (électrostatiques) : loi de Coulomb	91

d) Liaisons par pont hydrogène	92
e) Interactions hydrophobes	92
f) Ponts disulfure	
XI.3.3. Hydrophobicité et hydrophilicité des acides aminés et des protéines	92
a) l'hydrophobicité	92
b) Hydrophilicité des acides aminés et des protéines	95
XI.3.4. Prédiction des structures	95
a) Prise en compte des contraintes stériques	95
b) Analyses probabilistes	96
XI.3.5. Estimation de la structure protéique. Aspects dynamiques	98
XI.3.6. Dénaturation et changements de conformation	100
XI.4. INTERACTIONS PROTEINES / EAU	102
XI.5. PARAMETRES DE SOLUBILITE & PRECIPITABILITE DES PROTEINES	103
XI.5.1. La microstructure, les états physique et de surface, le niveau d'hydratation, la taille des particules	103
XI.5.2. Rapport solvant / soluté et vitesse d'agitation	105
XI.5.3 . Effets des caractéristiques du solvant aqueux	106
a) Influence du pH et de la nature des bases	
b) Influence de la force ionique μ . Effets réciproques	
1. Augmentation de la solubilité : salting in	
2. Diminution de la solubilité : salting out	
c) Variations des effets réciproques en fonction de la nature des sels	
XI.5.4. Influence de la nature, du nombre, de la concentration et de la conformation des protéines sur leur solubilité et leur précipitabilité	112
XI.5.5 Influence de la température	114
XI.6 . MODIFICATIONS DE LA SOLUBILITE	115
XI.6.1. Par modification de la phase solvante	115
a) Composés modifiant la constante diélectrique	
1) urée (ou de guanidine)	
2) Le chloro-2-éthanol (ClCH ₂ - CH ₂ OH) et l'éthylène glycol	
3) Les alcools inférieurs	
4) Des solvants organiques	
b) composés amphipolaires	
c) précipitants ou co-précipitants	
XI.6.2. Par modification chimique de la protéine	120
a) Modification de la solubilité de la protéine en phase aqueuse	
1) Greffage de groupements polaires	
2) Hydrolyse de ponts disulfure	
3) Hydrolyse partielle	
b) Diminution de la solubilité par fixation d'acides gras	
XI.7. APPLICATIONS ET MESURE DE LA SOLUBILITE	122
XI.7.1. Mesure de la solubilité	
XI.7.2. Applications des mesures de la solubilité	
XII. ULTRAFILTRATION, ELECTRO-ULTRAFILTRATION	124
XIII. PURIFICATION PAR CHROMATOGRAPHIE	124
XIV. SECHAGE DES PROTEINES	124
XV. DOSAGES DES PROTEINES	125
XV.1. PRINCIPALES METHODES DE DOSAGE	126
XV.1.1. Méthode gravimétrique	127
XV.1.2. Dosage de l'azote total	127
a) Méthodes dérivées de la méthode de Kjeldahl	
1) Principe	
2) Minéralisation	
3) Dosage de l'ammoniaque	
b) Dosage de l'azote gazeux après pyrolyse	
c) Dosage direct de l'azote protéique après activation neutronique	
XV.1.3. Dosages directs des protéines	130
a) méthodes physiques	131
1) Mesure de l'absorbance dans l'ultra-violet	
2) Mesure de la fluorescence	
3) Turbidimétrie ou néphélométrie	
4) Spectroscopie X	
5) Réfractométrie	
6) Résonance magnétique nucléaire	
7) Spectroscopie dans le proche Infra Rouge	
b) Méthodes chimiques	134
1) Méthode de Biuret	
2) Méthode de Lowry (Folin)	
4) Fixation de colorants (DBC : dye binding capacity)	
5) Formol titration	
6) Dosage de l'azote amidé	

c) Fast protein liquid chromatography (FPLC)	
d) Electrophorèse en gel de polyacrylamide	
XV.2. COMPARAISON DES METHODES	139
<u>XVI. DETERMINATION DES MASSES MOLAIRES DES PROTEINES</u>	140
XVI.1. METHODES UTILISABLES AVEC DES PROTEINES PURIFIEES	140
XVI.1.1 . Dosage d'un ou plusieurs composants de la molécule	
XVI.1.2. Méthodes physico-chimiques ou physiques	
XVI.2. METHODES APPLICABLES A DES MELANGES PROTEIQUES	140
XVI.2.1. Sédimentation	
XVI.2.2. La chromatographie d'exclusion	
XVI.2.3. L'électrophorèse en milieu dénaturant	
<u>XVII. DOSAGE DES ACIDES AMINES</u>	142
XVII.1. PREPARATION DES PROTEINES	142
XVII.2. HYDROLYSE DES PROTEINES	142
XVII.2.1. Hydrolyse acide	
a) Hydrolyse en présence d'acide chlorhydrique	
1) Méthodologie	
2) Vitesse de libération et de destruction des acides aminés	
b) Hydrolyse en présence d'acide méthane sulfonique	
c) L'hydrolyse avec l'acide sulfurique	
XVII.2.2. Hydrolyse alcaline	
XVII.2.3. Hydrolyse enzymatique	
XVII.3. ETALONS INTERNES	147
XVII.4. SEPARATION ET DOSAGE DES ACIDES AMINES	148
XVII.5. DOSAGE DE LA DISPONIBILITE D'ACIDES AMINES OU DE DERIVES D'ACIDES AMINES	149
XVII.5.1. Dosage de la lysine "disponible" ou réactive.	149
a) Méthodes chimiques directes	
b) méthodes chimiques indirectes	
c) méthodes physiques	
XVII.5.2. Dosage de la méthionine et de ses dérivés d'oxydation	152
a) méthodes directes de dosage	
b) Méthode indirecte de dosage	
XVII.5.3. Dosage de la cystéine et de ces dérivés	154
XVII.5.4. Dosage du tryptophane	156
XVII.5.5. Dosage de la lysinoalanine	157
XVII.5.6. Dosage des isopeptides	158
XVII.5.7. Dosage des D-amino acides	
<u>XVIII. PROPRIETES FONCTIONNELLES</u>	162
XVIII.1. INTRODUCTION	162
XVIII.1.1. Définition(s)	128
XVIII.1.2. Modes d'études	
XVIII.1.3. Principales propriétés fonctionnelles	
a) propriétés organoleptiques ou sensorielles	
b) interactions protéines - substance non protéique	
c) interactions protéines-protéines	
XVIII.2. PROPRIETES ORGANOLEPTIQUES	167
XVIII.2.1. Protéines à goût propre	
a) La monelline	
b) La thaumatine	
XVIII.2.2. Protéines modifiant la capacité sensorielle	
XVIII.2.3. Protéines associées à des molécules diverses	
XVIII.2.4. Les hydrolysats et les peptides de synthèse	
XVIII.2.5. Réactions de Maillard - Acides aminés précurseurs d'arômes	
XVIII.3. SOLUBILITE (Cf chapitre IX)	174
XVIII.4. RETENTION D'EAU ou ADSORPTION D'EAU	175
XVIII.4.1. Effets des polymères protéiques sur les propriétés de l'eau	
XVIII.4.2. Dynamique de la relation protéine - environnement	
XVIII.5. RETENTION D'HUILE ou ADSORPTION D'HUILE	178
XVIII.6. PROPRIETES VISCOELASTIQUES	179
XVIII.6.1 épaississants.	179
XVIII.6.2. Les gels protéiques.	180
XVIII.6.3. Les pâtes.	182
XVIII.6.4. Les films protéiques.	183
a) Quelques généralités sur les biopolymères et les polymères synthétiques filmogènes	
b) Conditions de faisabilité d'un film	
c) Les biopolymères filmogènes	
d) Les films protéiques	

1) Propriétés attendues	
2) Les principales protéines filmogènes et leurs propriétés	
3) Formation des films	
4) Technologies de fabrication et de mise en œuvre des bioemballages	
4-1) Coacervation et formation des films et enrobages	
4-2) Formation par application des propriétés thermoplastiques des protéines	
5) Les additifs des bioemballages protéiques	194
5-1) Les plastifiants	
5-2) Les agents de pontage	
e) Détermination des propriétés fonctionnelles des bioemballages protéiques	
1) Les propriétés mécaniques	
2) Les propriétés thermiques	
3) Les propriétés barrières (gaz, vapeur d'eau, solutés et lipides)	
4) Propriétés barrière à la vapeur d'eau et aux gaz	
5) Les propriétés "organoleptiques" et la valeur nutritionnelle	
f) Exemple de fabrication de film protéique à partir de gluten (cf p26 chapitre IX)	197
1) Généralités sur les interactions intra et interprotéiques des protéines du blé	
2) Influence des conditions expérimentales sur les propriétés des films.	
3) Les interactions moléculaires et les propriétés générales des films	
4) Relations entre les structures moléculaires, microscopiques et macroscopiques des films de gluten	
XVIII.7. PROPRIETES EMULSIFIANTES	205
1) Mesure de la capacité émulsifiante	
2) Stabilité de l'émulsion (méthode INKLAAR)	
XVIII.8. PROPRIETES MOUSSANTES	209
XVIII.9. AUTRES PROPRIETES (adhésivité, colle,...)	211
XVIII.10. MODIFICATIONS DES PROPRIETES FONCTIONNELLES	211
XVIII.10.1. Modifications chimiques de la structure primaire	211
a) Acylation	
b) Estérification	
c) Alkylation et glycosylation	
d) Oxydation et Réduction	
e) Phosphorylation	
f) Désamidation	
g) Formation de ponts covalents par voie chimique, réticulations - polymérisations	
XVIII.10. 2. Modification des structures secondaires, tertiaires et quaternaire	219
a) pH	
b) teneur en eau	
c) solvants	
d) traitements mécaniques et pressions	
e) traitements thermiques	
XVIII.10.3. Modifications enzymatiques	220
a) transglutamination par la transglutaminase.	
b) phosphorylation par des kinases.	
c) protéolyse.	
1) Evaluation du degré d'hydrolyse	
2) Les protéases	
3) Quelques applications	
d) La réaction plastéine.	223
1) Historique (Fujimaki et Arai,1975)	
2) Dégradation enzymatique des protéines	
3) Resynthèse enzymatique des protéines	
4) Propriétés des plastéines	
5) Applications	
XVIII.10.4. Incorporation d'acides aminés aux protéines par liaison covalente.	230
a) Condensation chimique directe.	
b) Fixation covalente par agent de pontage.	181
<u>XIX. TEXTURATION DES PROTEINES</u>	232
XIX.1. BASES BIOCHIMIQUES DE LA TEXTURATION	232
XIX.1.1. Dénaturation.	
XIX.1.2. Organisation et orientation	
XIX.1.3. Fixation et rigidification	
XIX.2. TECHNIQUES DE TEXTURATION THERMO-MÉCANIQUES ET THERMIQUES	233
XIX.2.1. Le filage	233
a) Principe de fabrication des fils protéiques	
b) Techniques de filage	
XIX.2.2. Cuisson-Extrusion	235
a) Principe du procédé	
b) Procédé en milieu peu hydraté	

c) Procédé en milieu hydraté	
XIX.2.3. Autres traitements thermiques de texturation	237
a) Thermocoagulation des protéines de soja	
b) Thermocoagulation par la vapeur sous pression	
c) "Thermogélification" des fromages fondus (figure 127)	
XIX.2.4. Cryotexturation	
IX.3. TRAITEMENTS DE TEXTURATION PAR LES HAUTES PRESSIONS	239
XIX.4. TRAITEMENTS DE TEXTURATION PAR VOIE CHIMIQUE	241
XIX.4.1. Texturation des protéines par oxydation	
XIX.4.2. Texturation des protéines par réticulation chimique ou enzymatique	
XIX.4.3. Texturation des protéines par modification du pH	
XIX.4.4. Texturation par les gaz sous pression	
XIX. LES M.P.V. ET NOS ALIMENTS	243
XIX.1. LES MATIERES VEGETALES PROTEIQUES	
XIX.1.1. Les normes	
XIX.1.2. Valeur nutritionnelle	
XIX.2. NUTRI-FONCTIONNALITE DES MPV	245
XIX.3. UTILISATIONS DES MPV DANS LES IAA	246
XIX.3.1. Industrie de la viande et dérivés.	
a) Produits à base de viande.	
b) Produits de charcuterie.	
XIX.3.2. Industrie céréalière	
XIX.3.3. Produits divers	
XIX.3.4. Produits diététiques, de régime, de forme etc	
<u>XX. INFLUENCE DE TRAITEMENTS TECHNOLOGIQUES SUR LA VALEUR NUTRITIONNELLE DES PROTEINES ALIMENTAIRES</u>	248
XX.1. INTRODUCTION	248
XX.2. DENATURATION DES PROTEINES	253
XX.3. MODIFICATIONS DE LA VALEUR NUTRITIVE PAR FRACTIONNEMENT	256
XX.4. MODIFICATIONS DES PROTEINES PAR LES MICROORGANISMES	257
XX.5. MODIFICATIONS DES PROTEINES EN ABSENCE DE TOUT AUTRE COMPOSE	257
XX.5.1. Modifications de la liaison peptidique	
XX.5.2. Isomérisation	
XX.5.3. Modifications des chaînes latérales des résidus d'acides aminés	
XX.5.4. Interactions protéines - protéines	
a) Ponts isopeptidiques	
b) Ponts covalents du type lysinoalanine ou ornithinoalanine ou lysinométhylalanine	
XX.6. INTERACTIONS PROTEINES / AUTRES COMPOSANTS ALIMENTAIRES.	264
XX.6.1. Interactions protéines - glucides réducteurs. La réaction de Maillard.	
a) Les principales étapes de la réaction de Maillard	
b) Conséquences nutritionnelles et toxicologiques de la réaction de Maillard.	
c) Evaluation de la disponibilité des résidus de lysine après réaction de Maillard.	
d) Importance de la réaction de Maillard dans les protéines alimentaires	
XX.6.2. Interactions protéines - lipides.	
XX.6.3. Interactions protéines - polyphénols.	
XX.7. MODIFICATIONS DES PROTEINES AU CONTACT D'ADDITIFS OU DE DIVERS COMPOSES.	273
XX.7.1. Effets des traitements oxydants.	
a) Oxydation de la méthionine.	
b) Oxydation de la cyst(é)ine.	
c) Oxydation du tryptophane.	
XX.7.2. Effets des dérivés chlorés.	
XX.7.3. Interaction sulfites - protéines alimentaires.	
XX.7.4. Interactions protéines - nitrites.	
XX.7.5. Réactions diverses	
XX.8. CONCLUSION	279
<u>XXI. MODIFICATIONS DE LA NUTRI-FONCTIONNALITE DES PROTEINES ALIMENTAIRES AU COURS DES TRAITEMENTS TECHNOLOGIQUES ET DE L'ENTREPOSAGE.</u>	280
EFFETS DE LA TEMPERATURE	281
Jusqu'à 100-120°C, au-dessus de 120°C En présence de glucides réducteurs En milieu alcalin	
EFFETS DES TRAITEMENTS OXYDANTS	281
EFFETS DE TRAITEMENTS CHIMIQUES PAR DES ADDITIFS	282
Agents acylants Agents bifonctionnels Phosphatation ou sulfatation Glycosylation"	
Fixation de lipides Réaction avec les nitrites et les sulfites (ADDITIFS)	
DESHYDRATATION	282
TRAITEMENTS AVEC DES SOLVANTS APOLAIRES	283
Démasquage de groupes hydrophobes	
EFFETS DU pH ET DE LA PRESENCE DE SELS	283

pH acides ou alcalins	
EFFETS DE POLYELECTROLYTES	283
TRAITEMENTS MECANIQUES	284
Broyage	
MODIFICATIONS ENZYMATIQUES	285
<i>In vivo</i> - <i>In vitro</i> - traitement de protéolyse	
<i>In vitro</i> : resynthèse, la réaction plastéine, transacylation	
Tables de composition en acides aminés de protéines et d'aliments protéiques	286

I - INTRODUCTION

Depuis des décennies il existe un déficit "chronique" de la disponibilité de protéines au niveau mondial et la FAO prévoit pour la période 2000-2010 que ce déficit représentera environ 20 % de la demande solvable, soit environ 0,5 à 0,7 milliard de tonnes de céréales. Il existe donc sur notre planète plus d'un milliard d'êtres humains qui souffrent de malnutrition et cette situation ira vraisemblablement en s'aggravant dans le futur essentiellement en raison de l'augmentation de la population. Dans certains pays la famine décime des dizaines voire des centaines de milliers d'hommes, femmes et enfants. La situation nutritionnelle au niveau mondial est schématisée sur le figure 1.

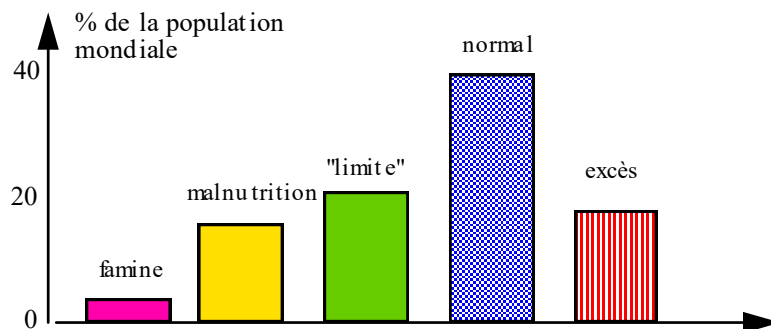


Figure 1. Répartition de l'état nutritionnel de la population mondiale

Ce déficit résulte d'abord de l'augmentation de la population mais aussi des conditions mêmes de culture (sécheresse) ou encore de l'utilisation de plus en plus importante des céréales pour l'alimentation animale. En effet l'augmentation du niveau de vie dans les pays industrialisés est suivie d'un accroissement de la consommation de protéines d'origine animale et plus particulièrement de viande bovine.

Or le rendement de transformation des protéines végétales consommées par les animaux en protéines de viande est faible (tableau 1).

Tableau 1. Rendement de transformation protéine de soja - protéine de viande

A partir de 100 g de protéine de soja :

- la vache produit 20 g de protéines de lait
- la poule produit 20 g de protéines d'oeuf
- le porc produit 12 g de protéines de viande
- le boeuf produit 4 à 6 g de protéines de viande.

Ce phénomène se traduit alors, bien que la production soit en augmentation, par un accroissement supplémentaire du déficit en protéines. Néanmoins il est clair qu'une amélioration de cette situation alimentaire est "politiquement possible" par :

- diminution de la croissance démographique
- harmonisation des revenus du commerce international
- meilleure répartition individuelle des revenus dans les pays en voie de développement
- accroissement cohérent des cultures vivrières.

Par ailleurs, une réduction de la production animale pourrait avoir comme conséquence une plus grande disponibilité des nutriments d'origine végétale (glucides et surtout protéines).

Dans la plupart des pays industrialisés, une surconsommation de produits alimentaires d'origine animale est observée. Dans ces conditions, une certaine "**végétalisation**" de nos régimes présenterait

des avantages **économiques** (économies de calories, de protéines mais aussi de lipides, vitamines ou sels minéraux) mais aussi **nutritionnels** (effets hypocholestérolémiants, absence d'acide urique, etc...).

Il ne faut cependant pas oublier que la consommation d'aliments **d'origine animale** qui apportent des protéines d'excellente qualité procure un plaisir considérable et que la production des animaux présente des avantages certains. Par exemple, l'élevage est à l'origine du stockage de quantités importantes de graines de céréales et de légumineuses et permet l'utilisation de fourrages qui ne peuvent pas être utilisés à d'autres fins dans l'industrie alimentaire (sous produits comme les pailles traitées à l'ammoniac, protéines de microorganismes, urée, etc...).

Il faut également considérer que la production animale n'est pas très dépendante des conditions climatiques (température, pluviosité) ou de la fertilité locale des sols. A l'échelle mondiale la production des protéines animales (viande, lait, oeufs) a augmenté au cours de ces dernières décennies. Des progrès significatifs ont été réalisés dans les pratiques d'élevage (sélection de races, insémination artificielle, meilleurs contrôles sanitaires, alimentation améliorée) mais aussi au niveau de l'abattage et des diverses opérations qui conduisent à l'obtention d'aliments (automatisation des moyens de fabrication, contrôle rigoureux de l'entreposage et de la distribution, etc...). Par ailleurs, certains sous-produits animaux sont actuellement largement valorisés (lactosérum de laiterie, sang, cornes ou plumes des abattoirs) et les technologies récentes mises à la disposition de l'industrie alimentaire contribuent à une meilleure utilisation des matières premières. Ainsi le désossage mécanique des volailles ou des bovins et même des poissons permet de récupérer des quantités importantes de viandes (ou de chair) qui peuvent être "restructurées" par des méthodes chimiques ou physiques.

La **pêche et l'aquaculture** représentent d'autres sources importantes de protéines animales. Les techniques de pêche ont bénéficié de progrès technologiques considérables qui vont de la détection électronique des poissons à leur entreposage et même leur traitement dans des bateaux usines. Cependant certaines espèces sont surexploitées et la prise totale à l'échelle mondiale n'augmente que très légèrement. Quant à l'aquaculture, elle est de plus en plus pratiquée, en particulier dans les pays en voie de développement, et fournit plus de 10 millions de tonnes de produits (surtout poissons d'eau douce et coquillages). Certaines espèces (carpe, tilapia) peuvent être élevées dans des plans d'eau variés (rizière par exemple) avec comme principale source d'aliments des déchets ou détritux divers ; les rendements sont alors relativement faibles. L'élevage en mode intensif (alimentation artificielle) dans des bassins permet d'atteindre des rendements élevés souvent supérieurs à la dizaine de tonnes par hectare et par an.

Il n'en reste pas moins vrai que la **production alimentaire mondiale doit augmenter**. Plusieurs solutions permettraient de satisfaire à la demande. Ainsi, on peut signaler dans cet esprit les progrès réalisés dans la production et les technologies de transformation des céréales ou des graines d'oléagineux ou de légumineuses. Les céréales constituent la principale source d'énergie et de protéines pour les hommes et les animaux et leur production n'a cessé de progresser. De nombreuses variétés ont été sélectionnées pour certains de leurs caractères (bon rendement en culture peu irriguée et sans addition d'engrais, teneurs en protéines et en lysine améliorées). Il en est de même pour les graines de protéagineux (soja, tournesol, arachide, colza, pois, féverole, lupin etc...) dont la production ne cesse de croître.

La mise sur le marché de graines modifiées génétiquement (**OGM**) capables par exemple de résister à un parasite ou à un herbicide, modifie aujourd'hui de façon considérable les possibilités culturales. Des rendements exceptionnels peuvent ainsi être envisagés avec des graines dont les teneurs en protéines par exemple seraient optimisées. Ce sont des problèmes politiques, d'acceptation par les consommateurs de tels produits qui limitent leur généralisation.

Par ailleurs, des progrès considérables ont été réalisés aussi bien au niveau de la culture (extension des terres cultivées, amélioration des sols, irrigation, apports d'engrais optimisés et traitements antiparasitaires sélectifs et efficaces, mécanisation des récoltes) que du contrôle des conditions d'entreposage ou des premières transformations ou encore de la gestion informatisée des stocks.

Il faut préciser que nous nous préoccupons surtout ici de l'étude des protéines de feuilles et de graines et plus particulièrement de celles des graines de légumineuses.

II - BESOINS PROTEIQUES

Ces besoins protéiques étant analysés en détail dans le cours de Nutrition, nous n'indiquerons que les données principales sans les discuter. Les besoins protéiques varient avec l'âge. Exprimés en g et par kg de poids corporel et par jour ils sont indiqués dans le tableau 2 (WILLIAMS et al., 1974).

Tableau 2. Besoins protéiques en fonction de l'âge

1 mois	2,2	2 ans	0,9
2 mois	2	6 ans	0,8
4 mois	1,7	12 ans	0,7
6 mois	1,5	15 ans	0,6
9 mois	1,25	adulte	0,5
15 mois	1		

Par ailleurs l'équilibre recommandé entre les différents nutriments, pour 100 kJoules absorbées est de :

protéines 9 - 13 % glucides 50 - 55 % lipides 30 - 35 %

Huit acides aminés, qualifiés d'**indispensables**, ne peuvent pas être synthétisés par l'organisme et doivent donc être apportés par le régime. Les valeurs des besoins établies par la FAO-OMS (1973) sont indiquées dans le tableau 3 (exprimées en g d'acide aminé pour 16 g d'azote).

Tableau 3. Besoins en acides aminés indispensables.

thréonine	4	aromatiques	6 (phénylalanine & tyrosine)
valine	5	lysine	6,5
soufrés	3,5 (cystine & méthionine)	tryptophane	1
isoleucine	4	histidine	(nourrisson).
leucine	7		

Le rapport entre le besoin en acides aminés indispensables et le besoin en acides aminés totaux est d'environ 35 % pour le nourrisson et de 15 % pour les adultes.

La **disponibilité** (digestion, absorption et utilisation) des acides aminés est une notion très importante qui dépend de plusieurs paramètres parmi lesquels on peut signaler :

- la conformation de la protéine
- la présence de facteurs antinutritionnels
- l'association de la protéine avec certains composants (fibres, lipides, métaux etc...)
- les traitements technologiques (température surtout)
- les dimensions des particules protéiques ingérées.

III. PRODUCTION, RENDEMENTS ET PRIX DE QUELQUES PROTEINES ALIMENTAIRES

III.1. RENDEMENTS DE PRODUCTION

Les rendements de production des protéines alimentaires d'origine animale sont pour la plupart des animaux et plus particulièrement pour les animaux monogastriques, très inférieurs à ceux observés chez les végétaux. Ceci résulte essentiellement du fait que les animaux utilisent de l'azote organique (acides aminés) pour réaliser leur biosynthèse protéique avec un mauvais rendement alors que les végétaux utilisent de l'azote minéral.

Les rendements de production de quelques protéines alimentaires sont indiqués dans le tableau 4.

Tableau 4. Rendements de production de quelques protéines alimentaires.

protéines (kg/Ha.an)		protéines (kg/Ha.an)	
boeuf	70-100	maïs irrigué	700-750
lait	100-120	pois	750-800
colza	400-450	soja	850-900
tournesol	400-450	blé Talent-Courtot	900-930
orge	500-600	fèverole	950-980
blé d'hiver	530-580	luzerne	2000-3000
blé Capitole	700	jacinthe d'eau	20000-50000

III.2. PRODUCTION MONDIALE DE PROTEINES

Entre 1960 et 1998 la production mondiale de protéines a augmenté de plus de 55 %. La production annuelle de protéines alimentaires d'origine animale est actuellement d'environ 60 millions de tonnes, tandis que celle des protéines d'origine végétale atteint environ 230 millions de tonnes (tableaux 5a et 5b).

Tableau 5 a. Production des protéines alimentaires d'origine animale (en 10⁶ tonnes de protéines par an)

viande	22	dont	boeuf et veau	40 %	volailles	20 %	autres	3 %
			mouton	7 %	porc	30 %		
poisson	14							
lait et dérivés	20							
oeufs	4							

Tableau 5 b. Principales sources de protéines alimentaires d'origine végétale (en 10⁶ tonnes de protéines par an)

céréales	155	dont	blé	35 %
			maïs	25 %
			riz	17 %
			orge	12,5 %
oléagineux	50	dont	soja	53 %
			coton	15 %
			arachide	12 %
			tournesol	8 %
			colza	7 %
			coprah	2 %
			sésame	1 %
légumineuses	13		pois, fève, pois-chiche, lentille, haricot, lupin	
légumes	12		racines et tubercules.	

III.3. PRIX DES PROTEINES

Le prix des protéines alimentaires dépend de très nombreux paramètres parmi lesquels le rendement (productivité) et la disponibilité sont les plus déterminants. Le niveau de transformation et des facteurs politiques, économiques et sociaux jouent également un rôle prépondérant dans le prix des protéines alimentaires.

Le prix des protéines disponibles en alimentation humaine varient, comme le montre le tableau 6 de 1 à 100, ce qui est considérable. Ce rapport pourrait vraisemblablement être encore plus important si par exemple des protéines d'origine microbienne étaient produites à l'échelle industrielle.

Tableau 6. Prix de quelques protéines alimentaires

aliment	prix (F / kg protéine)	aliment	prix (F / kg protéine)
luzerne	5-10	soja (graines)	
farine de blé	55	soja (tourteau)	200\$/T (1990)
lait	85	10-15	
poulet	125	riz	110
pain	150	oeuf	120
cantal	200	lait pasteurisé	135
boeuf	220	foie	160
filet de porc	260	lapin	220
yaourt	280	lieu noir	230
thon	290	petit suisse	250
jambon de Paris	290	beef haché	290
roquefort	410	saucisson	320
gigot	460	filet de merlan	370
sole	750	escalope	430
		crevette	670
		filet de boeuf	720

IV. CONSOMMATION PROTEIQUE

IV.1. CONSOMMATION PROTEIQUE ET NIVEAU DE VIE

Deux grandes catégories de sources de protéines sont utilisées en alimentation humaine :

- d'une part les **protéines d'origine animale** qui représentent environ 20 % des protéines consommées (16 % de viandes, lait, oeufs ; 4 % de poisson). Il s'agit de protéines d'excellente valeur nutritionnelle. Produites en trop faible quantité, leur prix est généralement très élevé.
- d'autre part **les protéines d'origine végétale** qui représentent 80 % des protéines consommées dans le monde. Les graines représentent une source de nutriments essentielle pour l'homme. De par leur teneur souvent élevée en amidon, elles permettent de couvrir nos besoins énergétiques et ce sont les protéines qu'elles contiennent qui représentent l'apport protéique le plus important pour l'Homme.

Les **céréales**, aliments de base pour 95 % de la population des pays en voie de développement, constituent le plus important contributeur à l'apport protéique. Actuellement près de 230 millions de tonnes de protéines végétales sont produites dans le monde sous forme de graines. Si 80 % de ces protéines étaient directement utilisées par l'homme et consommées équitablement, cela permettrait de fournir environ 100 g par jour de protéines à chaque individu. Malheureusement, plus de la moitié de cette production (environ 120 millions de tonnes) est utilisée pour l'alimentation animale dans les pays développés, ces 120 millions de tonnes étant composés de 75 millions de tonnes de céréales et de 45 millions de tonnes d'autres produits végétaux riches en protéines.

En association avec les protéines apportées par les parties végétatives des plantes qui représentent 220 millions de tonnes de protéines, tous ces produits sont transformés avec un rendement voisin de 10 % en 35-45 millions de tonnes de protéines animales dont la disponibilité est inégale au niveau des consommateurs : les pays industrialisés en disposent d'environ 27 millions de tonnes, la Chine de 5 millions et le reste du monde de 10 millions et ce pour des populations respectives de 1,5 - 1,3 et 3 milliards d'habitants.

Les 100 millions de tonnes de protéines végétales qui ne sont pas utilisées en alimentation animale ne permettent pas de satisfaire aux besoins humains. Par ailleurs, seuls 80 millions de tonnes de ces protéines sont directement comestibles, ce qui ramène leur disponibilité à environ 45 g par jour et par individu avec, à l'opposé des protéines animales, une relative égalité dans leur distribution.

PERISSE et Coll. (1964) après une enquête portant sur 85 pays a montré que l'alimentation des humains pouvait être schématisée qualitativement (figure 2).

Il faut remarquer que dans cette représentation relative, le nombre total de calories "consommées" par les humains disposant du revenu le plus bas et très inférieur à celui des consommateurs riches. Ainsi, la répartition des protéines dans l'alimentation, exprimée en grammes par personne et par jour varie de 110 (Océanie - France) à 50 ou moins (Pays en voie de développement). Sur la figure 3 sont représentées les consommations protéiques pour un certain nombre de pays. Il apparaît ainsi que plus un pays a un niveau de vie élevé, et plus sa consommation protéique par habitant et par jour est élevée. Par ailleurs, la proportion de protéines animales dans l'alimentation est la plus importante dans les pays industrialisés. Ceci résulte du coût relativement grand des protéines d'origine animale.

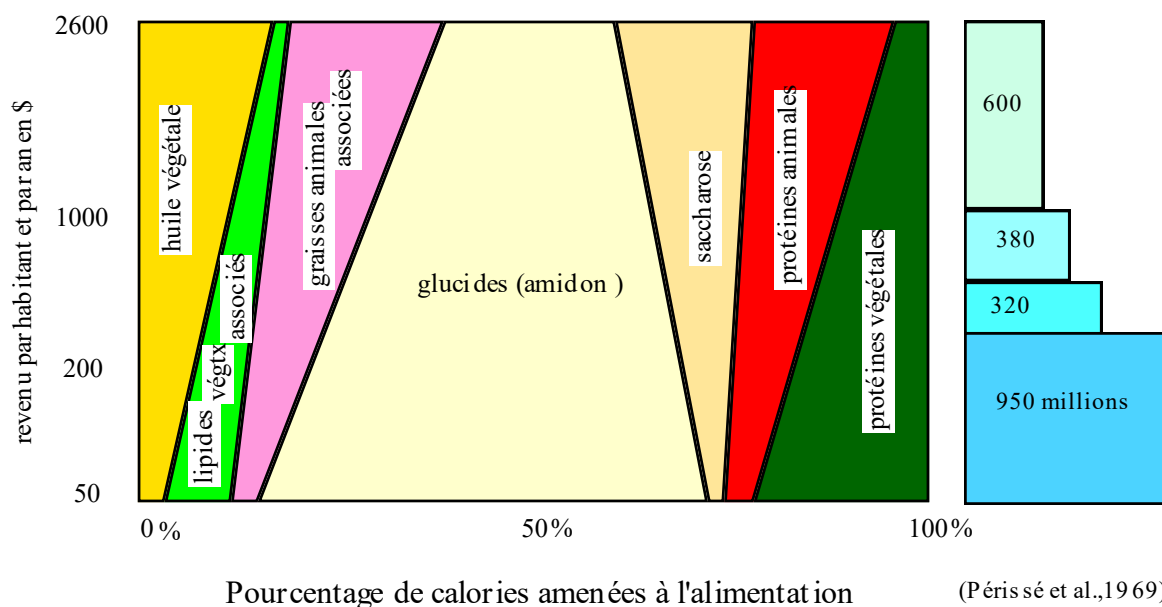


Figure 2. Proportion de calories de l'alimentation en fonction du revenu annuel par habitant

Dans les pays en voie de développement, ce sont les protéines d'origine végétale, et plus particulièrement les protéines de graines (blé, maïs, riz) qui représentent l'essentiel des protéines consommées. Comme les protéines de céréales sont souvent limitantes en lysine, il est clair que cet apport est à la fois insuffisant sur les plans quantitatif et qualitatif.

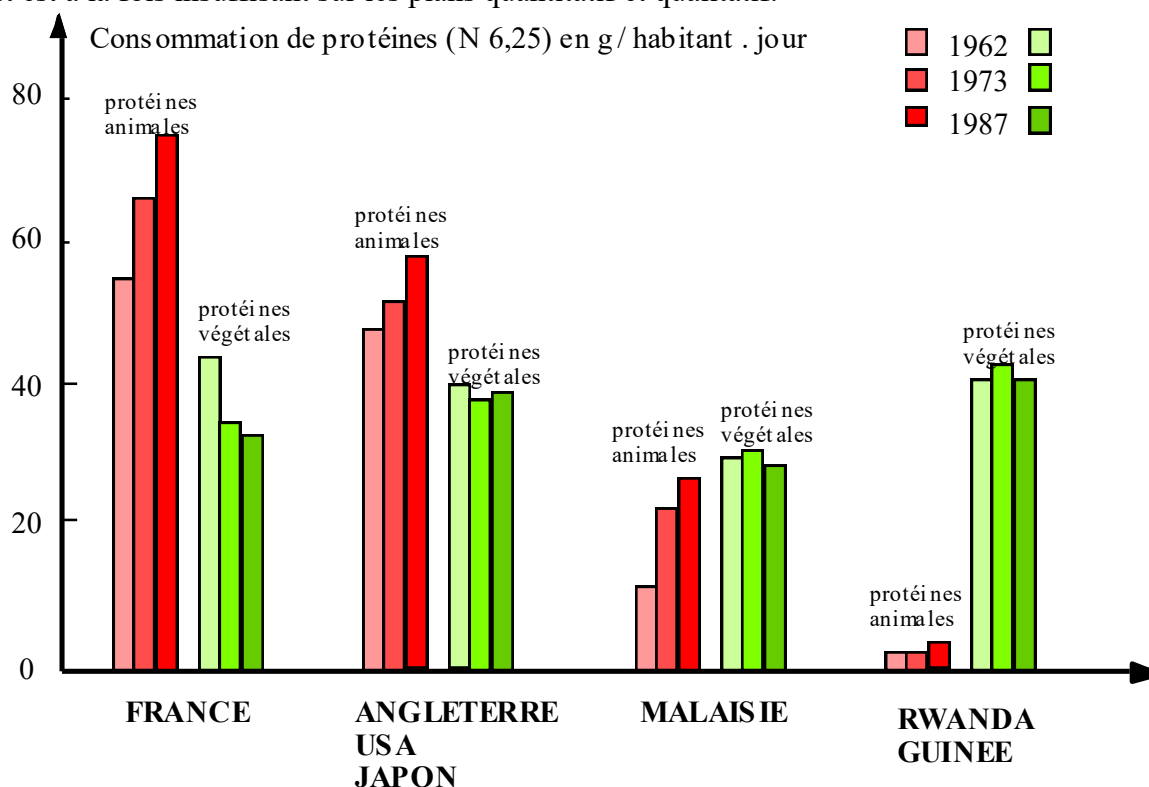


Figure 3. Répartition des protéines dans l'alimentation (g par jour et par personne)

Il faut mentionner ici que les habitants de certains pays développés d'Extrême-Orient consomment des protéines d'origine végétale depuis fort longtemps. Ainsi, il existe une technologie traditionnelle ou un art culinaire qui permet d'obtenir, en particulier à partir de graines de soja, tout un ensemble de produits attractifs dont certains sont riches en protéines.

Par ailleurs, faisant suite à une campagne mettant en évidence les effets défavorables des produits protéiques d'origine animale (lipides, cholestérol), il semble que la consommation des protéines d'origine végétale dans les pays industrialisés soit en augmentation. Ce phénomène a permis de développer l'étude au sens le plus large de ces protéines (génétique-biochimie), de proposer des technologies d'extraction et de créer des produits nouveaux. Par ailleurs, en raison de certaines de leurs propriétés fonctionnelles, ces protéines sont de plus en plus utilisées comme des additifs dans la fabrication de produits traditionnels ou nouveaux.

La démarche de choix alimentaire dans **l'objectif santé** sera de plus en plus forte. Il est donc probable que le marché des produits issus des protéagineux, évidemment riches en protéines, sera un marché en expansion dans les décennies futures.

IV.2. BILAN DE CONSOMMATION PROTEIQUE EN FRANCE

Dans notre pays la consommation de protéines s'est stabilisée aux environs de 110 g par habitant et par jour. Avant la Révolution Française de 1789, la consommation moyenne de viande était de 20 kg/habitant.an et que le pain apportait 80 % de la ration protéique. Cette consommation de viande a peu évolué jusqu'en 1900. Par contre, elle augmente ensuite régulièrement pour atteindre les 110 kg/habitant.an en 1998. L'évolution de la consommation de viandes, de produits laitiers et des œufs entre les années 60-70 et nos jours est indiquée sur la figure 4. Il faut noter que ce sont les produits laitiers transformés, qui, parmi les produits d'origine animale, connaissent le plus grand développement.

Les 36 g de protéines d'origine végétale consommées (par habitant et par jour) sont apportées essentiellement par les céréales (23 g). En comparaison avec les autres pays de l'Union Européenne, la France reste un des Pays dans lesquels la consommation des produits riches en protéines est la moins élevée.

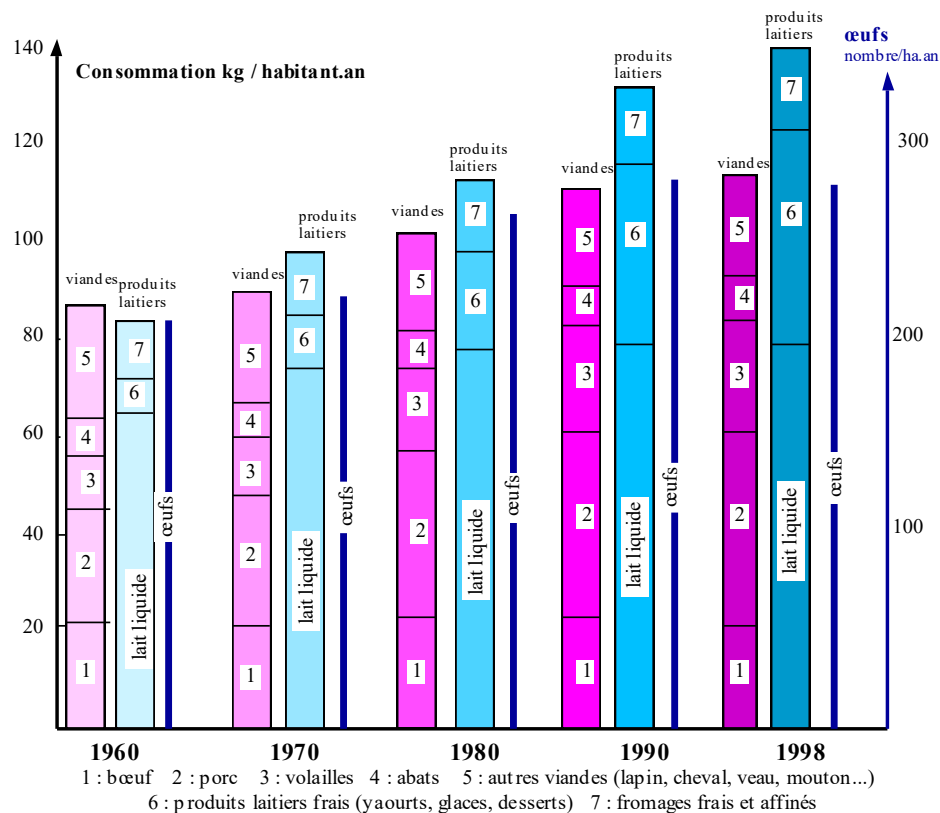


Figure 4. Consommation de viandes, produits laitiers et œufs en France.

Le bilan de production / consommation protéique en France est schématisé sur la figure 5.

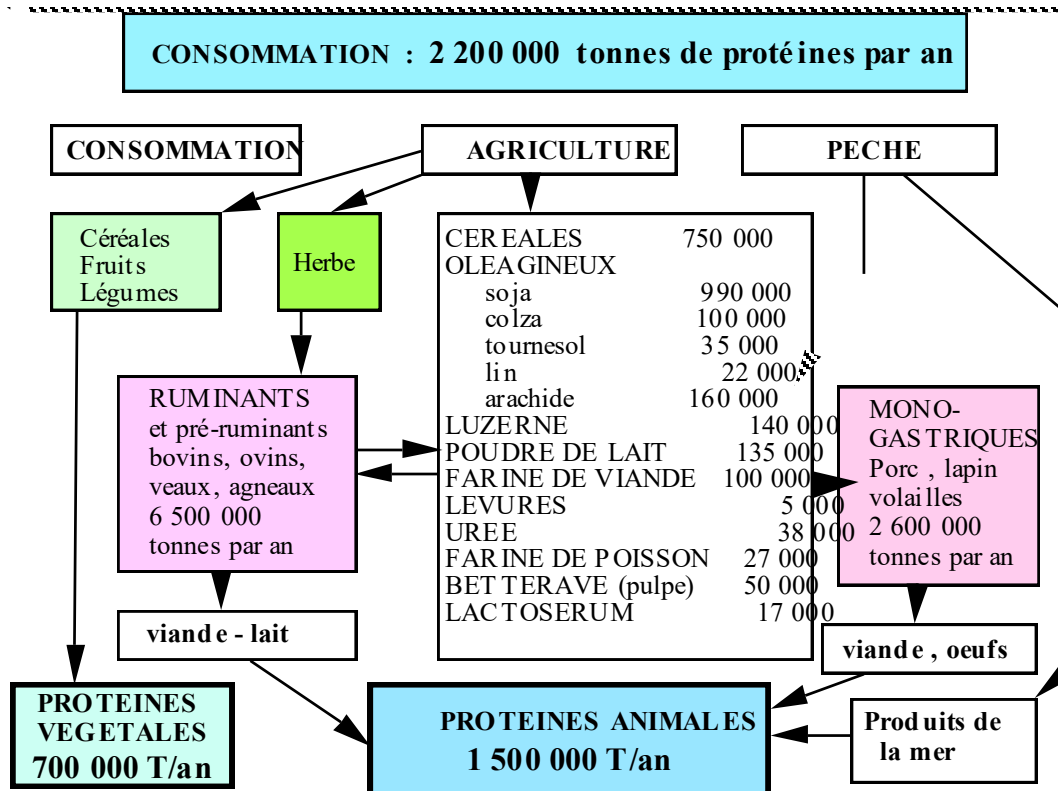


figure 5. Bilan de consommation protéique en France pour 1998

La consommation journalière par individu est d'environ 110 g par jour, ce qui représente une consommation annuelle d'environ 2 200 000 tonnes par an. Ce sont des protéines d'origine animale qui représentent l'essentiel des protéines consommées (1 500 000 tonnes). Ces protéines d'origine animale se répartissent pour environ 1/3 en protéines de porc, volailles, lapins,..., environ 1/3 en protéines de bovins, ovins, cheval, poissons ... , et environ 1/3 en protéines de lait et produits laitiers.

La consommation française de protéines végétales atteint 700 000 tonnes par an et résulte essentiellement de la consommation de céréales et dérivés, et à un degré moindre de fruits et de légumes.

Une analyse simple de la production de ces protéines montre que si les 700 000 tonnes de protéines végétales sont directement consommées, par contre il est nécessaire d'utiliser environ 9 100 000 tonnes de protéines (herbe et produits divers) pour obtenir les 1 500 000 tonnes de protéines animales permettant de satisfaire notre demande.

En France, la production annuelle d'aliments composés pour l'élevage connaît un développement extrêmement rapide. Entre 1980 et 1998, cette production a doublé (2,7 fois pour la vache laitière). Pour tous les animaux monogastriques cette augmentation est constante. Entre 1970 et 1998 la production annuelle est passée de 11 à plus de 20 millions de tonnes. Les tourteaux représentent environ 5,5 millions de tonnes; c'est le tourteau de soja qui est le plus consommé (4,2 millions de tonnes). Au cours de ces dernières années, la consommation du tourteau de soja stagne, d'autres sources de protéines contribuant à l'augmentation de consommation des aliments composés. Le tourteau d'arachide est en régression du fait de sa contamination par *Aspergillus flavus*, le tourteau de colza passe de 0,234 à 0,722 million de tonnes en 1993, celui de tournesol de 0,027 million de

tonnes en 1964 à 0,82 million de tonnes en 1992. Les sous-produits sont de plus en plus valorisés (0,9 million de tonnes de gluten de blé utilisé en alimentation animale).

L'évolution de la consommation française de Matières Protéiques Végétales riches en protéines est schématisée figure 6.

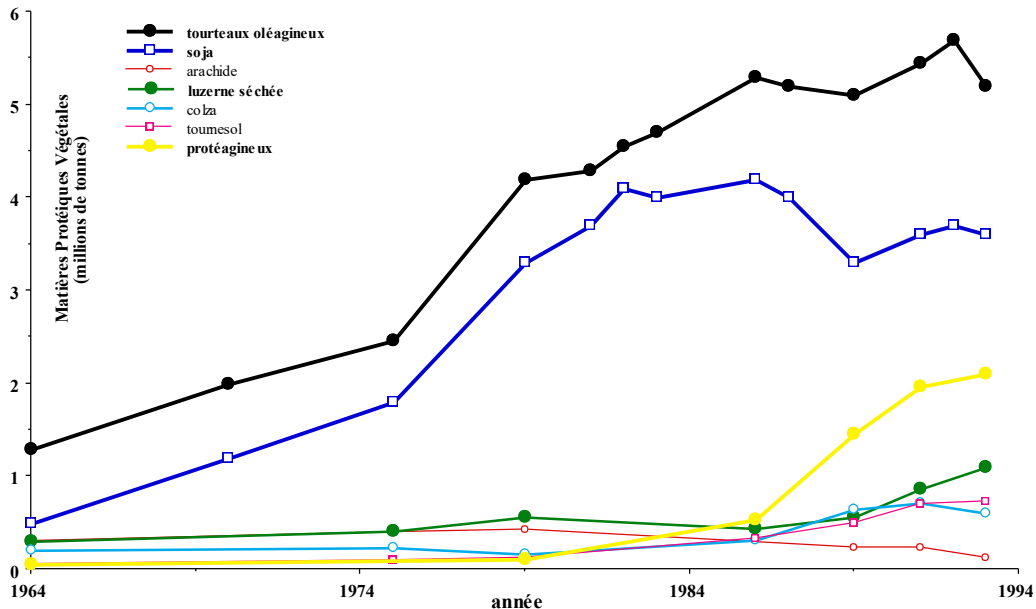


figure 6. Evolution des consommations de tourteaux en France.

V. PRINCIPALES SOURCES DE PROTEINES VEGETALES

Il existe chez les végétaux supérieurs trois principales sources de protéines :

- les **graines**
- les **parties végétatives vertes** (feuilles et tiges)
- d'autre parties végétatives comme les **racines**, les **tubercules** et les **fruits**.

V.1. PROTEINES DE GRAINES

Ce sont les graines qui contribuent le plus à la fourniture des protéines. Très schématiquement, les graines peuvent être classées en monocotylédones et dicotylédones.

V.1.1. Les graines monocotylédones.

Elles contiennent généralement entre 5 et 15 % de protéines. Il s'agit le plus souvent de graines de céréales (blé, maïs, riz, orge, seigle, avoine, mil, sarrasin, triticale). Ces graines sont consommées directement ou après de légères modifications technologiques (farine, pain). Particulièrement riches en amidon et pauvres en lipides, ce sont ces graines qui contribuent le plus à l'apport protéique de l'alimentation des humains.

On peut signaler que des concentrats protéiques peuvent être obtenus à partir de certaines de ces graines après extraction de leur amidon. Ainsi la lixiviation conduit à l'obtention de gluten qui est un complexe lipido-protéique de structure très complexe. Cette opération repose sur l'extraction de l'amidon en milieu aqueux, les protéines (gluténines et gliadines) restant insolubles dans ces conditions. Il existe également une technologie de purification en phase sèche reposant sur la séparation des particules protéiques et des grains d'amidon en fonction de leur masse et de leur densité (turboséparation).

V.1.2. Les graines dicotylédones.

Elles représentent la source en protéine la plus abondante chez les végétaux. Exprimée par rapport à la matière sèche, leur teneur en protéines varie entre 20 à plus de 45 %. La plupart des préparations protéiques nouvellement commercialisées sont issues de ces graines et plus particulièrement des oléagineux (soja, colza, tournesol, arachide, coton, lin).

Les graines de légumineuses appartiennent à une famille botanique très importante du point de vue économique. La sous-famille des Papilionacées représente une source très importante d'aliments pour l'homme sous forme de graine et pour les animaux sous forme de fourrage et de graine. C'est dans les tribus des *Viciae*, *Phaseolea*, *Lupinae*, *Glycinae*, *Diocleae* qu'on rencontre les plantes qualifiées de **protéagineux**, dont les graines sont les plus riches en protéines. Parmi ces graines on peut citer par exemple le soja et l'arachide (*Glycinae*), la fêverole, la fève et le pois (*Viciae*), le haricot (*Phaseolae*), le lupin (*Lupinae*).

Certaines de ces graines, qualifiées de **oléagineuses**, sont caractérisées par des teneurs élevées en lipides. C'est pour cette raison que ces graines restent, à l'échelle mondiale, les sources les plus importantes en lipides utilisés en alimentation humaine. Il est bon de rappeler que c'est l'huile de soja qui est le lipide le plus consommé au niveau mondial. Si la valeur de ces oléagineux reste encore fonction de l'huile qu'ils renferment, il faut noter qu'une évolution relative s'est produite et que c'est actuellement le prix des protéines qui conditionne le prix de ces graines (figure 7).

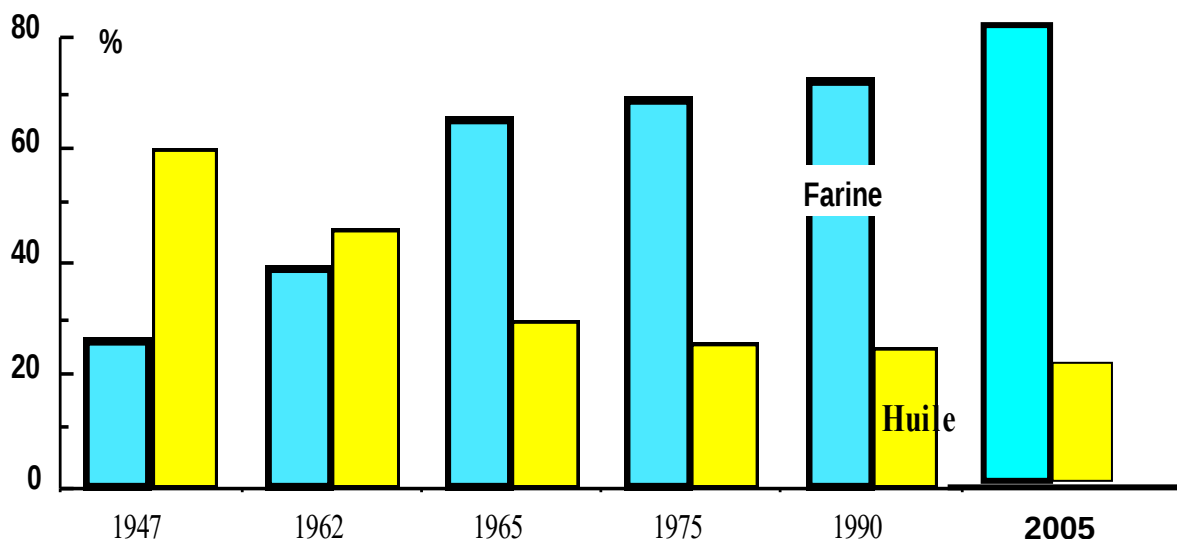


Figure 7. Valeur relative du prix de l'huile et de la farine de 1947 à nos jours pour le soja.

V.2. PROTEINES DE FEUILLES ET DE TIGES

En raison de leur association avec des composés fibreux, les protéines de feuilles ou de tiges ne sont pas directement utilisables par les monogastriques. Ces protéines contribuent pour l'essentiel à

l'apport d'azote protéique chez les ruminants. Il faut néanmoins noter, que par rapport à la matière sèche, la teneur en protéine de la plupart des feuilles et tiges avoisine 20%.

V.3. PROTEINES DE RACINES, TUBERCULES OU FRUITS

Il s'agit là de produits végétaux qui ne peuvent être considérés comme des sources importantes en protéines. En effet, leur teneur moyenne, exprimée par rapport à la matière sèche est souvent inférieure à 10 %. La teneur en protéines de quelques produits naturels et transformés sont indiquées dans les tableaux 7 et 8.

Tableau 7. Teneur en protéines de quelques produits alimentaire. MF : matière fraîche - MS : matière sèche

		% M.F.	% M.S.			% M.F.	% M.S.
Céréales	blé	9-13	10-14	Lait		3,0-3,5	25-35
	maïs	7-11	8-12	Viande		15-22	50-95
	riz	7-09	8-10	Poisson		10-20	40-90
Oléagineux	arachide	27-32	30-35	Spirulines		5-15	50-70
	colza	16-28	18-30	Bactéries		10-25	45-90
	coton	28-52	30-55	Champignons		8-20	40-60
	tournesol	15-28	16-30	Levures		8-20	40-60
Légumineuses	pois	18-33	20-35	Protozoaires		10-20	80-90
	fèverole	22-27	25-30	Oeuf poule		12-14	34-40
	lupin	27-45	30-50				
Feuilles de	luzerne	3,5-5	18-25				

	% MS (P/P)		% MS	
Tourteaux	arachide	47-50	Poisson farine	50-70
	colza	37-45	concentrat	70-95
	coton	45-65	Spirulines	85
	soja	40-60	Caséines	90-95
	tournesol	35-45	Protéines de lactosérum	98
Oléagineux	farine	40-65		
	concentrat	50-70		
	isolat	> 90		
Céréales	gluten	75-95		
Luzerne	protéines	> 90		

Tableau 8. Teneur en protéines de quelques produits transformés. La teneur en eau de ces produits est voisine de 10 %.

VI. TECHNOLOGIES D'EXTRACTION DES PROTEINES

VI.1. GENERALITES. CONDITIONS NECESSAIRES AU DEVELOPPEMENT DE CES TECHNOLOGIES

Un **développement** de l'étude biochimique et des technologies d'extraction et de valorisation se justifie quand la matière première :

1. est produite en grande quantité et avec un bon rendement
2. possède une teneur élevée en protéines
3. contient des protéines de bonne valeur nutritionnelle, en particulier au niveau de leur composition en acides aminés essentiels
4. contient des protéines dont les propriétés fonctionnelles sont intéressantes.

Les **principales matières premières** répondant à ces critères sont :

1. les graines d'oléagineux (soja, arachide, tournesol, coton, colza...) ou de légumineuses (pois, fève, lupin...)
2. les parties végétatives des plantes vertes (luzerne, sorgho, tabac, jacinthe...)
3. les microorganismes (levures, algues, bactéries, moisissures)
4. certains produits ou sous-produits d'origine animale (viandes, lait, poisson, sang...).

L'**isolement** des protéines de leur localisation naturelle est actuellement réalisée quand:

1. le matériel cru est inacceptable en tant qu'aliment humain (goût, couleur, odeur, texture)
2. le matériel cru contient avec les protéines des substances toxiques ou antinutritionnelles ou des fibres indigestibles en grande quantité
3. un concentré protéique est formé (tourteau par exemple) quand un autre composant alimentaire est extrait (huile, amidon)
4. l'utilisation du concentrat ou de l'isolat permet de fabriquer, en association avec d'autres composants, des aliments nouveaux ou de meilleure qualité.

L'**acceptabilité** des protéines extraites d'une matière première donnée par un consommateur moyen requiert généralement la résolution des problèmes suivants :

1. obtention de produits équilibrés de bonne valeur nutritionnelle
2. réalisation de produits appétents. Il est peu probable que le consommateur achète un produit à la seule vue de sa composition en acides aminés
3. fabrication de produits à des prix très compétitifs.

VI.2. MATIERES PREMIERES D'ORIGINE ANIMALE

Nous ne citerons ici que très brièvement les matières premières d'origine animale à partir desquelles les protéines sont extraites sans développer les technologies utilisées.

VI.2.1. Viandes

Fabrication de concentrat sec contenant environ 80 % de protéines après élimination de l'eau et des graisses par le dichlorure d'éthylène à chaud puis extraction du résidu par l'isopropanol.

Fabrication de protéolysats solubles par voie acide ou par voie enzymatique.

VI.2.2. Produits laitiers

Procédés traditionnels de coagulation acide ou présure des protéines suivie d'un égouttage (industrie fromagère).

Fabrication de caséines (acide ou présure) et de caséinates.

Récupération et valorisation des protéines du lactosérum (α -lactalbumine, β -lactoglobuline) par thermocoagulation, ultrafiltration, gel filtration ou chromatographie d'échange ionique.

VI.2.3. Poissons

Extraction des protéines myofibrillaires et texturation par la chaleur (**surimi**).

Protéolyse acide ou enzymatique.

Délipidation par le dichlorure d'éthylène et séchage ; le concentré obtenu contient 80 % de protéines.

VI.2.4. Sang

Le sang collecté dans les abattoirs est soumis à une centrifugation. Le sérum, désalé par osmose inverse, pasteurisé et séché fournit un produit dont la teneur en protéine est voisine de 95 %. Les hématies, après addition d'eau, d'acétone et d'acide ascorbique, fournissent un précipité blanc de globine.

VI.3. MATIERES PREMIERES D'ORIGINE VEGETALE

De par leur teneur élevée en protéines et leur équilibre en acides aminés, certains produits végétaux, en particulier les graines de légumineuses, répondent parfaitement aux conditions nécessaires au développement de technologies d'extraction et de valorisation. Certaines de ces graines ont une composition en acides aminés voisine de celle de la viande et mieux équilibrée que celle des céréales.

Les protéines présentes dans les feuilles des végétaux supérieurs sont associées à des fibres ce qui nécessite leur purification.

VI.4. TERMINOLOGIE

La terminologie généralement adoptée dans les technologies de valorisation de protéines est la suivante:

- le **tourteau** (oléagineux) correspond au produit de broyage brut ou produit broyé après élimination d'enveloppes et/ou extraction des lipides.
- la **farine** résulte du broyage en fines particules de la graine (céréales, fève, pois, lupin, etc...), du tourteau ou de la matière première. Il s'agit d'un produit dont la teneur en eau est généralement inférieure à 10 % et la teneur en protéine très variable (d'une dizaine de % chez la plupart des céréales à plus de 80 % pour certaines farines de poisson).
- le **concentré** ou **concentrat** correspond à un produit enrichi en protéines généralement par élimination d'autres composants (lipides le plus souvent, glucides solubles, amidon). Sa teneur en protéines est voisine de 70 %.
- l'**isolat** résulte d'une purification poussée des protéines le plus souvent en milieu humide. Sa teneur en protéines est voisine ou supérieure à 90 %.

VI. 5. EXTRACTION & PURIFICATION - GENERALITES (cf cours de Biochimie des Protéines STIA 1).

Pour des objectifs différents (par exemple soit la purification d'une molécule protéique à activité enzymatique soit l'utilisation industrielle en technologie alimentaire), le cahier des charges à respecter n'est pas du tout le même. Dans le second cas la pureté ne joue qu'un rôle secondaire par rapport au rendement d'extraction, donc au coût. Dans la plupart des cas on essaye de conserver à la protéine sa structure native. Malheureusement, il arrive souvent que la technologie mise en jeu conduise à une dénaturation. Extraire des protéines intracellulaires requiert la destruction des membranes et parois cellulaires. Dans le cas des végétaux, les acides organiques et les polyphénols contenus dans les parois végétales sont mis au contact, au cours de la destruction cellulaire, d'enzymes qui les oxydent en quinones colorées. Ces dernières réagissent avec les protéines et se polymérisent ; il en résulte une coloration des protéines et une diminution de leur valeur nutritionnelle.

L'**extractibilité** des protéines dépend de leur **localisation**, de leur **solubilité** et de leur **dénaturabilité**.

Le principe général d'extraction est donc fonction de la matière première et surtout de sa teneur en eau.

Les **méthodes d'extraction négatives** laissent les protéines dans la matière première (par insolubilisation) tandis que sont extraits d'autres composés. Le résidu, qualifié de **concentrat**, s'enrichit alors en protéines. Le taux de purification n'est pas élevé car les protéines restent associées à de nombreuses substances qui présentent des propriétés identiques d'insolubilisation (figure 8).

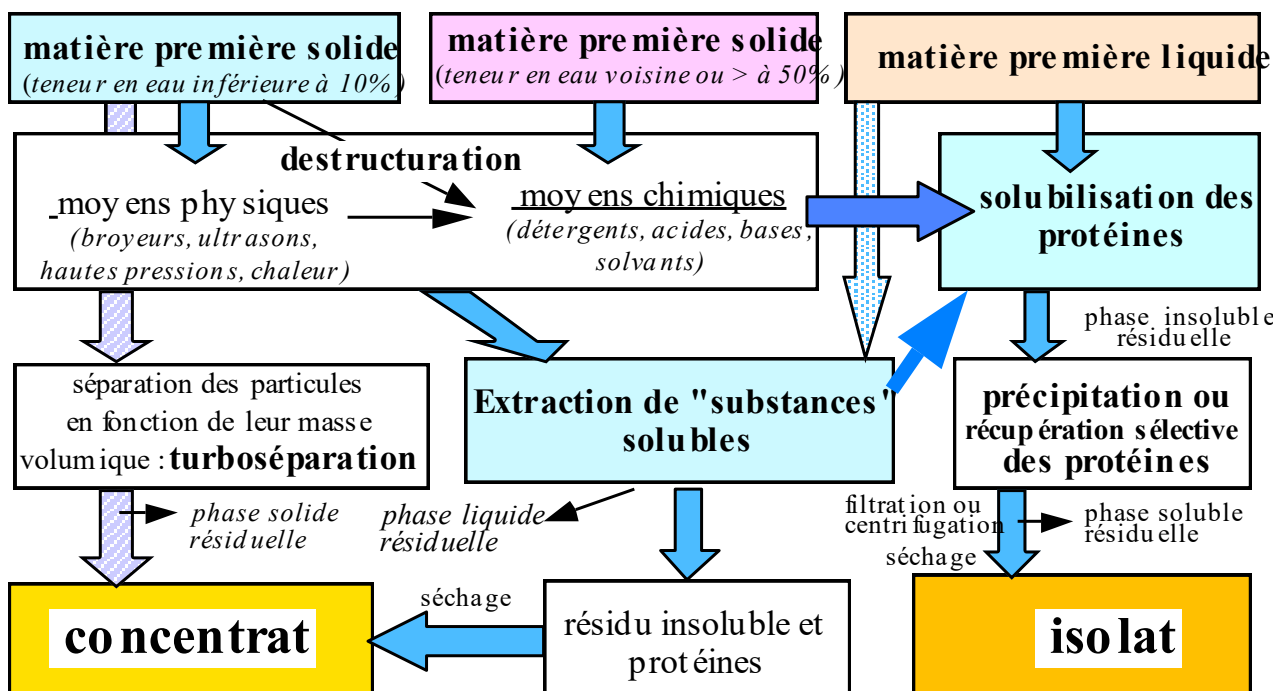


figure 8. Principales méthodes d'extraction - purification de protéines « aliments »

Dans les **méthodes d'extraction positives**, les protéines sont extraites, par solubilisation en phase aqueuse le plus souvent, de la matière première puis séparée des composants qui l'ont accompagnée. Ces méthodes permettent d'atteindre des taux de pureté très grands, le produit obtenu étant un isolat.

Il est possible de définir un **rendement d'extraction** (M protéines extraites / M protéines initiales) et un coût d'extraction. Il aussi est nécessaire, dans la plupart des sources de protéines alimentaires, de casser de nombreuses structures cellulaires afin de « délocaliser » les protéines ou de permettre

leur accessibilité aux solvants. Les procédés de destructuration physique sont nombreux et doivent être adaptés à la matière première (broyeurs, concasseurs, agitateurs, hacheurs, pressoirs, moulins, pulvérisateurs, ultra-sons, etc.). Des cycles congélation / décongélation ou le chauffage peuvent permettre des destruction cellulaires favorables à l'extraction des protéines. Il est possible d'utiliser des méthodes chimiques (acides, bases, détergents etc) ou enzymatiques (lysozyme, cellulases, pectinases, etc).

Après avoir optimisé les très nombreuses conditions de solubilisation, il reste à récupérer les protéines par précipitation (enzymatique, isoélectrique, par effet de salting out, par diminution de la constante diélectrique, par coprécipitation ou adsorption), par chromatographie ou encore par ultrafiltration.

VII. LES PROTEINES DE FEUILLES

VII.1. GENERALITES

Les tiges et surtout les feuilles des végétaux contiennent de 2 à 12 % de protéines et leur teneur en eau est généralement supérieure à 80 %. Ramenée à la masse sèche, cette teneur passe donc à 10 ou 60 % ce qui est relativement élevé (Coriandre 61, Amarante 58, Ricin 40, Fenugrec 33, Manioc 31, Haricot 29, Soja 24, Chou 21, Epinard 25, Luzerne 20).

Les protéines foliaires sont généralement des **protéines** dotées d'activités enzymatiques **très diverses** ce qui explique leur très grande hétérogénéité. Ceci rend difficile une optimisation de leur extraction, car ces protéines possèdent souvent des propriétés physico-chimiques très différentes.

La valorisation des protéines de feuilles n'est actuellement réaliste qu'à partir de feuilles et de tiges de plantes cultivées comme les céréales, les légumineuses (luzerne, pois, trèfle, soja) ou encore la canne à sucre par exemple. La valorisation des protéines de tabac, un moment envisagée, n'aura d'avenir qu'avec une diminution notable des coûts de production. En effet, un des atouts de ces sources potentielles de protéines doit rester leur faible coût de production associé, dans le mesure du possible, à des rendements exceptionnellement élevés.

Dans le cas de la **luzerne**, ce rendement atteint 3 tonnes de protéines par hectare et par an, rendement qui est donc environ 3, 5 et 20 fois supérieur à celui de la production de protéines de légumineuses, céréales et viandes. La production de protéines d'"herbes" qui repoussent rapidement après avoir été fauchées, pourrait représenter une source quasi inépuisable de protéines. Ces "herbes" sont depuis toujours utilisées pour l'alimentation des ruminants soit en leur état frais (fourrages) soit sous forme d'ensilages qui correspondent à des fourrages conservés par fermentation lactique et séchage.

Malheureusement, la présence de très grandes quantités de fibres (cellulose, hémicellulose, lignine) ou de composés toxiques (alcaloïdes, glycosides, oestrogènes, tanins, polyphénols etc...) rendent ces "herbes" inutilisables comme sources de protéines par les animaux monogastriques et par l'homme. Pour remédier à cela, il faut donc procéder à une purification plus ou moins poussée des protéines qu'elles contiennent.

Pour ce qui est de l'**historique** des développements technologiques concernant les protéines de feuilles en vue de leur utilisation en alimentation animale ou humaine il faut citer :

- les travaux de **PIRIE** en Angleterre, qui dès 1942, publie des résultats concernant l'extraction des protéines de feuilles.

- les travaux de **BICKOFF**, aux USA, qui en 1947 étudiait les possibilités d'extraction des protéines de luzerne. Ce chercheur, en association avec KOHLER, décrit en 1968 un procédé industriel de séparation par voie humide permettant d'obtenir un concentré riche en protéines mais aussi en carotène et xanthophylles, faiblement cellulosique, composé bien adapté à l'alimentation des

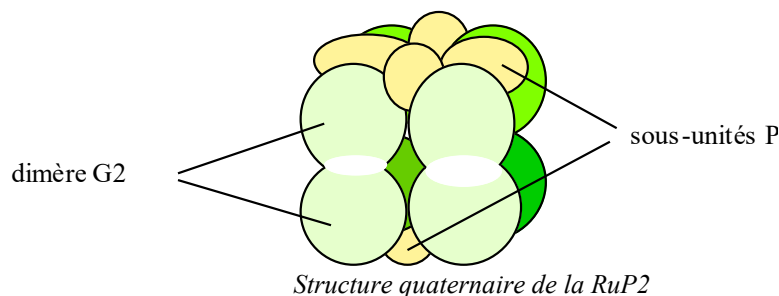
volailles. Ce procédé développé à l'échelle industrielle dès 1970 permet la production d'une poudre verte commercialisée sous la dénomination X.PRO puis PRO.XAN. Ce produit contient 40 g de protéines, 0,3 g de carotène et 0,9 g de xanthophylles pour 100 g de matière sèche. Cependant la fabrication cesse en 1973.

- à partir de 1969, en France, sous l'impulsion de FERRANDO et COSTES, des essais de préparation de produits riches en protéines a pris son essor. C'est en 1974 que la Société France Luzerne a développé à l'échelle industrielle un procédé conduisant à la production d'un concentré appelé **PX**. De nombreux travaux sont actuellement réalisés pour valoriser et étudier les protéines de feuilles, les techniques d'ultrafiltration, l'utilisation de flocculants ont fait des progrès remarquables. La production mondiale de luzerne déshydratée est d'environ 5.10^6 tonnes par an. Les USA en produisent 1,8 millions de tonnes et la CEE environ 1,5 millions par an. La France contribue à cette production pour environ 1 million de tonnes, la Société France Luzerne en assurant environ 40 %.

VII.2. NATURE DES PROTEINES FOLIAIRES

La biomasse végétale est de loin la plus importante à la surface de notre planète. Il n'est donc pas étonnant que ce soit une protéine foliaire qui soit la protéine la plus abondante : il s'agit de la **ribulose 1-5-biphosphate carboxylase (RuP2)** qui intervient dans la photosynthèse. Représentant environ de 1 à 2 % des protéines foliaires, sa masse estimée au niveau planétaire est d'environ 10^{10} kg.

La structure de la **Ru P2** ou **rubisco**, encore qualifiée de **fraction F1** des concentrés protéiques de feuilles, est encore étudiée de nos jours essentiellement en raison de l'implication de cette protéine dans la fixation du CO_2 atmosphérique au cours de la photosynthèse. Ainsi sa masse moléculaire est de 560 000 daltons. Elle est constituée de 8 sous-unités de 55 000 daltons et de 8 sous-unités de 15 000 daltons dont l'assemblage dans l'espace (structure quaternaire) est présenté ci-dessous.



Cette protéine, dont la concentration intrachloroplastique peut atteindre 0,3 g/ml, représente jusqu'à 30 % des concentrés protéiques de feuilles. Un extrait aqueux de feuilles en contient de 1 à 10 mg par g. Son coefficient d'extinction à 280 nm pour une solution à 1 % est voisin de 16. Son volume spécifique partiel est de 0,73 ml/g, son coefficient de friction (f / f_0) est de 1,1, son coefficient de sédimentation de 19,1 (S₂₀),

Associées à cette protéine, les feuilles contiennent, en raison de leur activité métabolique intense, plusieurs **centaines de protéines "majeures" différentes**. La plupart de ces protéines sont douées d'activité enzymatique et interviennent dans les processus physiologiques tels que photosynthèse et respiration. Il est donc difficile aux technologues d'optimiser l'extraction de ces protéines car les paramètres à adopter pour une protéine donnée ne correspondent souvent pas à une autre. Il en résulte que les rendements d'extraction sont faibles ce qui a conduit les technologues à orienter leurs travaux vers des matières premières d'origine végétale pour lesquelles ces problèmes n'existent pas (graines d'oléagineux).

Jusqu'à **75 % des protéines foliaires sont d'origine chloroplastique**. Le nombre de chloroplastes par cellule varie d'une quinzaine (betterave, trèfle, laitue) à plus d'une centaine (tabac, épinard). Le

nombre moyen le plus souvent rencontré est d'une quarantaine par cellule (graminées, haricot, fève, etc...).

L'analyse de 200 espèces différentes permet de montrer qu'en moyenne les protéines chloroplastiques représentent 65 % des protéines foliaires. Les 35 % restants correspondent à des **protéines cytoplasmiques, mitochondriales, membranaires, nucléaires et du réticulum**.

Pour 1 g de feuille fraîche on trouve environ 18 mg de protéines chloroplastiques dont :

- 9 mg dans les thylakoïdes. Il s'agit de protéines membranaires insolubles en milieu aqueux
- 9 mg dans le stroma. Il s'agit surtout de protéines hydrosolubles extractibles après éclatement des chloroplastes.

Il est possible de classer les protéines foliaires en fonction de leur solubilité dans l'eau après broyage:

- les **protéines hydrosolubles** sont localisées dans le cytoplasme, le stroma des chloroplastes, la matrice des mitochondries et dans le nucléoplasme.
- les **protéines insolubles** sont localisées dans les membranes des chloroplastes, des mitochondries, de l'appareil de Golgi, du réticulum.

Ces protéines sont séparables après éclatement des cellules par broyage et centrifugation. Les protéines hydrosolubles sont alors localisées dans le surnageant. Cette méthodologie est à l'origine des technologies industrielles utilisées actuellement. C'est pour cela que les propriétés des protéines foliaires sont décrites en fonction de cette distinction plutôt que sur la base de leur appartenance à une structure cellulaire donnée.

VII.2.1. Les protéines hydrosolubles

a) Les protéines chloroplastiques solubles

Cette fraction est essentiellement constituée par la **Ru P2** ou **rubisco**. La séquence des sous-unités lourdes de cette protéine est connue pour de nombreuses feuilles et présente de nombreuses homologies entre espèces. Par contre les sous-unités légères sont très variables d'une espèce à une autre.

Une autre carboxylase, la phosphoénolpyruvate carboxylase, est associée aux chloroplastes. Sa stabilité thermique est remarquable.

Toutes les enzymes associées au cycle de Krebs, à la synthèse de l'amidon, des acides aminés et des acides gras sont localisées dans le stroma mitochondrial. Ainsi on trouve des déshydrogénases, des transcétolases, des transaldolases, des mutases, des isomérases, des phosphatases, des amylases etc...

Des sulfoprotéines, voisines des thiorédoxines bactériennes, sont également présentes dans ce stroma et contribuent à la régulation de l'oxydation des thiols des carboxylases.

Quelques glycoprotéines ont été identifiées dans les chloroplastes de feuilles de haricot, blé, tabac, épinard, maïs et tournesol.

b) les protéines solubles cytoplasmiques, mitochondriales, nucléaires et vacuolaires

Les plus étudiées sont celles qui contribuent au métabolisme cellulaire. Des catalases et peroxydases ont été identifiées dans les peroxysomes.

Le **cytoplasme et le noyau** contiennent entre 10 et 15 % des protéines totales. Parmi les milliers de protéines à activité enzymatique du cytoplasme on trouve les enzymes intervenant dans la dégradation du glucose-6-phosphate par la voie des pentoses et des protéases.

Les feuilles contiennent des inhibiteurs de protéases dont la synthèse est accrue en cas d'agression parasitaire ou de blessure. Dans les feuilles blessées ces inhibiteurs peuvent représenter jusqu'à 10 %

des protéines solubles. Ils sont localisés dans une vacuole. Les feuilles contiennent également des lectines qui sont des protéines présentant une forte affinité pour certains résidus glycosylés. Le noyau contient des ARN polymérases. La chromatine est formée de 5 protéines basiques (histones) et de protéines non histoniques dont certaines possèdent des propriétés contractiles (actine, myosine).

VII.2.2. Les protéines membranaires des chloroplastes

Il s'agit surtout d'enzymes intervenant dans les transferts d'électrons et les phosphorylations, de perméases et de protéines participant à la transformation de l'énergie lumineuse en énergie chimique. Leur nombre est estimé à plusieurs centaines.

a) les chromoprotéines des photosystèmes. Associées aux chlorophylles a et b photoréceptrices (ou aux caroténoïdes) leur masse moléculaire est voisine de 24 000 daltons. Elles représentent jusqu'à 50 % des protéines membranaires du plaste et sont associées à environ 60 % de la chlorophylle totale (LHCP : Light Harvesting Chlorophyll Protein).

La seconde chromoprotéine, ou Centre Photochimique réactionnel, contient 30 % de la chlorophylle totale.

b) les protéines de la chaîne des transferts d'électrons. On trouve des chromoprotéines comme les cytochromes et des métalloprotéines comme les ferredoxines et la plastocyanine.

c) l'ATPase chloroplastique. Sa masse moléculaire est supérieure à 300 000 daltons et cette protéine est composée de 5 sous-unités.

d) la protéine de structure lamellaire

Il s'agit d'une protéine de l'enveloppe des chloroplastes qui représente environ 5 % des protéines membranaires. Signalons enfin qu'il existe d'autres protéines membranaires localisées dans les mitochondries, l'appareil de Golgi ou encore le réticulum.

VII.3. COMPOSES LIPIDIQUES DES FEUILLES

Au cours de la préparation de concentrats par coagulation thermique (cf VII.6), la plupart des chlorophylles et des lipides extraits coprécipitent avec les protéines. Ces composés représentent de 10 à 30 % de la masse du concentrat. Leur présence peut avoir des conséquences favorables ou non. Dans la feuille fraîche ils constituent de 1 à 2 % de la masse fraîche. Les lipides cuticulaires sont localisés à la surface des feuilles et jouent un rôle isolant ; leur teneur est généralement faible et ils sont de nature cireuse (paraffine). Leur présence constitue une barrière aux solvants aqueux et limite l'extractibilité des protéines (jacinthe d'eau)

Les glycérides constituent le feuillet bilamellaire des membranes. Comme dans les feuilles les membranes chloroplastiques représentent de 90 à 95 % de la surface membranaire totale, c'est donc ces organites qui renferment le plus de lipides. Ce sont les diglycérides dont la 3^{ème} fonction alcool est estérifiée par un composant hydrophile (acide-glucide) qui sont les plus abondants.

Parmi les pigments, les chlorophylles (1 à 2 mg/g M.F.) et les caroténoïdes (β -carotène et xanthophylles 100-500 mg/g M.F.) sont les plus abondants.

Les stérols sont présents à des teneurs de quelques dizaines de mg par g de M.F. Les quinones (ubiquinones, coenzyme Q, plastoquinones, tocophérols, phylloquinone) sont présentes dans les feuilles à des teneurs voisines de 100 mg/g M.F.

En raison de leur caractère insaturé, les acides gras constitutifs des glycérides, peuvent subir des réactions de dégradation (hydrolyse, oxydation) dont les conséquences sur l'extractibilité et les valeurs nutritionnelle et organoleptique des protéines sont généralement défavorables.

VII.4. FACTEURS ANTINUTRITIONNELS DES FEUILLES (cf Antinutritionnels des Graines)

Il existe une très grande diversité de facteurs antinutritionnels dans les végétaux. Ces composés sont synthétisés au cours du métabolisme secondaire. Parmi ceux-ci certains sont spécifiques du règne végétale (alcaloïdes, saponines, polyphénols)..

VII.4.1. Composés mineurs

a) dérivés des chlorophylles. Il s'agit de phéophorbides et de phylloérythrines qui absorbés à haute dose ont des effets photosensibilisateurs chez le rat.

b) les acides nucléiques sont à l'origine, par l'acide urique qui est un catabolite des bases puriques (adénine, guanine), d'hyperuricémie. Cependant les teneurs en acides nucléiques sont suffisamment faibles (1 % de la M.S. de luzerne ; 0,01 % dans les protéines blanches ; 0,1 % dans les protéines vertes) pour que les risques d'uricémie soient grands en cas de consommation de protéines de feuilles.

c) les composés minéraux. Les teneurs en composés minéraux des feuilles sont relativement élevées (3 à 8 % de la M.S.). Ce sont les métaux lourds, le plus souvent accumulés en surface, qui doivent faire l'objet d'un suivi strict au cours de la préparation de produits enrichis en protéines.

d) alcaloïdes. Ces composés éventuellement présents dans les feuilles sources de protéines sont peu dangereux du fait de leur solubilité en milieu acide qui permet leur élimination par lavage.

VII.4.2. Protéines

a) inhibiteurs de protéases. Ils sont présents dans la plupart des feuilles (luzerne, trèfle). Dans le cas de la luzerne l'inhibiteur trypsique est dégradé par la chaleur mais n'est pas thermo-précipitable.

b) les lectines. Il s'agit de protéines de masse molaire élevée, souvent glycosylées, dont certaines sont très toxiques. La destabilisation par la chaleur de leur structure tridimensionnelle leur fait perdre leur pouvoir toxique.

c) les agents moussants. Il s'agit de protéines capables de stabiliser les mousses et donc de provoquer la météorisation (piégeage des gaz de fermentation dans le rumen avec éructation impossible). La Ru P2 peut être à l'origine de cette pathologie.

VII.4.3. Glycosides

a) glycosides cyanogénétiques. Il s'agit de glycosides qui libèrent, par hydrolyse, de l'acide cyanhydrique toxique. Elimination du risque par cuisson dans l'eau.

b) glycosides goitrigènes. Ils sont présents surtout dans les graines de crucifères.

c) l'agent du favisme qui après libération de l'aglycone par hydrolyse donne des anémies hémolytiques.

d) les glucides indigestibles. Il s'agit de galacto-oligosides tels que le raffinose, le stachyose ou le verbascose, qui ne sont pas hydrolysés dans l'intestin grêle mais fermentés par la flore microbienne du gros intestin. Il se produit du CO₂ et H₂ en grandes quantités, gaz qui sont à l'origine de flatulence.

VII.4.4. Saponines

Il s'agit de composants relativement abondants dans les feuilles. Il existe deux familles de saponines: les saponines stéroïdiques et les saponines triterpénoïdiques. Dans la luzerne, la teneur varie entre 1 et 2 g % M.S., et dans les protéines de feuilles elle peut atteindre 3 g % M.S. Ces composés, à l'origine de météorisation, d'hémolyse, d'inhibition d'enzymes, de réduction de la mobilité des muscles lisses, sont en partie éliminables par des lavages alcalins.

VI.4.5. Polyphénols

Il s'agit de produits très fréquents (acides phénoliques, flavonoïdes, tanins) dans les feuilles. Ces composés agissent indirectement, après oxydation, sur les protéines au niveau desquelles ils diminuent la digestibilité. Il se forme alors des liaisons covalentes dans lesquelles sont impliqués les résidus de lysine.

Certains polyphénols (coumestanes et isoflavones) perturbent le métabolisme des oestrogènes et le cycle de reproduction des femelles de mammifères en se fixant sur les récepteurs de l'oestradiol.

Les polyphénols ont des incidences sur le goût (astringence), la couleur et l'odeur des produits végétaux. Il peut se produire des liaisons non covalentes (hydrogène surtout) entre polyphénols et protéines, liaisons qui modifient les structures secondaires et tertiaires des protéines. Ces composants peuvent être éliminés par des lavages à l'éthanol ou en milieu aqueux acidifié/éthanol.

VII.4.6. Fibres (celluloses, hémicelluloses, lignines, pectines).

VII.5. COMPOSITION DES FEUILLES DE LUZERNE SECHEES

La feuille fraîche (*Medicago sativa*) contient plus de 80 % d'eau. La composition de la feuille de luzerne séchée est indiquée dans le tableau 9 (pages 17 et 18).

Tableau 9. Composition des feuilles de luzerne

Protéines (N x 6,25)		20-22 %	
Eau		7 %	
Lipides		4 %	
Fibres		20 %	
Minéraux		10 %	
Autres composants		38 %	

<u>Acides aminés</u> (g pour 100 g d'acide aminé)			
ALA	6 - 7	ARG	6 - 7
ASX	9,5 - 10	GLX	11 - 12
GLY	5,5 - 6,5	HIS	2 - 3
SER	4 - 5	TYR	4 - 5,5
PHE	6 - 7	PRO	4,5 - 5
THR	5 - 5,5		
TRP	1 - 1,6		
		ILE	4,5 - 8
		LEU	8,5 - 11
		LYS	5 - 7
		MET	1,5 - 2,5
		VAL	5,5 - 6,5

Tableau 9 (suite). Composition des feuilles de luzerne

<u>Minéraux (ppm)</u>		<u>Vitamines (ppm)</u>	
Sodium	800-900	β-carotène	200-250
Potassium	20222-30000	Riboflavine	14-20
Calcium	12000-3000	Niacine	50-60
Manganèse	25-35	Choline	1400-1700
Phosphore	2500-3000	Acide pantothénique	30-35
Zinc	15-20	Vitamine E	140-160
Cobalt	0,2-0,3	Acide folique	2-3
Cuivre	10-15	Bétaïne	5000-6000
Sélénium	0,4-0,6	Pyridoxine	7-10
Fer	350-450	Vitamine K	10-20
Chlorure	5500-6000	Thiamine	3-5
Magnésium	3000-4000	Xanthophylles	300-400
Iode	0,10-0,20		

VII.6. TECHNOLOGIES D'EXTRACTION

Les difficultés d'extraction avec un rendement satisfaisant résultent essentiellement de l'hétérogénéité des protéines présentes dans les feuilles.

Deux principales démarches peuvent être utilisées pour préparer des produits enrichis en protéines :

- la première consiste à "extraire" du produit le maximum de produits solubles (glucides, sels minéraux etc...). Dans le cas des feuilles, l'insoluble fibreux est très important, cette approche conduit à l'obtention de concentrats trop riches en fibres.
- la deuxième consiste d'abord à solubiliser les protéines, qui sont alors associées en solution à des glucides, des minéraux, des phénols etc..., puis à récupérer "spécifiquement" ces protéines.

Les principaux paramètres intervenant dans la solubilisation des protéines sont discutés dans le chapitre IX et ne seront que cités ici sauf s'ils sont spécifiques aux feuilles.

VII.6.1. Solubilisation

a) Extraction par pression après broyage

Le broyage, réalisé par des broyeurs à marteau provoquant l'éclatement des cellules, est nécessaire pour que le pressage (200 à 300 kPa) permette l'extraction de 55 à 80 % jus. Du sulfite ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) est ajouté comme antioxydant (brunissement enzymatique) à la concentration de 200 ppm. Une centrifugation du jus de presse est réalisée à 6.700 rpm.

Le jus vert contient des protéines chloroplastiques "vertes" et des protéines chloroplastiques et cytoplasmiques "blanches" dont les propriétés sont indiquées dans le tableau 10.

Tableau 10 - Propriétés des protéines des jus verts de feuilles

	poids moléculaire	pH _i	Température de précipitation
Protéines vertes	100-200 000	4,5-4,8	50 - 60°C
Protéines blanches	30 - 50 000	3,3-4	85 - 100°C

Le jus ainsi obtenu contient 40 à 50 % des protéines initialement présentes dans la feuille ; le rapport protéines cytoplasmiques/protéines chloroplastiques est égal à 1/5.

b) Augmentation de l'extractibilité des protéines

Elle peut être obtenue par l'utilisation de composés chimiques tels que certains détergents (SDS, triton X100), l'urée 6M, en modifiant le pH et la force ionique.

Des protéolyses limitées au moyens de protéases permettent d'augmenter les rendements d'extraction.

VII.6.2. Récupération des protéines par coagulation thermique

Les phénomènes de dénaturation d'une protéine donnée sont complexes et conduisent souvent à la précipitation de la protéine par démasquage de zones hydrophobes. Du point de vue cinétique, si on ne considère que l'état initial et l'état final de la réaction, l'ordre apparent de la réaction est égal à 1. Les paramètres de la précipitation, en particulier par la chaleur sont donc la concentration en protéines, la température et le temps. Par ailleurs, le pH et la force ionique ou encore la présence de solvants moins polaires que l'eau, peuvent modifier tous les paramètres cinétiques observés en milieu aqueux.

Dans les feuilles, la variété de protéines est telle qu'il est difficile de définir des conditions de pH, température, temps pour obtenir une optimisation de la précipitation des protéines extraites dans le jus de presse. Cependant, il est possible de schématiser le comportement à la chaleur des protéines "vertes" et "blanches" (figure 9).

Les rendements d'extraction des protéines par coagulation thermique atteignent 20-25 %. Le produit final obtenu contient, après séchage, environ 45-65 % de protéines par rapport à sa matière sèche. Ses teneurs élevées en β -carotène (400-500 ppm) et en xanthophylles (1000 ppm) le font utiliser en alimentation animale. Il permet aux agriculteurs de nuancer à volonté la coloration du jaune des œufs et du jaune de la chair de poulet ou de dinde.

En France, la **société France-Luzerne** (Chalons-sur-Marne) fabrique ce type de concentrat qu'elle commercialise sous l'appellation de PX1. La production annuelle est d'environ 10 000 T.

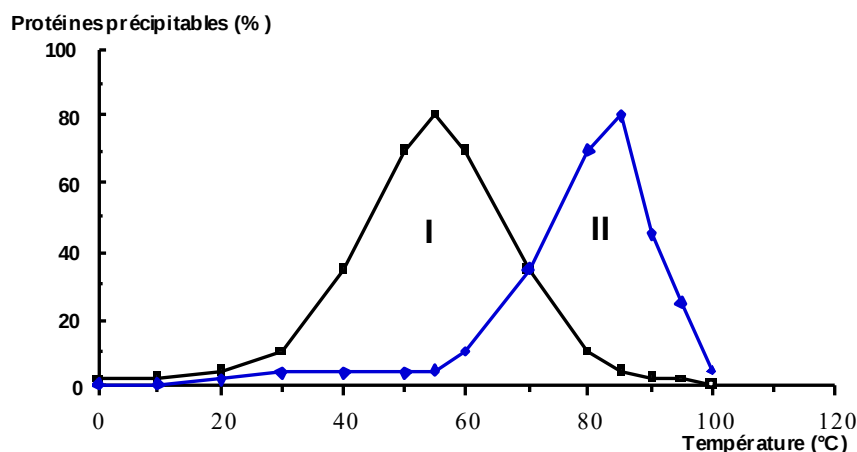


Figure 9. Variations de la quantité de protéines précipitables au cours d'un traitement thermique

I : protéines chloroplastiques membranaires associées aux lipides en suspension colloïdale (protéines vertes)
 II : protéines cytoplasmiques et du stroma des chloroplastes (protéines blanches).

Le schéma de la chaîne de production de ce type de préparation est présenté sur la figure 10.

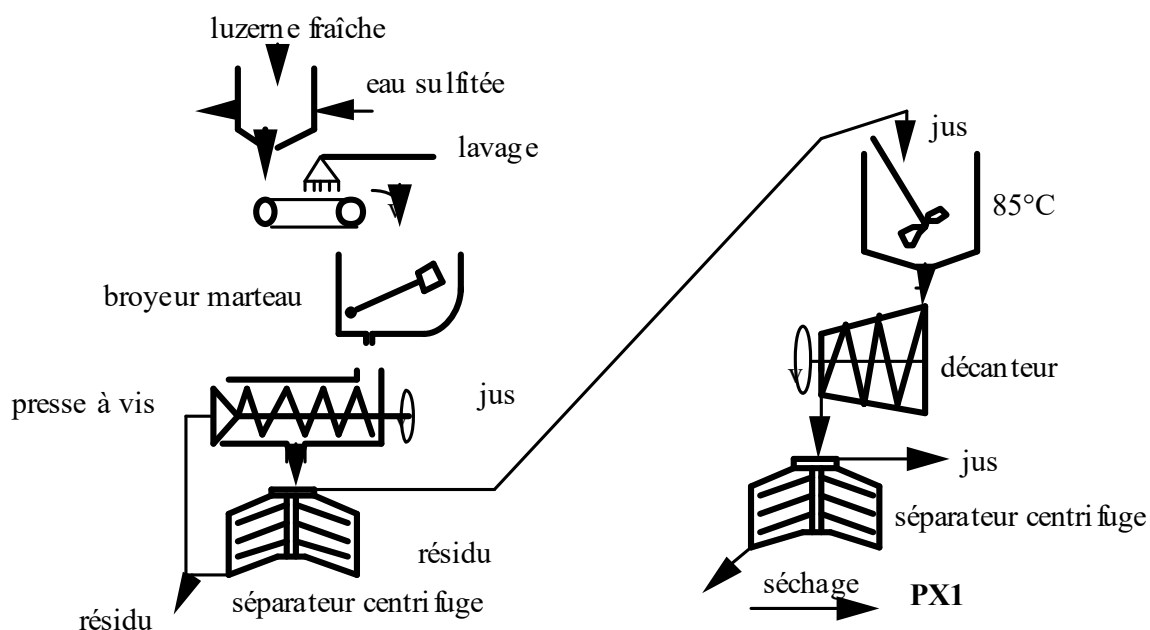


Figure 10. Schéma de la chaîne de production du concentrat protéique de luzerne PX1.

Dans cette technologie la luzerne est lavée par de l'eau sulfitée. L'éclatement des cellules est obtenu par un broyeur à marteau. Après pressage et centrifugation le jus vert est alcalinisé puis chauffé à 85°C par injection de vapeur. Le résidu précipité est neutralisé puis ajusté à pH 4 avant d'être lavé par de l'eau et séché. Dans ces opérations, le résidu est récupéré par utilisation d'un décanteur centrifuge et d'un séparateur centrifuge.

Les rendements matières obtenus au cours de cette préparation de concentrat protéique de feuille sont indiqués dans le tableau 11.

Tableau 11: Bilan matière de production du PX1 (kg)

	Matière brute	matière sèche	protéine	eau
Luzerne fraîche	1000	200	38-42	800
Granules				
résidu (tourteau)	500	150	22-24	350
jus	500	50	16-18	450
sérum	470	35	7 - 8	435
pâte verte	30	15	9 - 10	15

La composition du PX1, après séchage, est indiquée dans le tableau 12. Son prix est d'environ 6-8 F par kg.

Tableau 12. Composition de la luzerne et de produits enrichis en protéines (%)

	Protéines	Lipides	Fibres	Cendres	Eau
Luzerne séchée	20 - 22	4	20	10	7
PX1	45 - 65	8 - 10	3	14	8
PX2	35 - 50	13-15	4-5	15-16	8
Protéines blanches (isolat)	90	0,5	0,5-1	0,5	8

En dehors du procédé PX1, procédé dans lequel les protéines sont extraites puis précipitées à 85°C, il existe d'autres procédés tel que le procédé PX2 dans lequel une précipitation fractionnée des protéines à 60 et 85°C est réalisée (figure 11).

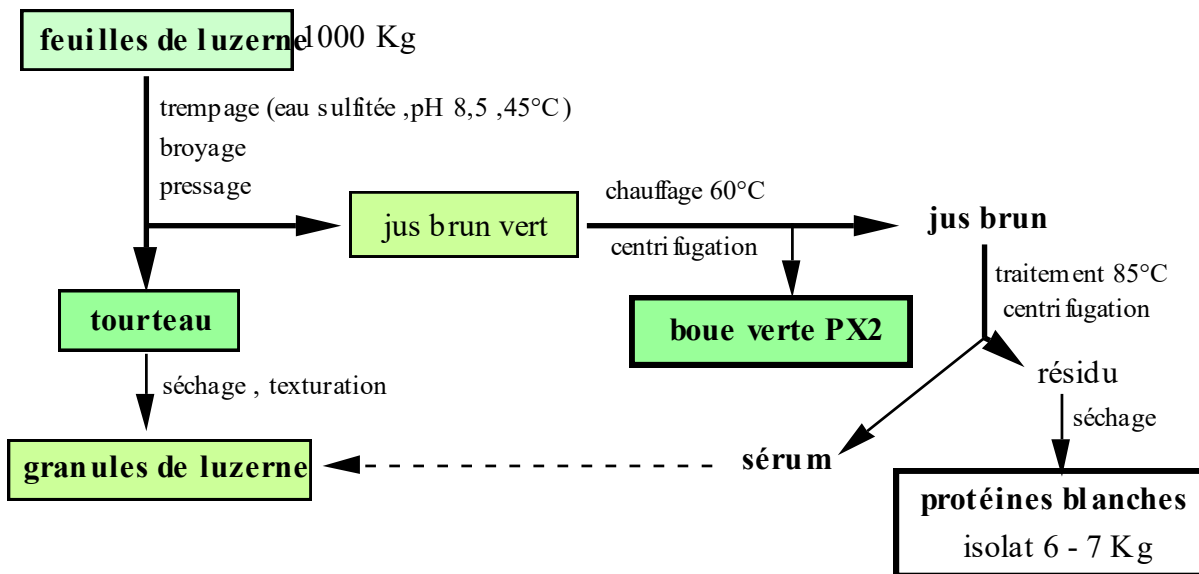


Figure 11. Préparation de produits enrichis en protéines à partir de la luzerne. Procédé PX2.

Le PX2 contient 25 à 30% des protéines initiales et sa composition, après séchage, est indiquée dans le tableau page 19. Les "protéines blanches" obtenues par ce procédé représentent de 14 à 18% des protéines initiales. Leur teneur en protéine dépasse 90%. Il s'agit donc d'un isolat qui peut être utilisé en alimentation humaine.

VII.6.3 . Autres technologies d'extraction/purification des protéines de feuilles

Au niveau du laboratoire, il est possible de récupérer les protéines présentes dans le jus de presse par:

a) ultracentrifugation (100 000 g, 1 h, 4°C),

b) précipitation au pHi.

En raison de la très grande variété de protéines présentes dans le jus, les rendements pondéraux obtenus sont faibles. Les courbes des protéines en fonction du pH du milieu (figure 12) montrent que les protéines "vertes" associées aux pigments chlorophylliens ont un minimum de solubilité aux environs de pH 3,3 - 4 à 25°C.

Il apparaît ainsi possible de procéder à une précipitation "sélective" des protéines associées aux chlorophylles en se plaçant à pH 3,5.

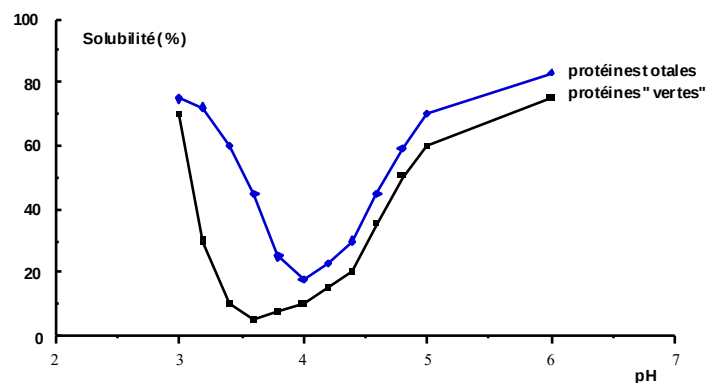


Figure 12. Solubilité des protéines totales de feuilles et des chlorophylles associées aux protéines en fonction du pH

c) Utilisation de flocculants (polyélectrolytes)

L'utilisation de flocculants polycationiques permet la co-précipitation des protéines chargées négativement en milieu alcalin. Après centrifugation une acidification permet de séparer les protéines du flocculant.

d) Filtration sur gel

Cette technologie n'est pas réaliste pour produire de grandes quantités de protéines de feuilles.

e) Chromatographie d'échange d'ions.

Cette technologie très importante au laboratoire et souvent associée dans ce cas avec d'autres types de chromatographie (hydrophobe par exemple) permet la séparation des protéines avec un bon rendement. Néanmoins son application à l'échelle industrielle reste très limitée.

f) Ultrafiltration

La conception de membranes minérales a permis le développement de cette technologie. L'ultrafiltration est réalisée avec des membranes tubulaires d'alumine sur du jus extrait par broyage et pression à 10°C. Il est ainsi possible de concentrer 10 fois le jus, ce qui conduit à un concentré contenant 50 % de protéines et 10 % de cendres (KNUCKLES et coll., 1980, J. Food Sci., 45, 730-734). Dans cette technologie, 50 à 70 % des composés phénoliques sont éliminés, ce qui conduit, après séchage du rétentat, à des produits peu colorés.

g) Fractionnement des protéines par des solvants ou décoloration

Les solvants de densité élevée sont peu efficaces. L'acétone, l'éther diéthylique, le méthanol, l'éthanol, le propane-2-ol, l'éther de pétrole à 10 %, l'acétate d'éthyle, la butanone, le dichlorométhane à 5 % permettent de séparer les matériels chloroplastiques par destabilisation des membranes

Par ailleurs le propane-2-ol et le butane-1-ol sont les plus efficaces pour décolorer les concentrés protéiques "verts".

h) Procédé chimiomicrobiologique (STARON)

Ce procédé consiste à extraire par broyage puis pression le jus des feuilles, à coaguler les protéines par traitement thermique à 85°C ou à pH 4. Les protéines récupérées par centrifugation sont diluées avec de l'eau et ensemencées avec une culture de *Geotrichum candidum*. Après 24 à 60 h de fermentation à 40°C, le culot protéique récupéré par centrifugation est séché et dépigmenté par des solvants (figure 8).

L'intérêt de l'utilisation de microorganismes au cours de l'extraction des protéines de feuilles est double:

- le germe catabolise les substances toxiques ou indésirables telles que phénols, a-galactosides, flavones, thioglycosides, etc...;
- à partir de l'azote non protéique il se crée de nouvelles protéines.

Cette technologie doit faire appel à des germes à très faible (ou nulle) action protéolytique et non pathogènes ou toxinogènes. Les germes répondant à ces critères les plus souvent utilisés appartiennent aux genres *Aspergillus* (QM 9994) et *Rhizopus* (*R. nigricans* QM 387).

Le schéma de cette technologie d'extraction est indiqué sur la figure 13.

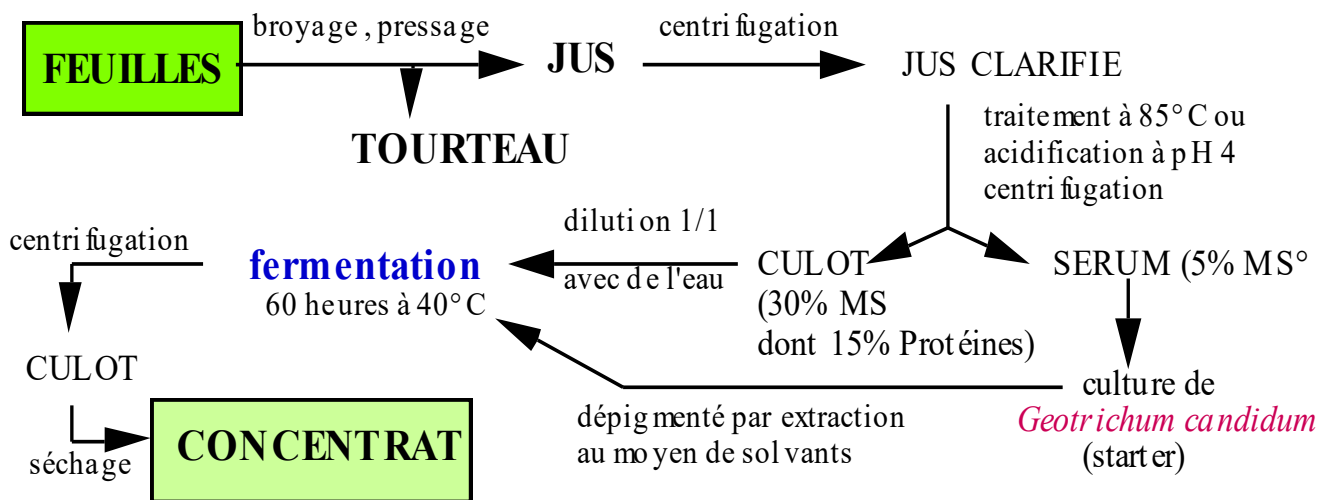


Figure 13. Extraction des protéines de feuilles (Procédé STARON)

h) Influence des prétraitements sur l'extractibilité des protéines de feuilles :

Les prétraitements influent sur l'extractibilité des protéines. C'est au niveau de l'opération de pressage que cette influence est la plus grande. Ainsi pour la luzerne on obtient par pression dans le jus :

45 %	des protéines initiales	avec le témoin
14 %	"	après autoclavage 121°C, 20 min
19 %	"	" séchage (air sec, 60 % HR)
13 %	"	" autoclavage et séchage
28 %	"	" congélation (-18°C) 2 jours
42 %	"	" réfrigération 1 jour
42 %	"	" réfrigération 1 semaine
37 %	"	" réfrigération 2 semaines

Il apparaît donc nécessaire de procéder à l'extraction des protéines à partir de feuilles fraîches.

VII.7. UTILISATIONS ACTUELLES ET POTENTIELLES DES PROTEINES FOLIAIRES

L'utilisation des préparations enrichies en protéines foliaires pour l'alimentation est limitée d'abord en raison de leur **couleur verte ou verte-brune** et de leur **goût** peu agréable (goût d'herbe lié à des aldéhydes et cétones). Ces produits ne sont généralement utilisables que mélangés à petites doses dans des produits fortement colorés et parfumés. Par contre ces produits sont largement utilisés en alimentation animale.

Leur **composition en acides aminés** (tableau 13) est bien équilibrée en raison de leur hétérogénéité. La méthionine est quelque fois limitante. La disponibilité de la lysine est excellente et la digestibilité voisine ou supérieure à 80 % (SAVANGIKAR et OHSHIMA, J. Agric. Food Chem., 1987, 35, 82-85). Après addition de méthionine (0,2 à 0,3 %) le PER est égal à celui de la caséine (HEGSTED et LINKSWILER, J. Sci. Food Agric., 1980, 34, 777-784). HORIGOME et coll. (J. Nutr. Sci. Vitaminol., 1983, 29, 611-620) ont préparé des isolats protéiques à partir de plusieurs espèces végétales et déterminé leur valeur nutritionnelle.

Dans tous les cas le PER et la digestibilité sont élevés.

Tableau 13. Composition en acides aminés du PXI et des protéines blanches de la luzerne (g / 100 g)

	PX1	Protéines blanches
ALA	5,8	6,1
ARG	3,4	5,6
ASX	10	9,3
GLX	10,5	11,5
GLY	5,2	5,2
HIS	2,2	2,9
ILE	5,2	4,5
LEU	9,2	8,6
LYS	6,8	6,9
MET + CYS	3,4	1,9+2
PHE	5,8	6,5
PRO	5,4	4,6
SER	5,2	3,2
THR	5,4	4,8
TRP	1,2	1,3
TYR	3,4	5,1
VAL	5,2	6,2

Des essais d'**incorporation** de ces LP (Leaf Proteins) à des rations d'enfants malnutris atteints de kwashiorkor au Pakistan, au Nigéria et dans d'autres PVD ont été couronnés de succès. Ces protéines permettent d'assurer, au même titre que les protéines de lait, la croissance de jeunes enfants (PIRIE, 1982 in Food Proteins; KINSELLA, 1979, J. Am. Oil Chemists'Soc., 56, 471; PIRIE, 1979, J. Am. Oil Chemists' Soc., 56, 472; PIRIE, 1982, Experientia, 38, 28-31).

Le **prix** des protéines de luzerne (cf III-3) est de 10 fois inférieur à celui des protéines d'origine animale, ce qui devrait contribuer à leur production dans les prochaines décennies.

Les **propriétés fonctionnelles** (CF IX) de ces protéines foliaires ont été bien étudiées (KOHLER et KNUCKLES, 1977, Food Technol., 191-195 ; FIORENTINI et GALOPPINI, 1981, J. Food Sci., 46, 1514-1517 ; KNUCKLES et KOHLER, 1982, J. Agric. Food Chem., 30, 748-751).

Ces propriétés varient selon le mode de préparation (tableau 14).

La solubilité varie avec le mode de préparation. Ainsi si les protéines sont extraites par coagulation thermique leur solubilité est faible quelque soit le pH.

La capacité de rétention d'eau est par contre élevée avec les protéines récupérées par précipitation à la chaleur. Cette capacité est d'autant plus faible que la solubilité est élevée.

La capacité émulsifiante des protéines foliaires est excellente de même que leur pouvoir moussant ou gélifiant.

Tableau 14. Quelques propriétés fonctionnelles des protéines de feuilles

- a) additions d'huile jusqu'à inversion b) solution à 2,5 %, 5 min de battage. Le volume après 2 h est de 120 ml avec LP et de 60 ml avec les protéines d'oeuf. L'addition de 50 % de saccharose stabilise la mousse
- b)

	solubilité en % (20°C)					capacités de rétention		a) capacité émulsifi- (volume (mg/g)	b) pouvoir moussant en ml)	pouvoir gélifiant
	pH (mg/g)					-ante				
	2	4	6	8	10	d'eau	d'huile			
<u>Protéines de luzerne</u>										
pH=4 , Lyophilisée	80	10	20	40	100	0,2	4	300	600	++++
pH=6 , 85°C	5	5	5	5	10	4,5	4,1	80	200	+
<i>pH=6, 62°C, UF</i>										
atomisées (140°C)	20	10	15	20	25	4,3	2,1	90	200	+
atomisées (85°C)	80	15	70	85	95	0	2,4	290	600	++++
lyophilisées	80	10	70	90	95	0	5,2	310	580	+++
<u>Protéines de soja</u>										
promine D						6,2	1,6	260		++
Protéines d'oeuf									600	+++

VII.8. JACINTHE D'EAU

Cette plante aquatique tropicale peut être cultivée dans des bassins sous verre. Les rendements atteignent 200 tonnes de matière sèche (MS) par hectare et par an, les protéines représentant de 20 à 25 % de cette matière sèche. Ces rendements sont exceptionnellement élevés et des essais de culture sous verre puis de valorisation de ces feuilles comme source de protéines ont été réalisés à Montpellier en 85-90.

Après fauchage, le limbe représente 30 % de la matière fraîche et le reste de la plante 70%.

Le pressage conduit à l'obtention d'un jus contenant 1,5 % de MS; (60 % de M. azotée et 35 % de minéraux) tandis que le tourteau contient 35 % de MS (20 % de MAT, 10 % de minéraux, des fibres des lipides dont beaucoup de cires).

Des difficultés de précipitation (chaleur, pH) conduisent à des rendements de récupération peu élevés, ce qui limite le développement de cette production.

Deux thèses ont été soutenues sur ce sujet :

C. DUCROS (12 décembre 1985) Contribution à l'étude de la valorisation de la jacinthe d'eau cultivée en milieu contrôlé.

B. LANDON (1 juillet 1986) Etude de la réponse de la jacinthe d'eau à trois composantes de l'environnement en conditions de culture intensive sous serre

VIII. LES PROTEINES DES TUBERCULES ET RACINES

Les tubercules, formes végétatives à métabolisme ralenti, sont destinés à permettre à la plante d'assurer sa croissance quand les conditions externes sont insuffisantes. La structure des tubercules, représentés en France essentiellement par la pomme de terre, la betterave, la chicorée, le topinambour, la carotte sont celles d'un tissu vascularisé dont la composition se rapproche de celle des parties végétatives vertes (sans l'ensemble protéique lié à la fonction chlorophyllienne). Les légumes sont de véritables réserves énergétiques (amidon) et sont donc consommés comme pourvoyeurs d'énergie.

Dans le cas des tubercules, seule la **partie glucidique** (plus de 80% de la matière sèche) est exploitée industriellement. Le **co-produits** sont soit valorisés en **alimentation animale**, soit rejetés dans les eaux de traitement (eaux rouges de féculerie, écumes de sucreries, etc). Cependant, la normalisation ISO 14 000 et la pression de lutte anti-pollution, font que les protéines des effluents liquides sont récupérées et valorisées.

Par ailleurs, la productivité à l'hectare en protéines des tubercules est voisine de celle d'autres plantes et même souvent supérieure. Ainsi la **pomme de terre** peut produire environ **900 kg** de protéine (N x 6,25) par hectare et par an.

La composition de quelques racines et tubercules est indiquée dans le tableau 15.

Tableau 15. Composition de quelques racines et tubercules.

Racine ou Tubercule (%)	Teneur en eau (%)	Protéines (N 6,25)	Fibres (%)	Cendres (%)	Glucides (%)	Lipides
Pomme de terre	77	11,0	2,0	5,5	85	0,6
Betterave	87	7,5	6,2	5,0	81	0,7
Topinambour	80	8,1	4,5	5,2	80	0,5
Manioc	69	3,5	3-20	4,0	91	0,7
Ignames	75	7,5	2-10	7,5	78	0,7
Patate douce	60	9,0	5,0	3,5	85	0,8
Chicorée	74	8,5	18	5	75	1,5
Carotte	87	12,5	10	8,0	68	1,5
Jacinthe	93	17	25	7,0		24,0

Pour la **pomme de terre** l'azote protéique représente 75 % de l'azote total. Ce sont les globuline I (tubérine) et II (respectivement 76 et 1,5 % des protéines) qui sont les plus abondantes. Il y a 4 % d'albumines, 1,8 % de prolamines et 5,5 % de glutélines. La courbe de solubilité des protéines en fonction du pH montre que ces protéines ont un pHi voisin de 3 - 3,7.

Les globulines de ces tubercules sont dénaturables par la chaleur et précipitent souvent lorsqu'elles sont soumises à un traitement thermique adapté (t° et temps).

La composition en acides aminés de quelques racines et tubercules et donnée dans le tableau 16.

Tableau 16. Composition en acides aminés de quelques racines et tubercules (g / 100 g)

	pomme de terre	betterave	carotte	navet	igname	manioc
ALA	4,6	5,2	7,8	2,9	4,1	4,7
ARG	5,4	4,6	3,8	2,9	8,2	10
ASX	12,5	8,3	17,5	10,5	11	7,5
GLX	10,5	10,5	32	45	12	16
GLY	5,5	5	2,7	2,1	3,5	3
HIS	2,5	4	1,7	2,5	2,1	1,6
ILE	5,5	4,5	3	2,2	3,6	2,5
LEU	10	6,5	4,2	2,5	6,2	4
LYS	10	7,5	3,5	2,9	4,2	4,4
CYS	1,3	1,8	-	1,8	2,7	1
MET	2	1,3	1,9	-	-	1
PHE	4,8	4	2,8	2,1	4,4	3,2
PRO	7,4	4,7	2,4	10	3,5	2
SER	5,9	5,1	3,8	3,1	5	3
THR	6,5	5	3,1	2,9	3,4	3
TRP	1,8	1	nd	nd	1,3	nd
TYR	5,7	4,2	1,7	13	3,2	2,5
VAL	5,6	6,8	4,1	2,8	4,3	3

Parmi les protéines des racines et tubercules, certaines possèdent des effets antinutritionnels ou toxiques.

Pratiquement on rencontre toujours des **inhibiteurs de protéases**, la pomme de terre étant particulièrement riche en inhibiteur trypsique.

Souvent racines et tubercules contiennent des facteurs toxiques. C'est la cas de la pomme de terre et de sa **solanine** qui est un alcaloïde présent surtout dans l'épluchure. Le facteur toxique du manioc est un composé cyanogène mortel à une dose de 100 mg et qui donne un goût amer aux tubercules. Il existe des composés amers comme l'**intybine** de la racine de chicorée; il s'agit d'un glycoside.

IX - LES PROTEINES DE RESERVE DES CEREALES

Des conférences sur ces protéines sont données en STIA3 par l'Equipe de Technologie des Céréales de l'ENSAM - INRA de Montpellier (S. GUILBERT, J.C. AUTRAN).

Nous ne rappellerons donc ici que quelques généralités sur ces protéines.

Les céréales constituent la **source de protéines la plus importante dans le monde**. En 1991 la production mondiale de céréales a atteint environ 1 700 millions de tonnes, le blé représentant 600 millions de tonnes. Les céréales fournissent environ 55 - 60 % des protéines consommées.

La France est le cinquième producteur mondial avec 30 millions de tonnes de blé tendre. Le blé est utilisé à 75 % pour l'alimentation humaine. Les protéines de réserve du grain de blé forment, après hydratation, une masse cohérente, insoluble en phase aqueuse et viscoélastique : le **gluten**.

Le **blé** est la seule céréale de laquelle est extrait le **gluten** qui est incorporé dans divers aliments et en particulier dans des farines destinées à la panification (augmentation de la valeur boulangère).

Dans le grain de blé, les protéines sont réparties de façon hétérogène. La couche à aleurone en contient 32 %, le germe 35 %, le péricarpe 6,5 % et l'albumen amylicé 7,5 % (figure 14).

Néanmoins, compte tenu de la répartition pondérale de ces structures, il apparaît que 75 % des protéines du blé sont présentes dans l'albumen : ce sont ces protéines que l'on retrouve dans les farines. La répartition des protéines dans le grain de blé est indiquée dans le tableau 17.

Tableau 17. Répartition des composants du grain

% du grain sec		Composition (% P/P sec)			
		protéines	fibres	lipides	cendres
Grain entier	100	12	2	2	1,5
téguments	9	5	21	1	3
couche aleurone	8	18	7	9	16
germe	3	26	3	10	5
albumen	80	10	0,5	1	0,5
farine blanche		11	0,5	1	0,5

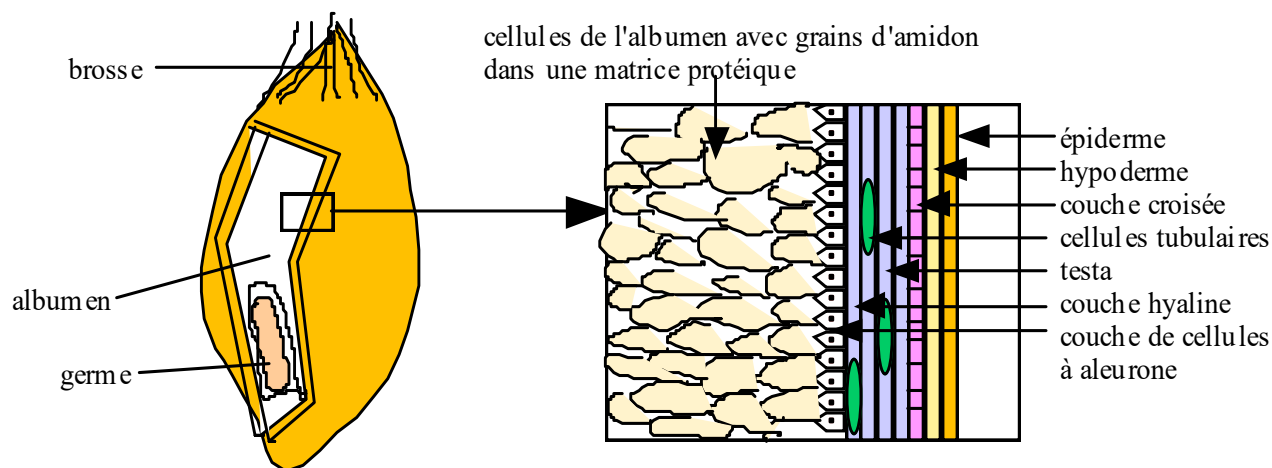


Figure 14. Structures macroscopique et microscopique du grain de blé.

Néanmoins, compte tenu de la répartition pondérale de ces structures, il apparaît que 75 % des protéines du blé sont présentes dans l'albumen : ce sont ces protéines que l'on retrouve dans les farines. Dans le grain de blé immature, les protéines de réserve se retrouvent dans des corps protéiques de 2 - 5 μm de diamètre alors que le diamètre des grains d'amidon est voisin de 10-40 μm . La membrane des corps protéiques est détruite à la maturation et les protéines ainsi libérées forment un ciment amorphe autour des grains d'amidon.

Les protéines des céréales sont essentiellement des prolamines et des gluténines (tableau 18).

Tableau 18. Les différentes classes de protéines des céréales

Céréale	albumines	globulines	prolamines	gluténines
Blé	9	5	40	46
Maïs	4	2	55	39
Orge	13	12	52	23
Avoine	11	56	9	23
Riz	5	10	5	80
Sorgho	6	10	46	38

L'isolement et surtout l'étude des propriétés de ces **protéines de blé** sont encore délicats, essentiellement en raison du caractère particulier de leur solubilité mais aussi de leur hétérogénéité quant à leur niveau de polymérisation ou de leur polymorphisme. Ainsi, il est clair que leur extraction nécessitant des solvants apolaires ou des conditions de pH drastiques modifient leur conformation et que les matières premières protéiques extraites du gluten ne peuvent être considérées comme en état natif.

Par contre le gluten qui correspond au produit lipoprotéique résiduel après extraction et pétrissage sous un courant d'eau peut être considéré comme un complexe dans lequel les protéines insolubles dans ces conditions, en l'occurrence les **gliadines** et les **gluténines**, sont dans un état pseudo-natif. Certaines des propriétés rhéologiques du pâton résiduel correspondant sont attribuables à ces fractions protéiques. Ainsi les gliadines solubles dans l'éthanol à 60 - 70 % sont à l'origine de l'*extensibilité* tandis que les gluténines solubles en milieu acide ou alcalin ou en présence d'agents dissociants sont responsables de l'*élasticité*.

Le blé est l'unique céréale qui renferme des sous-unités de glutélines de masses moléculaires élevées (HMW) comprises entre 80 et 130 kDa, protéines à qui l'on attribue les propriétés d'élasticité nécessaires à la panification.

La plupart des gliadines du grain de blé sont localisées dans les corps protéiques tandis que les gluténines sont présentes à la fois dans ces corps protéiques et dans le cytoplasme. Ces protéines possèdent des teneurs très élevées en glutamine et en acides aminés susceptibles de donner des liaisons hydrogène. Par ailleurs le nombre de résidus d'acides aminés apolaires aptes à donner des interactions hydrophobes est également très élevé. Relativement pauvres en acides aminés ionisables, ces protéines du gluten possèdent une charge nette peu importante à des pH voisins de la neutralité et les interactions ioniques ne jouent vraisemblablement qu'un rôle minime dans les protéines natives.

Néanmoins en milieu acide, pour des pH inférieurs au pKa des fonctions carboxyliques des résidus d'acides aspartique et glutamique, la charge nette positive des protéines est d'environ 1,7 pour 100 moles de résidus d'acides aminés. Ces charges ont alors des effets répulsifs dont l'intensité dépend fortement de leur distance. Il est plausible qu'en milieu acide cet effet contribue plus à la dispersion des molécules protéiques dans le solvant qu'à l'"étirement" de la molécule.

En milieu alcalin, pour des pH supérieurs aux pKa des chaînes latérales des acides aminés basiques, la charge négative nette de la protéine est d'environ 3 pour 100 moles de résidus d'acides aminés et contribue alors à la dispersion des molécules dans le solvant. La teneur importante en proline, acide aminé interdisant par sa présence la formation d'hélices α et de feuillets β , influence la structure secondaire de ces protéines. Dans le gluten natif, les résidus de cystéine sont pour la plupart oxydés sous forme de cystine.

La composition en acides aminés des fractions protéiques composantes principales du gluten est indiquée dans le tableau 19.

Tableau 19. Composition en acides aminés des gliadines et gluténines du blé en moles /100 moles de résidus d'acides aminés.

acides aminés impliqués dans des liaisons H		Gliadines	gluténines	acides aminés hydrophobes		Gliadines	gluténines
	GLN	33,5	27,6		TRP	0,4	1,3
	ASN	2,2	3,2		PHE	4,3	3,6
	THR	2,4	3,5		LEU	6,9	6,5
	SER	6,1	7		ILE	4,4	3,7
	TYR	1,8	2,5		VAL	4,8	4,8
					ALA	3,3	4,4
					MET	1,3	,4
	total	46	43,8		total	25,4	25,7

acides aminés basiques		Gliadines	gluténines	acides aminés acides		Gliadines	gluténines
	LYS	0,6	2		ASP	0,3	0,5
	HIS	1,9	1,9		GLU	1,5	1
	ARG	2	3				
	total	4,5	6,9		total	1,8	1,5

	Gliadines	gluténines
PRO	16	12
GLY	3,1	7,5
CYS	3,2	2,6
total	22,3	22,1

Si on évalue la **contribution potentielle** de ces diverses liaisons aux structures ou aux interactions avec le milieu environnant on a donc :

- des **interactions hydrogène** très nombreuses et donc très faciles à mettre en oeuvre pour une énergie potentielle totale d'environ **500 à 1400 kJ pour 100 moles** de résidus d'acides aminés
- des **interactions hydrophobes** également très nombreuses, donc très probables, pour une énergie potentielle d'échange d'environ **100 à 150 kJ pour 100 moles**
- des interactions ioniques peu nombreuses, donc à effet "rapproché" sur les structures internes faible, pour environ de **100 à 150 kJ pour 100 moles**
- des **ponts disulfure** également peu nombreux donc statistiquement peu faciles à former, mais d'énergie très élevée pour environ **1000 kJ pour 100 moles**.

Il est très probable que ces interactions contribuent aux propriétés des structures en fonction de leur probabilité d'établissement (d'autant plus élevée que leur nombre sera grand) mais aussi de l'énergie mise en jeu. Il apparaît donc que ce sont dans l'ordre de leur contribution aux structures intra ou interprotéiques les liaisons hydrogène, puis les interactions hydrophobes puis par pont disulfure et enfin ioniques qui sont à considérer. La structure hypothétique et schématique de ces protéines natives considérées individuellement est indiquée sur la figure 15.

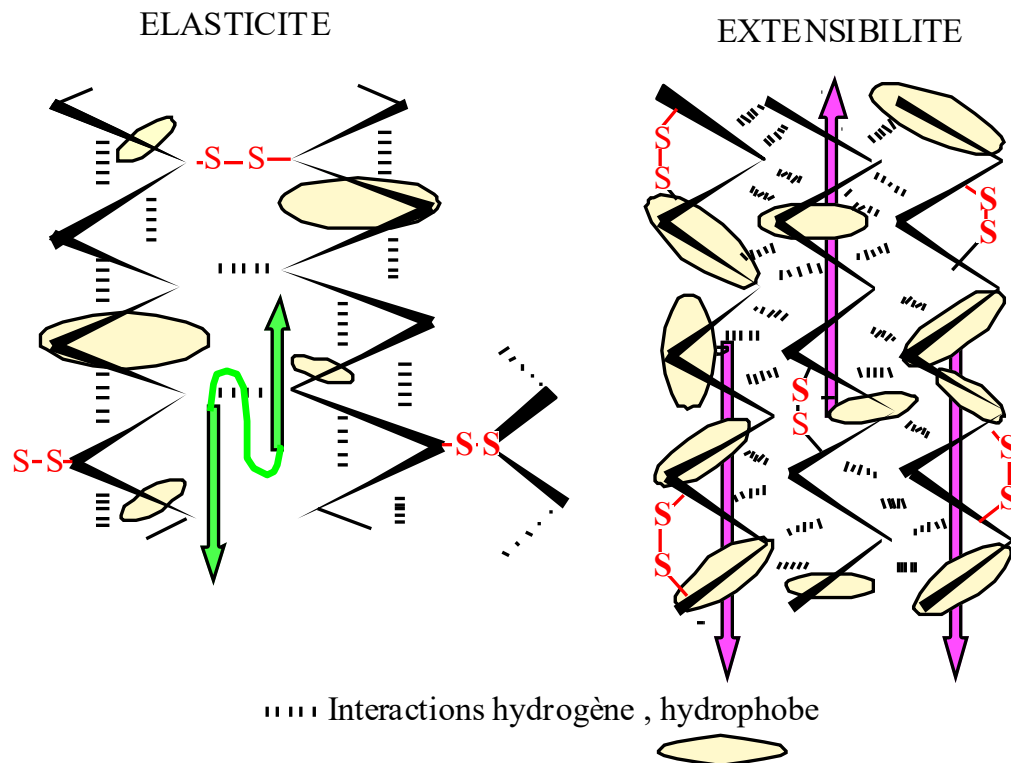


Figure 15. Elasticité et extensibilité : propriétés des protéines du gluten.

Dans les **gluténines** de structure fibreuse les résidus de cystéine sont localisés au niveau des parties N et C terminales et sont aptes à donner des ponts disulfure “tête-bêche” intra ou intermoléculaires. Le poids moléculaire des polymères liés par pont disulfure peut dépasser plusieurs millions. Plusieurs sous-unités ont été décrites :

- les **HMW** (high molecular weight) dont la masse moléculaire varie de 80 à 130 kDa qui possèdent des fonctions thiol voisines des résidus N et C terminaux, fonctions capables de s'oxyder en pont disulfure intra mais surtout intermoléculaires. Cette fraction protéique comprend, dans sa partie centrale, des structures pseudo-hélicoïdales avec de nombreuses courbures β (SHEWRY et Coll., 1984 ; POGNA et MELLINI, 1986).

- Les **LMW** (low molecular weight) dont la masse moléculaire est comprise entre 40 et 50 kDa. Des ponts disulfure et des interactions hydrogène et hydrophobes sont impliquées dans les associations entre les diverses sous-unités et conduisent à la formation de fibrilles. En raison de l'énergie résultante de l'ensemble de ces liaisons, ces associations moléculaires sont très cohésives, élastiques et résistantes à l'extension. Leur hydrophobicité élevée laisse supposer que ces protéines donnent des interactions avec certains des lipides présents dans le gluten.

Les **gliadines** constituent une fraction hétérogène composée des gliadines α, β, γ dont la masse moléculaire est comprise entre 30 000 et 45 000 daltons et des gliadines ω de masses moléculaires comprises entre 60 et 80 kD. Ces protéines ne sont pas polymérisées par des ponts disulfure (monocaténaires).

La séquence des gliadines α, β, γ présente de nombreuses homologues (figure 16); ainsi les séquences PRO-TYR-(ou PHE)GLN-GLN (et PRO-GLN-GLN-PRO-TYR dans les gliadines ω) dans ces protéines induisent la formation de courbures β et une structure secondaire pseudohélicoïdale. Ces protéines présentent des zones en feuillets plissés dans la partie N-terminale et possèdent des ponts disulfure intramoléculaires (sauf les gliadines ω) qui stabilisent la structure tertiaire. La molécule monomérique a une forme ellipsoïdale.

Les gliadines α et β possèdent immédiatement après leur biosynthèse une zone N-terminale très hydrophobe appelée peptide signal (MET LYS PHE LEU ILE LEU VAL LEU LEU ALA ILE VAL ALA THR THR ALA THR THR ALA). Ce polypeptide est séparé de la molécule au moment de son passage au travers du réticulum et avant d'atteindre les vacuoles qui deviendront les corps protéiques. C'est la partie C-terminale qui est spécifique de chaque gliadine dont la séquence ainsi que les distributions des propriétés relatives aux différents résidus sont indiquées sur la figure 16. Ces structures hautement condensées facilitent l'accumulation de ces protéines dont la masse volumique est alors relativement élevée. La solubilité "particulière", le polymorphisme et la polymérisation de ces protéines rendent l'étude de leur structure native difficile. Par ailleurs, il existe des interactions surtout par liaisons hydrogène et hydrophobes entre gliadines et gluténines dans le grain.

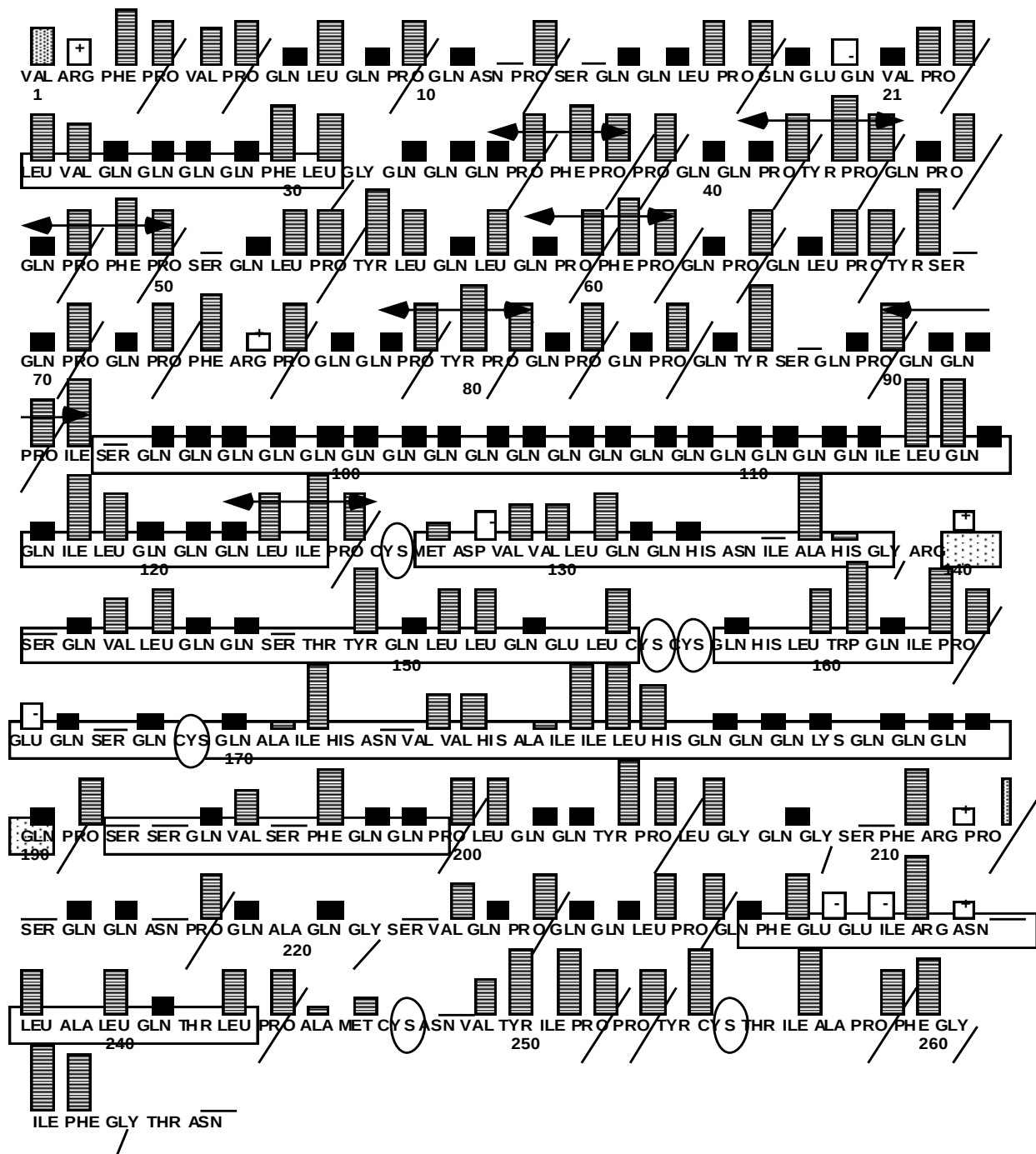


Figure 16. Séquence d'une gliadine α ou β avec répartition des acides aminés hydrophobes  et polaires  non ionisés. Les flèches horizontales indiquent les zones probables de courbure β , les parties encadrées des zones en α hélice, les traits obliques les zones de rupture des hélices et des feuilletts β .

Les structures tridimensionnelles des gliadines et des gluténines sont maintenant connues. C'est par utilisation des techniques les plus modernes d'études de ces structures qu'il a été possible de les obtenir (microscopie à effet tunnel, viscosimétrie, analyse des séquences, chromatographie d'exclusion, spectroscopie IR, etc).

Les gliadines ont des rayons de Stokes compris entre 7,5 et 9,2 nm. Elles présentent, à l'état hydraté, une structure étirée de 16 nm de longueur et 3 nm de diamètre. Les gluténines sont plus étirées (50 nm x 1,8 nm).

X - LES PROTEINES DE GRAINES DE LEGUMINEUSES

X.1. GENERALITES

Du point de vue physiologique, les protéines de graines correspondent à des protéines de réserve et à des systèmes enzymatiques dormant. Ceci contraste avec les protéines de feuilles dont la très grande hétérogénéité résulte de leur activité. Depuis de nombreux millénaires, les produits issus du soja occupent une très grande place dans l'apport protéique des asiatiques. Dans les pays industrialisés, les protéines d'oléagineux ont permis le développement et la modernisation des techniques de **productions animales**.

En **alimentation humaine**, l'utilisation de protéines de soja va grandissante depuis une trentaine d'années.

Ce phénomène est complexe et résulte de :

- la campagne contre les effets hypercholestérolémians de produits tels que le lait ;
- l'absence d'acide urique, métabolite nucléique apporté par les viandes ;
- l'apparition d'aliments diététiques ;
- l'intérêt technologique de l'utilisation des protéines végétales lié à leurs propriétés fonctionnelles ;
- du développement d'aliments composés reconstitués après fractionnement de matières premières diverses (cracking).

C'est dans les années 60 que se sont créées les premières unités de trituration du soja aux USA. Cette création s'est poursuivie dans les années 70 en Europe et actuellement l'industrie du soja dispose à l'échelle mondiale d'un énorme potentiel de production / transformation. Cette industrie est celle qui a le plus fort taux de croissance des industries alimentaires.

Aux USA on peut citer parmi les firmes les plus importantes Archer Daniels Midland, Cargill, Central Soya, Ralston Purina, General Mills, National Protein Corporation, Swift, Miles Lab. En Grande Bretagne on peut citer British Soya Products, Spillers et Courtauld, en Hollande Unimills et en France Rhône Poulenc ou la Société Industrielle des Oléagineux. de Nombreuses firmes américaines possèdent des filiales en Europe.

X.2. PRODUCTIONS, RENDEMENTS, ECONOMIE

Les productions de protéines issues de graines de légumineuses sont indiquées ssur la figure 17 et dans le chapitre III-2.

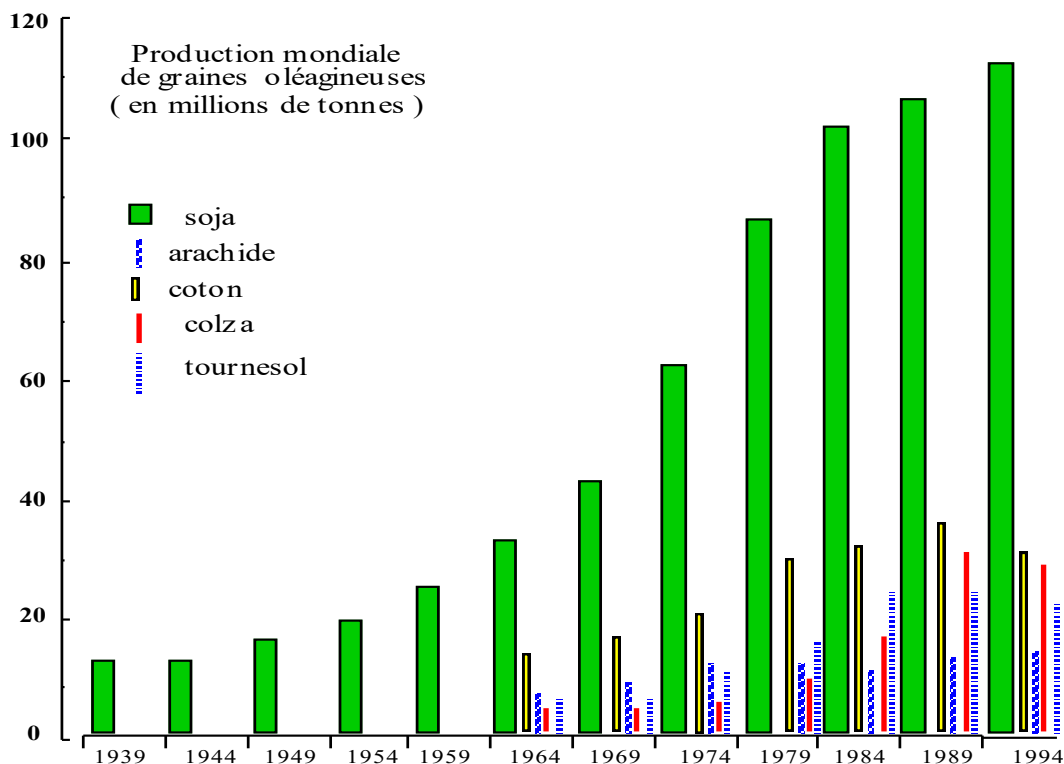


Figure 17. Evolution mondiale de la production de graines de soja

L'évolution de la production annuelle totale de ces graines oléagineuses est essentiellement liée à celle du soja (*Glycine max*). Consommé depuis l'antiquité en Extrême-Orient, ce n'est que depuis les années 1920-1930 que sa culture intensive a été pratiquée aux Etats-Unis. Depuis, sa production mondiale n'a cessé de croître et dépasse aujourd'hui les 110 millions de tonnes dont plus de 65% proviennent des Etats-Unis (figure 17).

Dans ce pays un véritable complexe d'activités s'est mis en place autour du soja, associant agriculteurs, négociants, firmes agro-alimentaires, universités, instituts de recherche et l'Etat. Un nouveau modèle de production et de consommation a été ainsi créé, modèle qui est toujours générateur de débouchés croissants pour cet oléagineux. D'abord considéré jusqu'à il y a une trentaine d'années comme une source d'huile, c'est surtout comme source très importante de protéines qu'il est utilisé actuellement. Favorisée par un prix de vente relativement bas, la pénétration du soja, d'abord aux Etats-Unis puis en Europe et au Japon est étroitement liée à la modernisation des méthodes d'élevage et à l'évolution des habitudes de consommation. Les tourteaux riches en protéines (45%) sont largement utilisés dans l'alimentation du bétail, des volailles, des porcs et des animaux domestiques. Depuis une trentaine d'années, une proportion de plus en plus grande de soja est consacrée à la fabrication de produits destinés à l'alimentation humaine (farine délipidée, concentrat, isolat dont la production dépasse les 2 millions de tonnes).

Parallèlement, une véritable **dépendance vis-à-vis des importations de soja** n'a fait que s'accroître. Ainsi, après le pétrole et le bois, les approvisionnements en "protéines" contribuent d'une façon considérable au déficit de la balance commerciale française et dépassent 8 milliards de francs. Environ 85% des produits riches en protéines destinés à l'alimentation animale sont importés, le soja représentant à lui seul environ 80%, soit près de 3,5 millions de tonnes de tourteau.

Au cours de ces 20 dernières années, les productions mondiales annuelles des autres graines oléagineuses se sont, soit stabilisées comme celles du coton (aux environs de 27 millions de tonnes) ou de l'arachide (aux environs de 12 millions de tonnes), soit légèrement développées comme celles

du colza (de 7 à 12 millions de tonnes entre 1971 et 1981) ou du tournesol (de 10 à 15 millions de tonnes entre 1971 et 1981).

A cause des difficultés agronomiques rencontrées pour développer la culture du soja, la culture d'autres plantes protéagineuses (tournesol, colza, fêverole, pois, lentille, lupin, haricot, pois-chiches) s'est développée en France sans pour autant permettre de réduire de façon significative notre déficit dans l'approvisionnement en protéines. En 1985, les productions françaises de graines de tournesol, colza, pois, fêverole et soja ont été respectivement d'environ 1500, 1300, 930, 120 et 70 milliers de tonnes.

Au niveau de l'Union Européenne l'évolution des productions de graines oléagineuses est indiquée sur la figure 18. La France reste le premier producteur de ces graines oléagineuses et protéagineuses avec plus de 40 % de cette production.

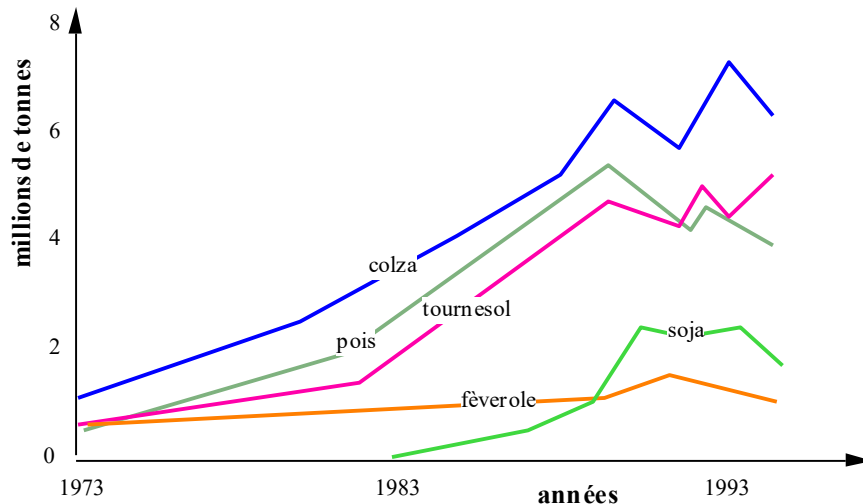


figure 18. Evolution des productions communautaires d'oléagineux et protéagineux.

La culture du soja en France est possible dans le sud à partir d'une ligne Nantes-Nevers-Annemasse, et impossible dans le Massif Central. Ses exigences en températures cumulées sont de 2000 à 1500 °C, la température du sol au moment du semi devant être supérieure à 12°C, l'optimum se situant entre 22 et 27°C. Plante exigeante en eau avec une bonne répartition, ses besoins varient entre 350 et 550 mm. Le soja se cultive bien dans des sols acides (pH 6 - 6,5) peu calcaires (inf à 15 ‰). Il existe des variétés bien adaptées telles que ALTONA, CHIPPEWA 64 ou encore AMSOY 71 dont les rendements en graines sont respectivement de 2750, 2690 et 3220 kg par hectare et par an. Les teneurs en protéines sont comprises entre 38 et 43 % et celles en lipides entre 20 et 23%.

L'inoculation du sol par une bactérie (*Rhizobium japonicum*) est nécessaire pour faciliter la formation des nodules sur les racines. Comme il s'agit d'un germe aérobie il est nécessaire que les sols soient bien aérés. La graine est récoltée quand elle est jaune, sphérique et non rayable à l'ongle. Son humidité est alors voisine de 16 %. La durée totale de la culture varie selon les variétés entre 95 et 150 jours.

X.3. MORPHOLOGIE ET COMPOSITION DE QUELQUES GRAINES DE LEGUMINEUSES

Les graines de légumineuses comprennent trois principales parties (figure 19) :

- **une enveloppe** protectrice dont l'épaisseur, le poids relatif et la rigidité varient d'une graine à une autre. Ainsi par rapport à 100 g de graine elle représente environ 7 g pour le soja, 17 pour le colza, 25 pour le tournesol, 10 pour le pois sec et le haricot, 12 pour le pois-chiche et la fêverole, 17 pour la fève fraîche, 15 pour le lupin et 9 pour la lentille. Très pauvre en eau, elle est en grande partie composée de glucides insolubles (fibres) tels que cellulose, hémicelluloses et lignines.

- **Deux cotylédons** qui contiennent des protéines de réserve souvent localisées dans des corpuscules (corps protéiques), des lipides qui dans le cas des oléagineux sont localisés dans des sphérosomes, des glucides (amidon, cellulose, hémicellulose, pectines, hexoses, saccharose, raffinose, stachyose etc...) en quantités variables selon la graine, des sels minéraux, des vitamines et d'autres composés dont certains possèdent des effets antinutritionnels ou même toxiques.

Les légumineuses qualifiées d'**oléagineux** sont caractérisées par des teneurs élevées en lipides (entre 18 et 45 %) tandis que les autres légumineuses possèdent des teneurs importantes en glucides et plus particulièrement en amidon, ce polymère représentant entre 60 et 80 % des glucides totaux. De par leur composition, les légumineuses sont de bonnes sources de minéraux dont la disponibilité peut être réduite chez certaines graines par des phytates.

- **un germe** ou hypocotyle qui représente 1 à 3 % du poids de la graine et dont les teneurs en protéines, lipides et glucides sont respectivement voisines de 40, 10 et 45 %. Le germe contient de nombreuses protéines à activité enzymatique. Par ce fait, du point de vue nutritionnel, il constitue une source de protéines souvent équilibrée. Néanmoins, les activités de ces protéines peuvent générer des modifications de structures ou de composés et induire ainsi des altérations soit du goût, soit de l'odeur, soit de la couleur etc. Il est donc souvent nécessaire d'éliminer le germe et de le valoriser dans une démarche technologique adaptée.

Pour le soja, il est possible de sélectionner par voie génétique des variétés plus ou moins riches en protéines (40-45 %) et en lipides (18-20 %). A un gain de protéines de 1 % en poids correspond généralement une baisse de la teneur en lipides de 0 à 5 %.

L'enveloppe est formée de 4 à 5 couches de cellules (figure 19) et les cotylédons de cellules ovoïdes contenant des sphérosomes à huile et des corps protéiques dont les diamètres respectifs sont compris entre 0,1 et 0,5 d'une part et 2 et 10 mm d'autre part. Les corps protéiques sont relativement résistants et peuvent être séparés d'une farine délipidée broyée dans des conditions relativement douces.

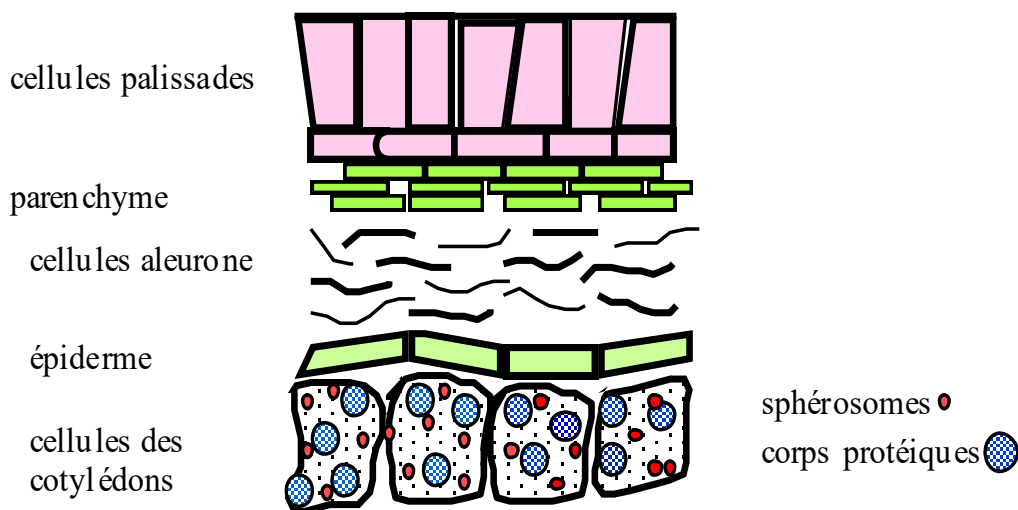


Figure 19. Morphologie de la graine de soja.

La plus grande majorité des protéines des graines de légumineuses est localisée dans ces corps protéiques. Il s'agit de protéines de réserves qui permettent, après hydrolyse, à l'embryon de disposer d'azote ou d'acides aminés. Ces protéines de réserves sont essentiellement des globulines de masse moléculaire généralement supérieure à 100 000 daltons ; elles constituent de 60 à 90 % des protéines totales de la graine.

La graine contient d'autres protéines à activités variées (structurales, enzymatiques, fonctionnelles, antinutritionnelles).

10 % des substances azotées de ces graines sont constitués de peptides de masses moléculaires comprises entre 2 000 et 10 000 D et d'acides aminés libres. La répartition des protéines varie selon les structures de la graine (tableau 20).

Tableau 20. Répartition des composants de la graine en fonction de leur localisation morphologique.

Graine	Partie	Protéines %	% des protéines de la graine	Lipides %	Glucides %	Cendres %
SOJA	Graine	40	100	20	35	4,9
	Cotylédons	43	90	23	29	5
	Enveloppe	8,8	8	1	86	4,3
	Hypocotyle	41	2	11	43	4,4
TOURNESOL	Graine	25	100			
	Cotylédons	29	88			
	Enveloppe	4	12			

La composition moyenne de quelques graines de légumineuses est indiquée dans le tableau 21. Il apparaît ainsi que les oléagineux sont caractérisés par des teneurs en lipides élevées comprises entre 18 et 45 % tandis que le taux de glucides est élevé chez les légumineuses. Il s'agit alors essentiellement d'amidon.

Les fibres localisées dans les membranes cellulaires sont essentiellement constituées par des celluloses, hémicelluloses, pectines et lignines.

Tableau 21. Composition moyenne de quelques graines de légumineuses (g p. 100 g de graines).

graine	eau	protéines	lipides	glucides totaux	(fibres)	sels minéraux	Ca (en mg pour 100 g)	Na	Mg	K
soja	11	38	18	24	12	5	250	10	290	1100
colza	10	20	42	21	17	5	300			
arachide	9	20	45	18		4,5				
tournesol	9	23	35	22	15	6	130	35	200	600
coton	8	44	27	12		5				
pois lisse frais	82	5,5	0,3	11	8	0,4	20	130	25	
pois cassé sec	9	23	1,5	60	12	3,5	70		140	
pois chiche	10	20	5	58	15	4	150	25	30	
fève fraîche	88	3,8	0,2	6	4	0,4	15	5	30	
haricot blanc	11	23	2	55	17	4	145	20	170	
lentille	11	25	1	54	12	3	80	30	80	1000
fèverole	11	27	1,5	52	17	5	110	10	180	1200
lupin	12	34	10	35	20	3,5	180	10	150	900

X.4. VALEUR NUTRITIONNELLE DES PROTEINES DE GRAINES - COMPOSES ANTINUTRITIONNELS OU TOXIQUES.

Les graines de légumineuses sont consommées par l'homme à l'état frais ou sec et après cuisson depuis des siècles. Il s'agit d'aliments relativement riches en protéines, en glucides digestibles, en minéraux, en lipides pour certains et en vitamines. Relativement mal acceptés par les consommateurs en raison de leur goût prononcé et de facteurs psychologiques complexes, il est recommandé de les cuisiner en plats d'accompagnement de viandes par exemple. Il est bon de rappeler ici que la cuisson à la vapeur préservera mieux certains de leurs composants hydrosolubles. Leur valeur énergétique, leurs coefficients d'efficacité protéique et d'utilisation digestive, leur acide aminé limitant et leurs éventuels facteurs toxiques ou antinutritionnels sont précisés dans le tableau 22.

Tableau 22. Valeur nutritionnelle de quelques graines de légumineuses

graine	kJ/100 g	CEP	CUD	acide aminé limitant	Facteurs toxiques ou antinutritionnels
soja	1750	1,1(2,3)	85	MET	IT, saponines, FF, lectines, phytate, glucosinolates
colza	2200	2,6	80	équilibré	thioglycosides, phytate, FF
arachide	2150	1,6		MET	aflatoxines, glucosinolates
tournesol	1950	2,1		LYS	polyphénols
coton	1850	2,3		LYS-MET	gossypol, phytate
petit pois cru	305	1,7	86	MET	IP, phytate, FF, lectines, facteurs cyanogénétiques
pois-chiche	1500	1,7		MET	IP, phytate, FF
fève	150	1,7		MET	facteurs de favisme, tannins, IP, FF, phytate, lectines
haricot	1400	1,8	81	MET	FF, acides aminés, lectines, glucosinolates, F. cyanogénétiques
lentille	1400	1,9	88	MET	FF, facteurs cyanogénétiques
fèverole	1400	1,8		MET	facteurs du favisme, tannins, IT, FF, polyphénols, phytate, lectines
lupin	1500	0,7	86	MET	alcaloïdes

CEP : coefficient d'efficacité protéique (caséine 2,6)

IT : inhibiteurs tryptiques , IP: inhibiteurs de protéases

CUD : coefficient d'utilisation digestive

FF : facteurs de flatulence

CEP du soja cuit (2,3)

Les dérivés toxiques ou antinutritionnels des graines de légumineuses ont fait l'objet de très nombreuses études. il s'agit le plus souvent de composés synthétisés par la plante ou apportés par des contaminations. Parmi les plus importants rencontrés chez les légumineuses on peut citer :

X.4.1. Les inhibiteurs de protéases

Il s'agit de protéines de masses moléculaires comprises entre 7000 et 20000 daltons qui se fixent de façon quasi irréversible sur certaines protéases digestives (trypsine avec K_d égal à 2.10^{-10} M et chymotrypsine). L'inactivation qui en résulte se traduit alors par une hypersécrétion compensatrice de l'organisme et donc par des hypertrophies d'organes (pancréas avec **l'inhibiteur de Kunitz**).

Les protéases complexées avec ces molécules ne sont pas digérées; la perte d'azote endogène est alors considérable et se traduit globalement par une perte très importante en méthionine. Ces inhibiteurs sont très facilement inactivés par traitement thermique (cuisson, autoclavage, etc..) et par les acides et les alcalis. L'inhibiteur de Kunitz a une masse molaire de 21000, un pHi de 4,5 et 181 résidus d'acides aminés avec 2 ponts disulfure ; celui de **Bowman Birk** une poids moléculaire de 7860, 71 résidus d'acides aminés et 7 ponts disulfure qui lui confèrent une plus grande stabilité à la dénaturation.

Ils sont présents chez le soja, le haricot, le pois, l'arachide, la fève et certaines céréales.

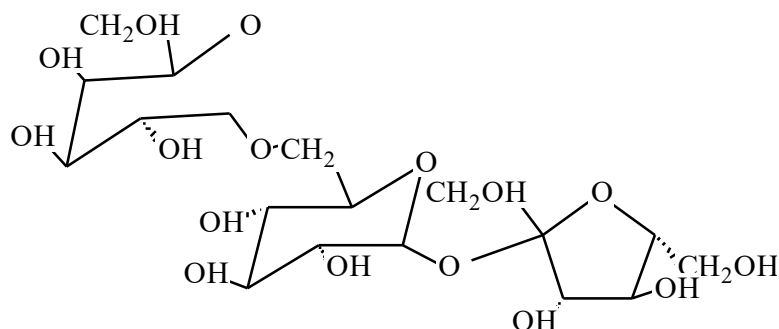
X.4.2. Les hémagglutinines ou lectines

Ces glycoprotéines de masse moléculaire élevée (entre 20000 et 270000 daltons) ont la propriété d'agglutiner spécifiquement les hématies. Après ingestion, elles se fixent sur les membranes des entérocytes dont elles altèrent certaines des fonctions. Consommées régulièrement elles peuvent provoquer des retards de croissance, des colites, de l'anémie etc...

Ces composés sont facilement inactivés par la chaleur et sont présents chez le soja (2 % des protéines, PM = 120 000), le haricot (PM = 98 à 270 000) , la fève (concanavaline A), la pomme de terre (PM = 20000), le blé (PM = 26 000), la lentille (PM = 42 à 69 000), le ricin (ricine D dont la DL₅₀ est de 5 mg / kg de poids vif).

X.4.3. Les facteurs de flatulence

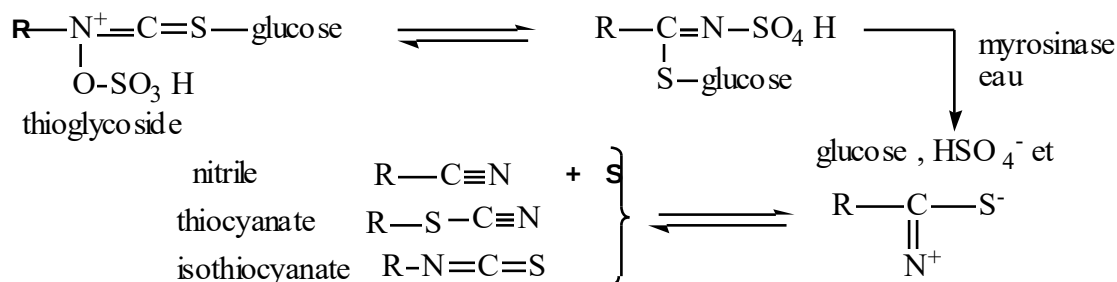
Certaines légumineuses contiennent des composés glucidiques qui induisent après ingestion de la flatulence (production de gaz intestinaux) suivie parfois de crampes abdominales et de diarrhée. Ainsi l'ingestion de 100 g de haricots secs peut se traduire par la formation de plusieurs litres de gaz. Les substances responsables de cette flatulence sont des polyosides qui comportent des liaisons a osidiques entre les carbones C1 d'une molécule de galactose et C6 d'une molécule de glucose par exemple. Les composés les plus souvent rencontrés chez les légumineuses sont le **raffinose** (α galactose 1-6 β -glucose 1-2 β -fructose), le **stachyose** (α galactose 1-6 raffinose) et le **verbascose** (α galactose 1-6 stachyose). Leur teneur peut atteindre plus de 5 g pour 100 g de graine. Non hydrolysés par les glucosidases intestinales, ces molécules parviennent alors au contact des bactéries intestinales. Celles-ci possèdent un équipement enzymatique leur permettant l'hydrolyse de la liaison 1 - 6 et l'utilisation métabolique dont une des résultantes est une production de gaz (surtout du CO₂). Hydrosolubles, ces composés peuvent être en partie éliminés grâce à leur solubilité dans l'eau (par cuisson dans l'eau par exemple).



Structure du raffinose (O - α -D -galactopyranosyl-(1-6)- α -D-glucopyranosyl- β -D-fructofuranoside

X.4.4. Les thioglycosides ou glucosinolates

Il s'agit d'hétérosides présents en quantité non négligeable dans les graines de colza. Leur formule générale est la suivante :

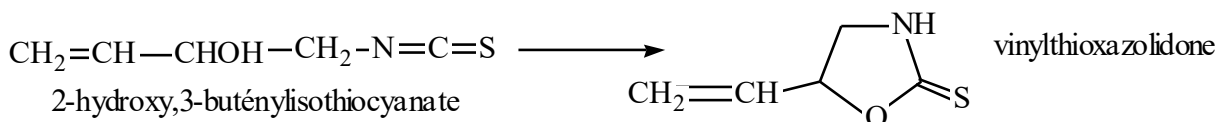


R = 3-butényl : $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-$: le thioglucoside est la gluconapine

R = 4-pentényl : $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$: “ “ “ “ brassiconapine

R = méthyl thiobutyl : bricine R = méthyl thiopentyl : bertérine

R = 2-hydroxy,3-butényl : le thioglycoside est la **progoitrine** dont l'ITC se cyclise au contact de l'oxygène pour donner la **5-vinylthioxazolidone (VTO)**



Chez le soja et l'arachide R correspond à des dérivés de phénols et chez les crucifères (colza) à des isothiocyanates dont la nature conduit à des thioglucosides variables (progoitrine, sinigrine, gluconapine, etc...).

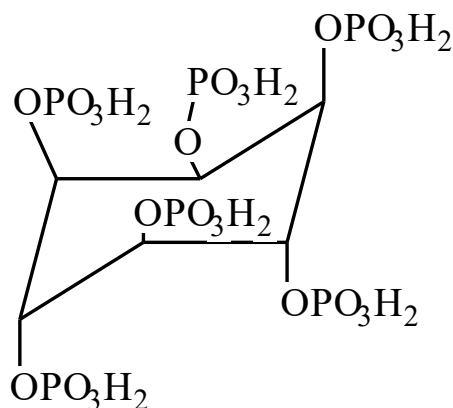
Au cours du broyage de la graine ces composés sont mis au contact d'une enzyme endogène (la myrosinase, mélange de glucosidase et de sulfatase) et transformés en glucose, sulfate et isothiocyanates (ITC). A partir de la progoitrine il se produit une cyclisation de l'ITC conduisant à la formation de 5-vinyl thioxazolidone (VTO). Les ITC et la VTO diminuent l'acceptabilité des aliments et stimulent la sécrétion de l'hormone TSH (thyroïdestimuline hypophysaire); il en résulte une perturbation de la synthèse de thyroxine (hypertrophie thyroïdienne) et par voie de conséquence du métabolisme de l'iode.

Ce sont ces substances qui limitent l'utilisation des farines délipidées de colza en alimentation humaine. Il existe actuellement des variétés sans thioglycosides qui permettront une plus large utilisation des produits dérivés de ces graines.

X.4.5. L'acide phytique

Il s'agit d'un polyacide (hexamétaphosphate de myoinositol) capable de former des complexes avec des cations divalents dont l'assimilation est alors fortement perturbée (fer, zinc, calcium, magnésium, manganèse, cuivre). Ce composé réagit avec les protéines à pH acide en formant des complexes stables qui sont néanmoins dissociés (à pH 3) en présence de calcium.

Ce composé, source de phosphore chez le végétal, est rencontré chez le colza, le coton, le sésame, l'arachide, le soja et à un degré moindre dans les céréales (riz, blé).

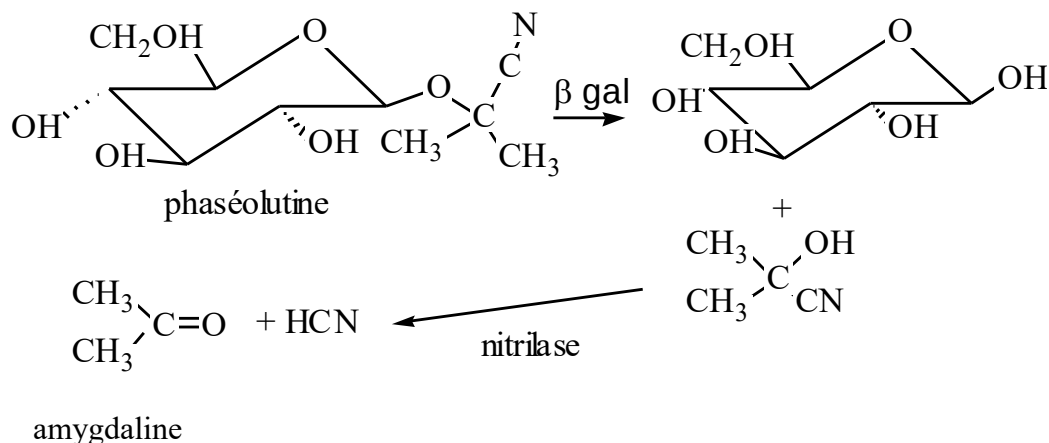


L'**acide oxalique** conduit également à une baisse de biodisponibilité de ces cations en formant des oxalates.

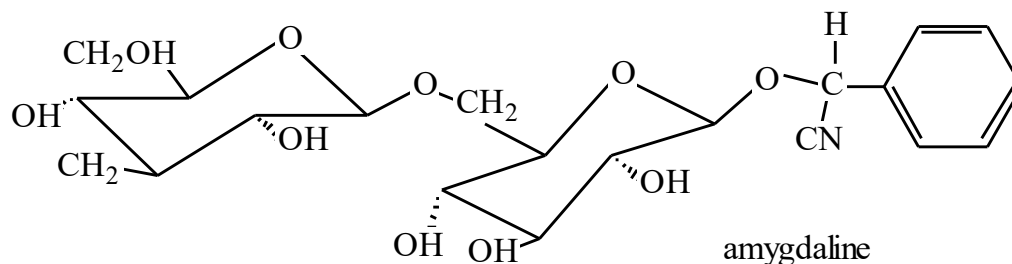
X.4.6. Les composés cyanogénétiques

Ces composés libèrent par hydrolyse enzymatique ou chimique, de l'acide cyanhydrique qui est extrêmement toxique (léthal à 1 mg par kg de poids corporel). Leur teneur dans les graines de légumineuses couramment consommées est telle que leur incidence est négligeable (0,1 à 1 mg par g dans le haricot *Phaseolus lunatus* , 0,02 dans le pois , 2 dans le sorgho etc.).

Par cuisson dans l'eau, l'acide cyanhydrique éventuellement formé est éliminé par solubilisation et distillation.

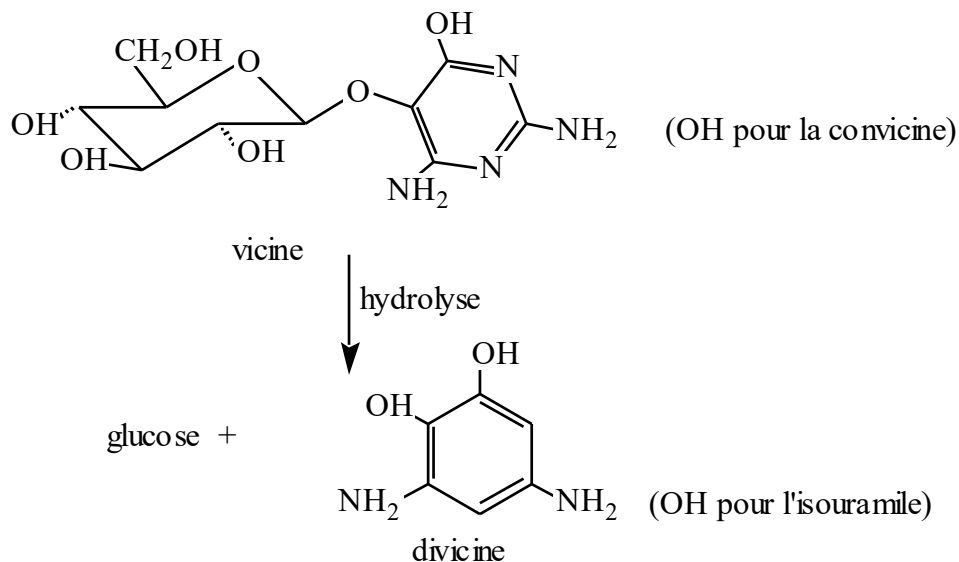


La structure de l'amygdaline est indiquée ci-dessous.



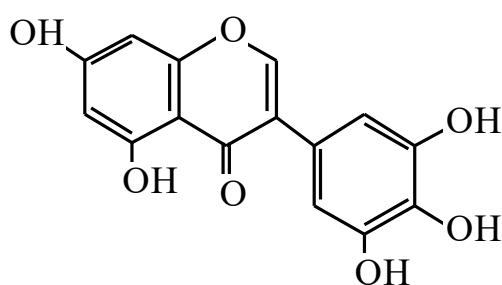
X.4.7. Les facteurs du favisme

Le favisme est une maladie hémolytique apparaissant chez des sujets prédisposés déficients en glucose-6-phosphate déshydrogénase et consommant certaines graines de légumineuses (fève et pois). Le syndrome hémolytique résulterait de l'action de la divicine ou de l'isouramile en association avec des hémagglutinines.

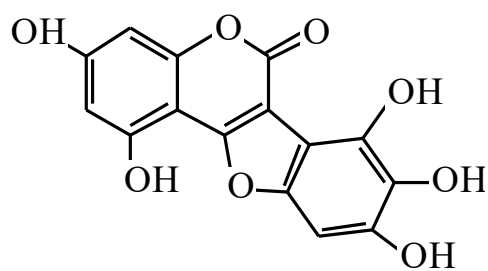


X.4.8 Les glycosides isoflavoniques et coumestanes

Ces composés présents dans les graines de nombreuses légumineuses possèdent des propriétés oestrogènes qui se traduisent surtout par des retards de croissance. Leur teneur reste négligeable dans les graines consommées par l'homme. La génistine et la daidzine du soja sont parfois présentes à des teneurs équivalentes à 10 mg de diéthylstilbestrol par g de protéine.



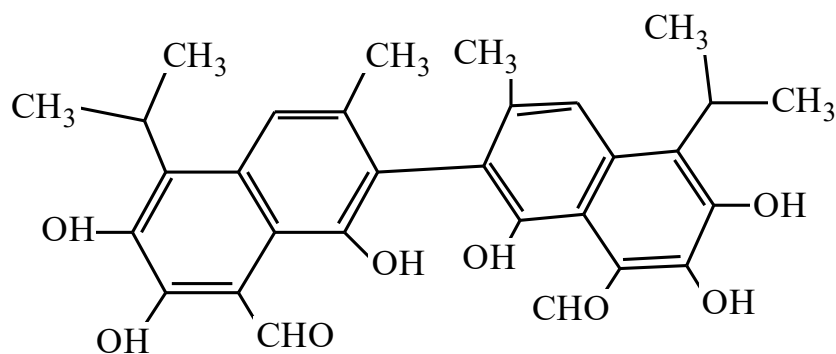
isoflavone



coumestane

X.4.9. Le gossypol

Il s'agit d'un composé polyphénolique toxique spécifique aux graines de coton dans lesquelles il est localisé dans des cellules spécifiques (glandes à gossypol). Ce polyphénol provoque des dommages hépatiques (oedèmes, hémorragies). Il existe actuellement des variétés de coton sans gossypol ; toutefois la toxicité de cette substance est fortement abaissée après addition de sulfate ferreux.



Par ailleurs, les glandes à gossypol peuvent être éliminées par séparateur cyclone en présence d'hexane.

X.4.10. Les allergènes

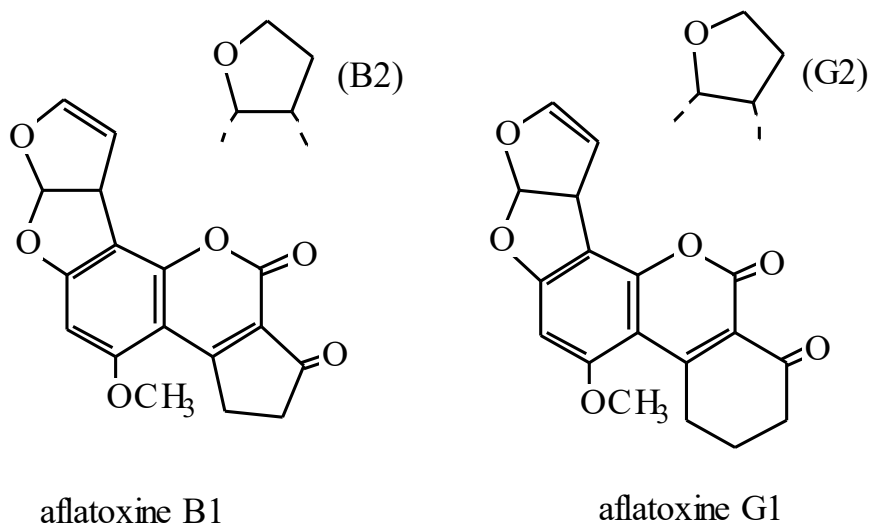
De nombreuses substances allergisantes sont présentes dans les graines de légumineuses et de céréales (gluten) ; elles induisent essentiellement des lésions digestives et cutanées. Chez le soja, des propriétés allergisantes ont été identifiées dans la fraction protéique 2 S.

X.4.11. Les antivitamines

Ces substances encore mal connues ont des effets spécifiques sur certaines vitamines (E dans le haricot, B6 dans le lin etc...). De plus , le broyage des graines met au contact les vitamines et des hydrolases spécifiques (thiaminase par exemple) ce qui se traduit par une perte de valeur nutritionnelle.

X.4.12. Les mycotoxines

De nombreuses moisissures sont capables de se développer sur les graines dans lesquelles diffusent certains produits de sécrétion toxiques (exotoxines). Le nombre de mycotoxines identifiées de nos jours est très important (aflatoxine : *Aspergillus flavus*, stérigmatocystine : *Aspergillus vericolor*, patuline : *Penicillium patulum*, ochratoxine : *Penicillium veridicatum*, etc).



Les aflatoxines (**B1**, **B2**, G1 et G2 surtout) sont généralement produites sur les graines par *Aspergillus* au cours de l'entreposage quand l'humidité relative est élevée. Il s'agit de composés dont le pouvoir hépatocarcinogène est très élevé. Après extraction de l'huile ces composés se retrouvent

dans le tourteau au niveau duquel le taux maximum autorisé est de 0,7 ppm (arrêté du 15/2/73). Les teneurs de la plupart des tourteaux sont comprises, pour l'arachide, entre 0,2 et 1 ppm.

L'inactivation du pouvoir toxique de cette molécule peut être obtenue par la chaleur (quelques minutes à 300°C!!), par le formol à chaud (protéines tannées!), par l'hypochlorite de sodium (protéines modifiées) et par l'**ammoniac**. Dans ce cas il se forme, à partir de la cystine, de la déhydroalanine, qui se condense avec l' ϵNH_2 des résidus de lysine pour former de la lysinoalanine (LAL). Il peut, dans ce dernier mode de détoxification, y avoir isomérisation des acides aminés (cf chapitre influence des traitements technologiques sur les protéines).

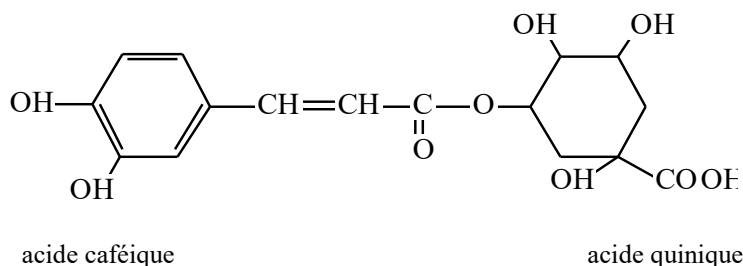
L'inactivation par une base repose surtout sur l'ouverture de la fonction lactone de la molécule.

X.4.13. Enzymes diverses

Des enzymes comme les α et β amylases, la lipase, la lipoxygénase, l'uréase et des protéases peuvent être présentes dans les graines et diminuer l'acceptabilité ou la valeur nutritionnelles des protéines qu'elles contiennent. Dans certains cas ces activités enzymatiques sont utilisées à des fins technologiques pour améliorer ou modifier la qualité de certains aliments.

X.4.14. Les polyphénols

Des polyphénols tels que l'acide chlorogénique, ester de l'acide caféique et de l'acide quinique, sont présents dans certaines graines. Ainsi les graines de tournesol en contiennent de 3 à 4 %. Ces composés sont susceptibles de s'oxyder en présence d'oxygène spontanément à des pH supérieurs à 8 ou au contact de polyphénoloxydases à des pH voisins de 6.



Il se forme des quinones très réactives, qui réagissent avec des donneurs d'électrons comme les ϵNH_2 - des résidus de lysine, ce qui conduit à une baisse de disponibilité de cet acide aminé (figure 20). Par ailleurs il se forme des composés bruns qui s'associent aux protéines au cours de leur préparation. Les isolats bruns ainsi obtenus ont des utilisations limitées en raison de leur couleur.

L'élimination de ces composés ou le développement de technologie conduisant à des protéines blanches ont fait l'objet de nombreux travaux.

- Dans la première technologie, la solubilisation des protéines est réalisée à partir du tourteau en présence d'hydroxyde de sodium 0,05 N et de Na_2SO_3 à 0,5%. Après centrifugation le surnageant est ultrafiltré. Les polyphénols, oses, minéraux et azote solubles se retrouvent dans le perméat. Le rétentat est ajusté à pH 4 ; le précipité récupéré par centrifugation est lavé à l'eau puis à l'alcool. Le rendement de récupération des protéines est d'environ 80 %.

- Dans la deuxième technologie, le tourteau est mis en suspension à pH 7 en présence de sels de calcium et de magnésium et de sulfite puis amené à pH 10,5 pour solubiliser les protéines. L'acide chlorogénique forme du chlorogénate de calcium ou de magnésium insoluble qui est séparé des protéines par centrifugation. Les protéines sont ensuite récupérées par précipitation à pH 4 avec un rendement voisin de 40-50% (Brevet PETIT).

- La troisième technologie consiste à solubiliser les protéines à pH 10,5 à 50°C pendant 60 minutes en présence de Na_2SO_3 1% et H_2O_2 0,4 M. Le rendement de recouvrement des protéines est d'environ 55 %. La méthionine est oxydée en sulfoxyde (85%) et en sulfone (15%) ce qui se traduit par une diminution de valeur nutritionnelle et la formation d'un toxique.
- Une dernière approche consiste à éliminer l'acide chlorogénique du tourteau par extraction dans une solution éthanolique à 70% acidifiée à pH 4. Environ 90% de ce polyphénol sont ainsi éliminés avant extraction des protéines.

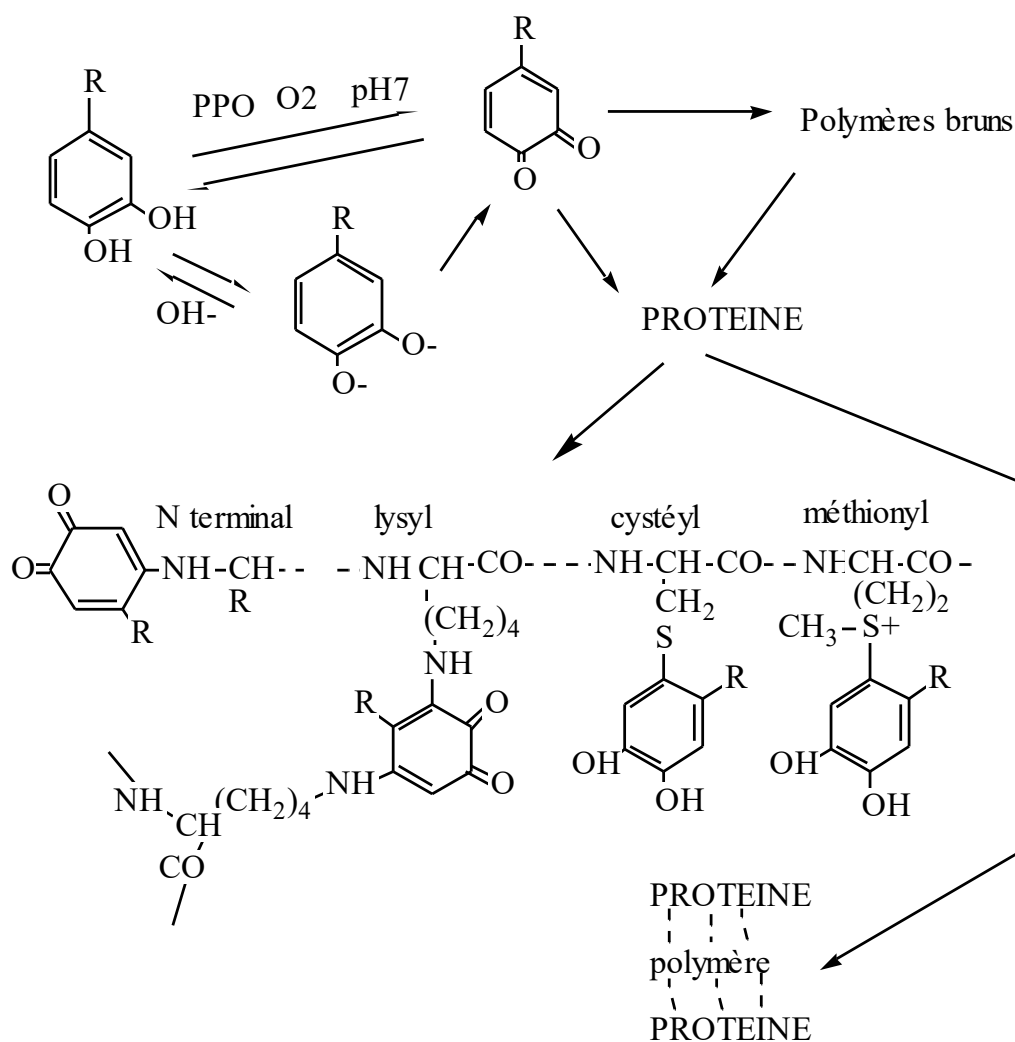


Figure 20. Schéma des interactions protéines-polyphénols

Tous les composés toxiques ou antinutritionnels susceptibles de se trouver dans les graines de légumineuses limitent souvent leur utilisation en alimentation humaine. C'est par sélection génétique et/ou des traitements de détoxification de ces graines ou de leurs dérivés que leur consommation pourra augmenter de façon significative. Il ne faut pas perdre de vue qu'elles constituent des sources importantes en énergie, en minéraux et surtout en protéines. Leur cuisson améliore généralement leur appétence, favorise la digestibilité des amidons et des protéines qu'elles contiennent et inactive certains composants toxiques ou antinutritionnels.

X.5. UTILISATIONS TRADITIONNELLES DES PROTEAGINEUX

Ce sont les graines riches en protéines (légumineuses) et les fractions protéiques extraites de graines (oléagineux et plus particulièrement soja) qui sont depuis fort longtemps consommées par l'homme. En **Occident**, la consommation du soja est souvent indirecte au travers d'aliments animaux ou de produits alimentaires intermédiaires (**PAI**).

En **Extrême-Orient**, le soja est consommé depuis des millénaires sous forme de produits **liquides** (tonyu, sauces etc), **solides** (germes, graines grillées, etc) ou encore **pâteux** (tofu, miso, tempeh etc.), produits qui sont parfois fermentés. Le goût de haricot lié à ces produits est très bien accepté et même recherché par les consommateurs orientaux alors qu'il constitue un obstacle au développement de consommation de ces produits par les occidentaux.

Environ 3 millions de tonnes de graines d'oléagineux, et plus particulièrement de soja, sont consommés par l'homme sous forme d'aliments traditionnels.

La technologie traditionnelle de valorisation de ces graines passe toujours par la mise en solution des protéines qu'elles contiennent. Restent associés aux protéines, les fractions hydrosolubles et lipidiques tandis que l'insoluble glucidique est éliminé. La solution émulsionnée peut être assimilée, dans les transformations technologiques qu'elle peut subir, au lait de vache : concentration, gélification, fermentation, etc.

Le **jus de soja** ou **lait de soja** ou **tonyu** constitue la première base pour de nombreux produits tels que le tofu.

X.5.1. Le lait de soja.

La SOJAXA (regroupement d'industriels) qualifie de tonyu ou lait de soja le jus obtenu par broyage de graines entières et d'eau (AFNOR NF V 29-001). Sa production industrielle ne date que de 1936. Les graines sont trempées puis broyées en milieu aquaux et filtrées : le jus est le **tonyu** tandis que le résidu est l'**okara**. Plus de 150 000 tonnes de tonyu sont consommées aujourd'hui au Japon. Dans la Communauté Européenne, la consommation de tonyu reste très faible par rapport à celle du lait de vache (tableau 23).

Tableau 23. Consommations du lait de vache et de soja dans certains pays de la CEE et d'Extrême-Orient(en 10³ tonnes)

Pays	Lait de vache	Lait de soja
Japon	5 500	150
Corée du Sud	≠ 0	80
Italie	10 000	0,9
Espagne	6 500	1,2
Allemagne	32 000	3
Grande-Bretagne	15 000	8

En France de sont les « Industriels Laitiers » qui assurent le développement des produits issus du soja. Rappelons qu'en France seuls 10% du lait de vache sont consommé sous forme liquide. La composition du lait de soja varie avec la teneur en eau utilisée lors de l'extraction (tableau 24).

Tableau 24. Composition moyenne des laits de vache et de soja (g par kg et mg par kg pour les minéraux).

	Lait de vache	Lait de soja
Eau	87,5	93
Protéines	3,2	3,6 à 5,2
Lipides	3,2	1,5 à 3,2
dont cholestérol	0,013	0
Glucides	5,2	1,7
Calcium	1200	150
Phosphore	950	450
Potassium	1450	1300
Magnésium	120	200
Sodium	500	150
Fer	0,3	5

Le **goût de haricot** est un handicap qui apparaît au moment du broyage de la graine crue. Il résulte de la délocalisation de la **lipoxygénase** (groupe d'enzymes avec surtout l'isozyme LOX-2) qui catalyse l'oxydation des cis,cis,1-4 pentadiènes en formant des 1,3 cis, trans hydroperoxydes qui se décomposent en vinyl cétone, n-hexanal, n-pentanal et 1-octène-3-ol responsables du goût de haricot. L'action de cette enzyme doit être inhibée le plus rapidement possible (par dénaturation par la chaleur, en s'éloignant du pH optimum voisin de 6,5, par élimination du germe qui contient l'essentiel de l'activité, par délipidation).

Il est possible de masquer le goût de haricot par des arômes intenses (vanille, chocolat, café).

Des composés phénoliques oxydés contribuent aussi, par leur flaveur désagréable, au goût du lait de soja. Il s'agit d'isoflavones (daidzine et génistine) et de leurs précurseurs glycosylés (daidzéine et génistéine). La **β -glucosidase**, responsable de l'hydrolyse, peut être inhibée par la δ -gluconolactone à 0,5 %.

La production de lait de soja passe toujours par un traitement thermique qui inhibe les enzymes et inactive certains facteurs antinutritionnels protéiques (inhibiteurs trypsiques, lectines). Cependant il doit préserver la solubilité des protéines et la stabilité de l'émulsion. Les effets sur les protéines seront d'autant plus grands qu'ils se situent à des pH proches de leur pHi et à force ionique faible. Plus la teneur en eau est élevée et plus l'insolubilisation des protéines sera, pour un traitement thermique donné (temps / température / pH / μ), élevée.

Les principaux paramètres de cette réaction sont indiqués dans le tableau 25 pour des graines traitées dans 20 g d'eau / g de graine.

Si une sonication (entre 15 et 20 kHz) est réalisée en même temps que le traitement thermique, l'effet d'inactivation des activités enzymatiques nuisibles (lipoxygénase en particulier) semble amplifié.

Tableau 25. Quelques paramètres de l'inactivation thermique d'enzymes du soja.

Enzyme	Température du traitement (°C)	pH	eau ajoutée (g/g de graine)	(constante de vitesse en sec ⁻¹)	t ₉₉	insolubilisation des protéines (%) ou inactivation (%)
Lipoxygénase	90	6,7	20	0,44	10,7	99
	90	10	20	0,40	12	99
	95	6,7	20	0,80	5,9	99
Inhibiteur Kunitz	90	6,7	20	0,10	42	70
	95	6,7	20	0,16	30	60
	100	6,7	20	0,18	23	52
Protéines	90	6,7	20	0,05	97	40
	95	6,7	20	0,065	72	30

Enfin il est évident que les protéines du soja auront un comportement qui dépendra d'abord de leur nature.

Les principales étapes de fabrication du lait de soja sont schématisées sur la figure 21.

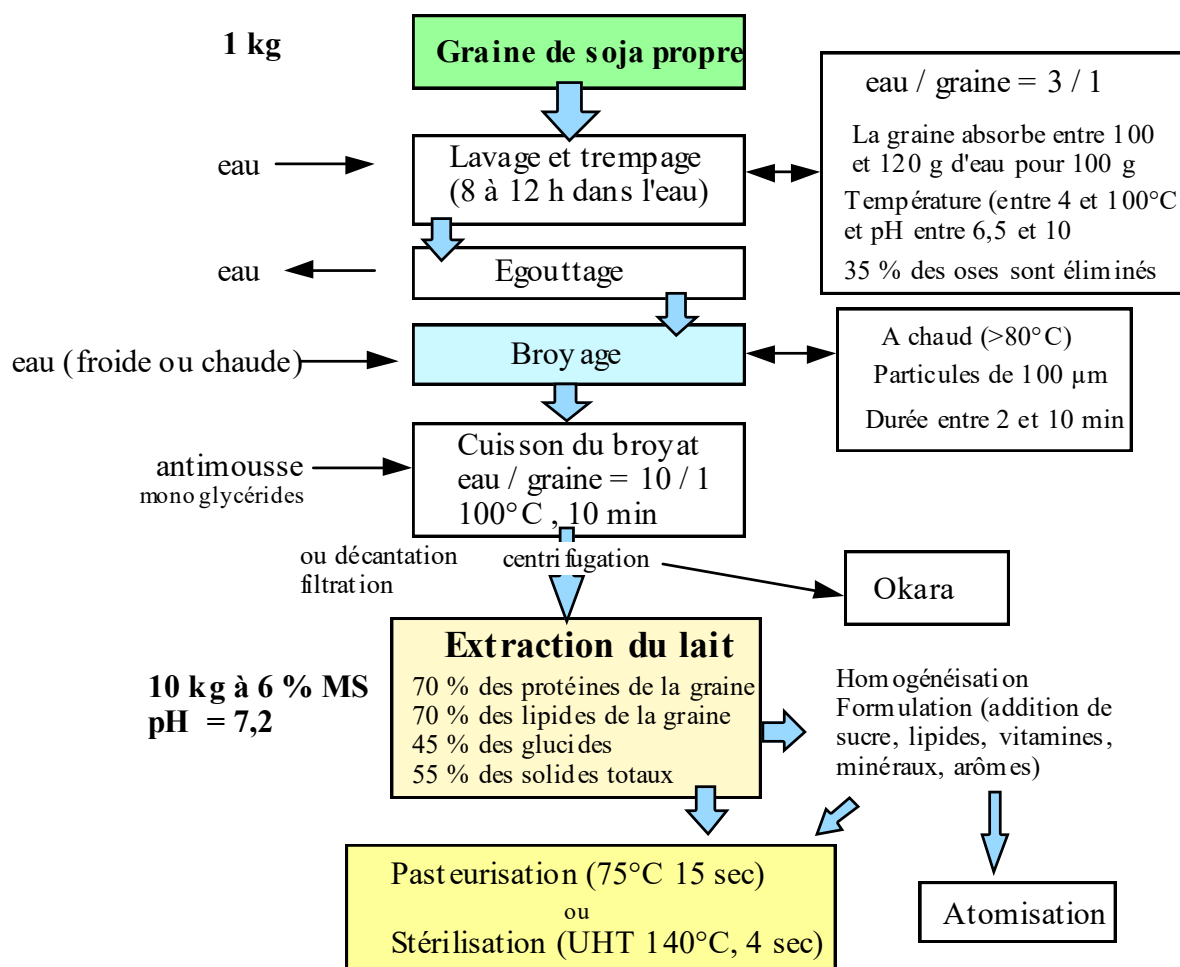


Figure 21. Fabrication de tonyu - lait de soja.

Les graines traitées à 95°C pendant 15 minutes lors de leur décorticage perdent 20 % de leur activité lipoxygénasique.

X.5.2. Le tofu

Il s'agit d'un concentré protéique obtenu par coagulation des protéines du lait de soja. Il est consommé directement ou après cuisson (friture) ou encore mélangé à d'autres aliments.

Il est traditionnellement consommé depuis plusieurs millénaires en Extrême-Orient.

Il s'agit d'un **produit frais** facilement dégradable qui nécessite entre autre une conservation à froid. La pasteurisation et la stérilisation permettent l'obtention de produits à durée de vie relativement longue.

Pour obtenir la structure gélifiée, les protéines du lait de soja sont soumises à un traitement thermique en présence de sels. Le nigari ajouté traditionnellement est le résidu sec de l'eau mère de cristallisation du NaCl c'est à dire un sel composé à plus de 90 % par du MgCl₂. Actuellement on utilise un mélange de CaSO₄ et de Mg Cl₂ ou du CaSO₄ issu du gypse (0,5 à 0,7 % selon le niveau d'hydratation du sel).

Le réseau gélifié obtenu (le caillé) résulte des effets pontants des cations bivalents qui réagissent avec les groupements carboxyliques des protéines déprotonés à pH voisin de 5,9 qui est le pH final du produit. Les lipides restent associés aux protéines au cours de cette gélification. Le caillé est recueilli par filtration.

La séparation naturelle par crémage permet d'obtenir un film protéique, le **yuba**, qui est collecté en surface. Sa collecte est réalisée à l'aide d'une baguette dans la lait additionné de nigari et chauffé à 75°C. Le yuba peut être obtenu sans additif de coagulation et contient alors 60 % de protéines et 30 % de lipides.

Il est possible d'obtenir la formation d'un réseau gélifié en ajoutant au lait de soja de la δ -gluconolactone (0,4 %) qui en s'hydrolysant en acide gluconique acidifie le milieu. Les protéines perdent alors leurs charges nettes négatives et interagissent à un pH voisin de leur pHi en formant un réseau gélifié. Ce gel est plus fragile que le gel calcique.

Le tofu soumis à une fermentation puis aromatisé donne du **sufu**. La fabrication de ces produits est à rapprocher de nos technologies fromagères.

X.5.3. Le koji

Il s'agit d'une préparation particulièrement riche en activités enzymatiques comparable aux levains de boulangerie ou de fromageries. Elle repose sur une fermentation sur un milieu solide qui est la graine de soja soumise à une cuisson préalable. Le germeensemencé est *Aspergillus orizae* à raison de 1 g de spores (10¹⁰ spores) par kg de graines. La fermentation dure de 2 à 3 jours à 25-30°C. L'aérobiose contrôlée favorise la production d'enzymes. Les protéases produites dans ce système sont nombreuses (protéase alcaline, protéases neutres, protéases acides, carboxypeptidases, leucine aminopeptidase etc).

X.5.4. Le tempeh

Ce produit est obtenu à partir de graines de soja dépelliculées puis cuites etensemencées avec un *Rhizopus*. Le CEP des protéines de tempeh est supérieur à celui de la caséine.

X.5.5. Le miso

Il s'agit d'un produit très répandu au Japon qui a la consistance du beurre. Il est obtenu par fermentation d'un mélange de soja et de riz (ou d'orge) préalablement cuits. Cette pâte rentre dans la composition de très nombreux aliments. Il contient en moyenne 50 % d'eau, 14 % de protéines 5 % de lipides et 16 % de glucides.

X.5.6. Le shoyu

Il s'agit d'une sauce à base de soja, riz et blé cuits puis fermentés dont il existe de nombreuses variantes (koikuchi, usukuchi, tamari, shiro, saishikomi). Il s'agit d'une sauce brune, très riche en acides aminés libres, de flaveur prononcée. Elle est utilisée pour relever de très nombreux plats.

X.6. PRINCIPALES PROTEINES DE GRAINES DE LEGumineuses

X.6.1. Généralités

Ces protéines sont localisées presque exclusivement dans les deux cotylédons. C'est au cours de la genèse de la graine que ces protéines de réserve apparaissent dans les vacuoles. Elles sont synthétisées sur les polysomes puis transférées dans les corps protéiques vacuolaires. Des modifications post-traductionnelles interviennent au cours de ce transfert (dans la lumière du réticulum endoplasmique, dans l'appareil de Golgi et dans les vacuoles). La variabilité de composition de ces protéines dépend de très nombreux facteurs.

Dans les graines de légumineuses il existe 4 classes principales de protéines (Osborne, 1908) :

- les **albumines** solubles dans l'eau (10-20 % des protéines de la graine)
- les **globulines** solubles dans solutions salines diluées, insolubles ou peu solubles dans l'eau (60-90 %)

Les autres classes sont moins représentées; il s'agit des :

- **prolamines** solubles en milieu éthanol/eau
- **glutélines** solubles en milieu alcalin (pH 12, soit NaOH 0,2%).

Les globulines et prolamines sont des sources d'azote et de carbone qui jouent le rôle de protéines de réserve.

Les albumines correspondent à des molécules à activité enzymatique; il s'agit d'une fraction hétérogène. Cependant certains auteurs considèrent qu'il s'agit de véritables protéines de réserve.

X.6.2. Albumines

Dans les graines d'aleurone, ces protéines représentent 20 à 40 % de l'ensemble des protéines.

La **fraction 2 S** donne par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS et de β mercaptoéthanol (SDS-Page) quelques polypeptides dont la masse moléculaire est voisine de 12 000 daltons. Leur composition en acides aminés montre que les teneurs en asparagine et en arginine sont élevées, ce qui contribue à supposer qu'il s'agit effectivement de protéines de réserve. Ces protéines disparaissent très rapidement à la germination.

C'est dans la fraction 2 S que l'on rencontre des protéines comme les inhibiteurs trypsiques (PM 7860 - 21 500), les lectines, les oléosines qui sont localisées à la surface des globules lipidiques, le cytochrome C (PM 12 000), des enzymes comme les lipoxygénases, les glycosidases, les protéases.

Les **napines** du colza sont des protéines basiques (pHi voisin de 10) de poids moléculaires voisins de 13 000. La teneur en cystéine est élevée de même que la teneur en amides. La protéine est un dimère composé de deux protomères de 4 000 et 9 000 liés par deux ponts disulfure. L' α -hélicité est de 45% et les feuillets β représentent 10 % de la structure. Ces protéines appartiennent à une famille multigénique.

Les **albumines du tournesol** 2S représentent 30 % des protéines de la graine (SFA 1 à 8: sunflower albumin). Leur masse moléculaire varie entre 10 et 18 kD. La SFA8 de 103 résidus d'acides aminés est particulièrement riche en acides aminés soufrés.

X.6.3. Prolamines

Ces protéines sont essentiellement présentes dans les graines de céréales. Leur masse moléculaire se situe entre 19 000 et 22 500 daltons. La nomenclature de ces prolamines varie selon leur origine (zéine : maïs, gliadine : blé, hordéine : orge, sécaline : riz, avénine : avoine). Dans chaque espèce il existe au moins deux composés majeurs et parfois beaucoup plus.

X.6.4. Globulines

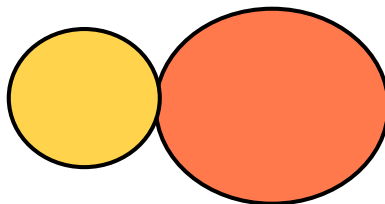
Ces protéines représentent entre 60 à 90 % des protéines totales des graines de légumineuses. Deux grands groupes de globulines peuvent être décrits : les légumine et les vicilines. Ces deux groupes de globulines sont caractérisables par leur coefficient de sédimentation: **11 S et 7 S**.

a) les globulines 11 S

Ces protéines ont des nomenclatures qui varient en fonction de leur origine :

légumine (fèves et pois), **glycinine** (soja) ou **protéine 11 S**, **arachine** (arachide), **édestine** (*Canabis sativa*) , **conglutine α** (lupin), **cruciférine** (colza), **hélianthine** (tournesol).

La plupart des légumine sont constituées de deux chaînes polypeptidiques α et β liées par un (ou plusieurs) ponts disulfure. Cet ensemble tend à s'aggréger en multimères de 2 à 6 sous-unités.



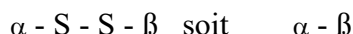
La structure tertiaire étudiée par dichroïsme circulaire montre que le pourcentage d' α -hélice est faible (6-14 %), celui de feuillets plissés atteint 30 % et le reste de la molécule est en pelote statistique. L'arachine et la glycinine ne sont pas cristallisables (par le système de la goutte pendante).

Chacune des sous-unités liée par pont disulfure comprend une protéine acide (α) dont la masse moléculaire est voisine de 40 000 daltons et une protéine basique (β) de masse moléculaire égale à 22 000 daltons.

Exemple : la glycinine du soja

La glycinine du soja a fait l'objet d'études très approfondies. Cette protéine qualifiée de **globuline 11 S** est séparable de la β conglycinine (7S) en présence de CaCl_2 , conditions dans lesquelles elle reste insoluble. Elle représente 40 % des protéines totales du soja. La masse moléculaire est égale à 363 000 daltons et le pHi est égal à 4,64.

Son hydrophobicité moyenne est égale à $0,94 \text{ kcal.résidu}^{-1}$ et sa composition donnée dans le tableau 26. Le nombre total d'atomes de soufre est de 48 (ponts disulfure ou thiols). L'unité de base correspond à une association par pont disulfure d'une unité acide (α) et d'une unité basique (β):



C'est le modèle de PLIETZ (1984) qui reste le plus probable. Les 6 sous-unités $\alpha\beta$ sont organisées en antiprisme trigonal. Les polypeptides α sont localisés en surface tandis que les polypeptides β sont internalisés et constituent le cœur hydrophobe. Il s'agit d'un ellipsoïde de révolution dont les axes sont de 11 et 7,5 nm.

Il existe au moins 5 types différents d'unités **acides** α_{1a} , α_{1b} , α_2 , α_3 , α_5 présentant, au niveau de leur composition en acides aminés, des grandes homologies qui les ont faites classer en 2 groupes (I : α_1 , α_2 ; II : α_3 , α_5). Leur masse moléculaire varie entre 31 000 et 45 000 daltons.

Il existe également au moins 6 types d'unités **basiques** β_1 , β_{1a} , β_{1b} , β_2 , β_3 , β_4 dont la masse moléculaire est comprise entre 18 000 et 20 000 daltons. Par homologie de séquence 2 groupes ont été définis (I : β_1 , β_2 ; II : β_3 , β_4). Les associations α - β ne sont pas aléatoires. Ainsi sont rencontrées les associations α_{1a} - β_2 , α_{1b} - β_{1b} , α_2 - β_{1a} , α_3 - β_4 , F2(2)- β_3 , α_5 - β_3 . Les structures primaires de certaines de ces sous-unités sont connues (figure 23). Ainsi le complexe α_2 - β_1 a un pont disulfure entre les résidus cystine n° 86 de α_2 et n° 87 de β_{1a} . La structure quaternaire de la glycinine correspond à l'association de 6 sous-unités α - β selon le schéma ci-dessous (figure 22).

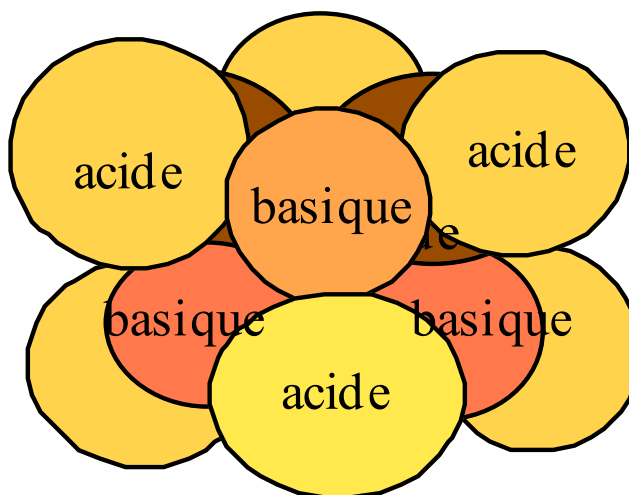


Figure 22. Structure quaternaire de la glycinine de soja (acide, basique)

Sous-unité $\alpha 2$

1	10	20	30
leu arg glu gln ala gln gln asn glu cys gln ile gln lys leu asn ala leu lys pro asp asn arg ile glu ser glu gly gly phe			
40	50	60	
ile glu thr trp asn pro asn asn lys pro phe gln ser ala gly val ala leu ser arg cys thr leu asn arg asn ala leu arg arg pro			
70	80	90	
ser tyr thr asn gly pro gln glu ile tyr ile gln gln gly asn gly ile phe gly met ile phe pro asp cys pro ser thr tyr gln glu			
100	110	120	
pro gln glu ser gln gln cys gly arg ser gln arg pro gln asp arg his gln lys val his arg phe arg glu gly asp leu ile ala val			
130	140	150	
pro thr gly val ala trp trp met tyr asn asn glu asp thr pro val val ala val ser ile ile asp thr asn ser leu glu asn gln leu			
160	170	180	
asp gln met pro arg arg phe tyr leu ala gly asn gln glu gln glu phe leu lys tyr glu gln gln gln gly gly ser gln			
190	200	210	
ser gln lys gly lys gln gln glu glu glu asn glu gly ser asn ile leu ser gly phe ala pro glu phe leu lys glu ala phe gly val			
220	230	240	
asn met gln ile val arg asn leu gln gly glu asn glu glu glu asp ser gly ala ile val thr val lys gly gly leu arg val thr ala			
250	260	270	
pro ala met arg lys pro gln gln glu glu asp asp asp asp glu glu glu gln pro gln cys val glu thr asp lys gly cys gln arg			
278			
gln ser lys			

Sous-unité $\beta 1A$

1	10	20	30
gly ile asp glu thr ile cys thr met arg leu arg gln asn ile gly gln thr ser ser pro asp ile lys asn pro gln ala gly ser val thr			
40	50	60	
thr ala thr ser leu asp phe pro ala leu ser leu leu lys leu ser ala gln tyr gly ser leu arg lys asn ala met phe val pro his tyr			
70	80	90	
thr leu asn ala asn ser ile ile tyr ala leu asn gly arg ala leu val gln val val asn cys asn gly glu arg val phe asp gly glu			
100	110	120	
leu gln glu gly asp val leu ile val pro gln asn phe ala val ala ala arg ser gln ser asp asn phe glu tyr val ser phe lys thr			
130	140	150	
asn asp arg pro ser ile gly asn leu ala gly ala asn ser leu leu asn ala leu pro glu glu val ile gln his thr phe asn leu lys			
160	170	180	
ser gln gln ala arg gln ile lys asn asn asn pro phe ser phe leu val pro pro gln glu ser gln			

figure 23. Structure primaire de 2 sous-unités ($\alpha 2$ et $\beta 1A$) de la glycine (NIELSEN, 1984)

Cette protéine se dissocie à pH acide ou alcalin, à faible force ionique ($\mu = 0,01$), sous l'effet de la température, en présence d'urée ou de SDS ou encore d'un agent réducteur (β -mercaptoéthanol). La température de début de dénaturation est voisine de 85 °C, celle du pic de dénaturation voisine de 95°C (température très dépendante du pH). L'enthalpie de cette réaction de dénaturation thermique est voisine de 23,4 kJ.g⁻¹.

A force ionique voisine de 0,05, la structure est stabilisée par des interactions hydrophobes; les groupes polaires ionisés des chaînes latérales d'acides aminés forment des sels, ce qui minimise les interactions électrostatiques. A pH 7 et $\mu = 0,1$ la glycine forme des agrégats de 2 ou 3 molécules. L'étude du mécanisme de précipitation sous l'effet de la chaleur de cette glycine a fait l'objet de nombreux travaux.

Les interactions stabilisant l'association des six sous-unités α - β sont les plus faibles et sont les premières à disparaître sous l'effet de la température (figure 24).

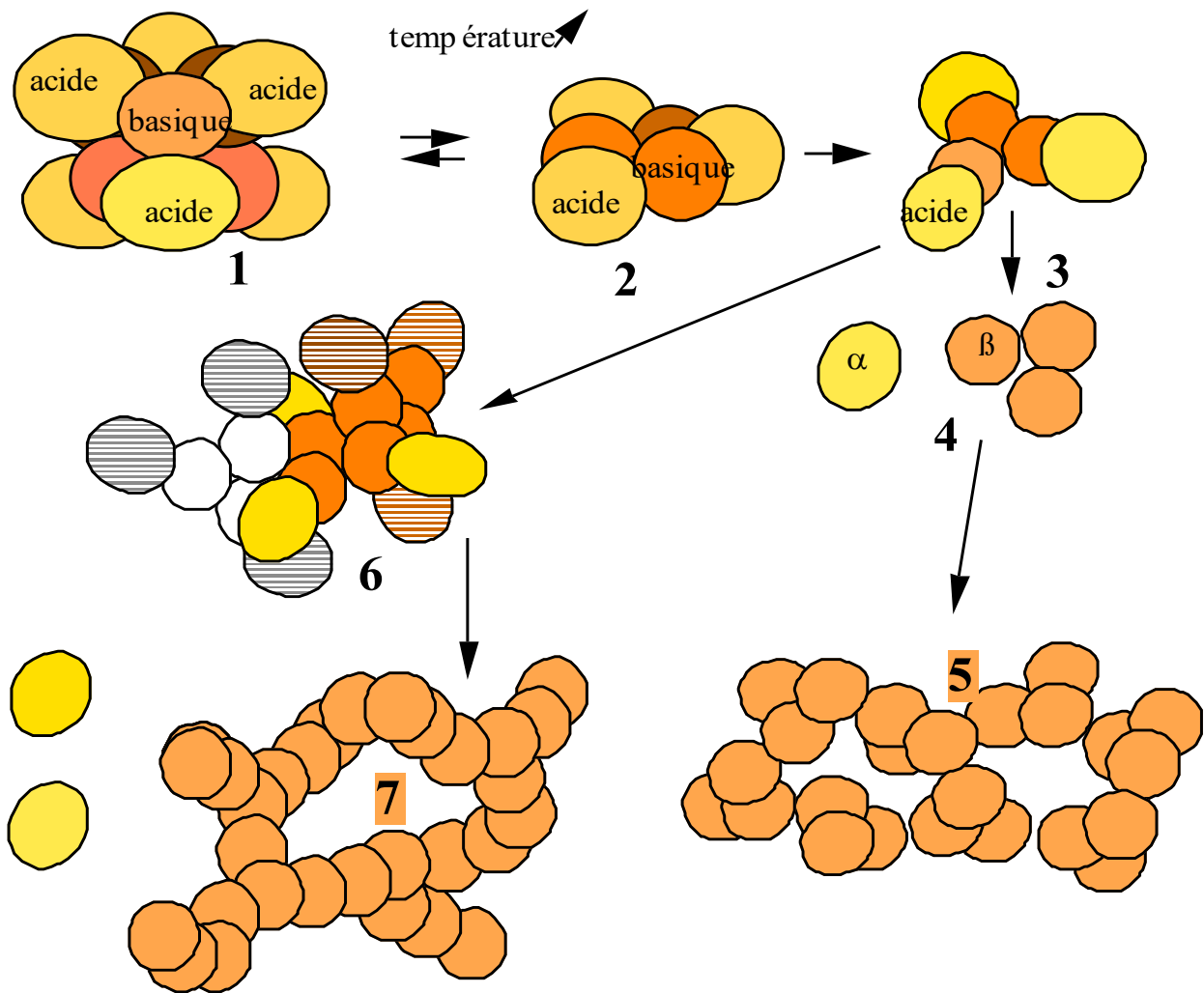


Figure 24. Evolution de la structure de glycinine (11 S) du soja au cours d'un traitement thermique à des pH voisins de la neutralité, à $\mu = 0,2$, à 100°C , pour des concentrations inférieures à 1%.

β sous unité basique

α sous unité acide.

On obtient alors des hexamères (2) dont les unités basiques peu chargées au voisinage de leur pH_i (~ 8) donnent alors entre elles des interactions hydrophobes, ces interactions augmentant d'intensité avec la température (figure 24, 3). Il se forme alors entre ces 3 unités basiques des ponts disulfure (figure 24, 3), l'hexamère restant encore soluble en raison de la présence des trois sous-unités acides chargées négativement. A ce stade il existe deux voies possibles.

Dans la première, les unités acides sont libérées et restent en solution tandis que les trimères basiques s'associent par interactions hydrophobes et précipitent (figure 24, 4 et 5).

Dans la seconde voie, les hexamères (3) s'associent avec formation de ponts disulfure au niveau des sous-unités basiques (figure 24, 6) ; il apparaît des polymères solubles dont la masse molaire dépasse plusieurs millions. A la libération des sous-unités acides par rupture des ponts disulfure les liant aux sous-unités basiques, il apparaît un polymère hydrophobe constitué de sous-unités basiques liées entre elles par des ponts disulfure. Si la concentration en glycine initiale est voisine de 5 à 10 %, un réseau gélifié se forme.

Enfin, il faut signaler que la glycine en solution relativement concentrée précipite au froid: **cryoprécipitation**.

Les légumineuses des autres légumineuses (fraction 11S) présentent également une structure dodécamérique.

Quelques unes de leurs propriétés sont indiquées dans le tableau 26. Les volumes spécifiques partiels de ces protéines sont compris entre 0,72 et 0,73 ml.g⁻¹.

Le coefficient de friction f / f_0 est compris entre 1,28 et 1,43.

Le rayon de Stokes est compris entre 5,6 et 7,1 nm et le rayon de giration entre 4 et 4,4 nm.

Tableau 26. Propriétés de quelques légumineuses

$S_{20,w}$ = coefficient de sédimentation D = coefficient de diffusion 10^{-7} (cm²s⁻¹) η = viscosité intrinsèque dl.g⁻¹

Source	Masse moléculaire kD	sous-unités kD	α hélice %	feuillets β %	pelote	pHi moyenne	hydrophobicité kcal/résidu	$S_{20,w}$	D	η
Légumine (fève)	320	21,6 37	-	-	-	4,9 - 5,4	0,96	12,9	3,39	0,051
Glycinine (soja)	363	22,3 37 45	9	33	58	4,6	0,94	12,2	3,48	0,057
Arachine (arachide)	330	23,6 43,1	15	27	58	4,8	0,95			
Légumine (pois)	395		16	41	-	4,8 - 5	0,93	12,7	2,99	0,06
Conglutine α (lupin)	315							12,3	3,8	
cruciférine (colza)	300		11	31				12,7	3,8	
hélianthine (tournesol)	305		10	29				11,8	3,78	

Il est bon de signaler ici qu'il existe des homologies de séquences entre espèces et qu'il peut se former des dodécamères hybrides. Ces structures quaternaires condensées ont pour finalité d'assurer, en un minimum de volume, le maximum de réserve pour la graine.

b) Les globulines 7S

Il s'agit d'un second groupe majeur des globulines. Leur nomenclature est fonction de leur origine (Tableau 27). Il s'agit de glycoprotéines dont le poids moléculaire est voisin de 150000. Il s'agit de molécules polymériques (trimériques en général) dont les sous-unités ont des poids moléculaires variables. Il n'existe pas de ponts disulfure entre sous-unités.

Tableau 27. Propriétés de quelques globulines 7S

Protéine	molécule	Poids moléculaire sous-unités	Constante de sédimentation (S)
α -conarachine	142 000	72 000	7,85
β -conglycinine (soja)	185 000	$\alpha\alpha'$ 68 000 β 48 000	7,2
	370 000		10,7
Acaline (coton)	113 000	P54 : 53 500	9,2
	180 000	P49 : 49 000	
		P46 : 46 000	
Phaséoline (haricot)	140 000	α = 53 000 β = 47 000 γ = 43 000	6,9
Viciline (pois)	170 000	50 000	

La **β -conglycinine** ou **fraction 7S** du soja peut représenter jusqu'à 35 % des protéines totales de la graine. Son taux de glycosylation (mannose et N-acétyl-glucosamine) est voisin de 5 %, la fixation intervenant sur l'asparagine. Elle est constituée de 3 sous-unités α , α' et β dont le pHi est inférieur à 5. Le monomère β ne contient pas de résidus de cystéine.

Le comportement de cette protéine en fonction du pH et de la force ionique est schématisé sur la figure 25.

A pH neutre, la β -conglycinine est sous forme de trimère 7 S si la force ionique est supérieure ou égale à 0,5. Si la force ionique est inférieure à 0,2 un hexamère 9,8 S se forme. A des μ intermédiaires, il existe un équilibre entre ces deux formes. L'hexamère 9,8 S est stable, à $\mu \leq 0,2$, entre pH 5 et 11, mais précipite au pHi (4,8).

L'augmentation de μ réduit cette précipitation et le trimère est stable, à $\mu > 0,2$, et soluble jusqu'à pH 1. Si μ diminue à des pH < 3 le trimère se dissocie.

A pH alcalin il se produit une dissociation de l'hexamère et du trimère quelque soit la force ionique. Les α et γ conglycinines représentent de 1 à 3 % des protéines totales.

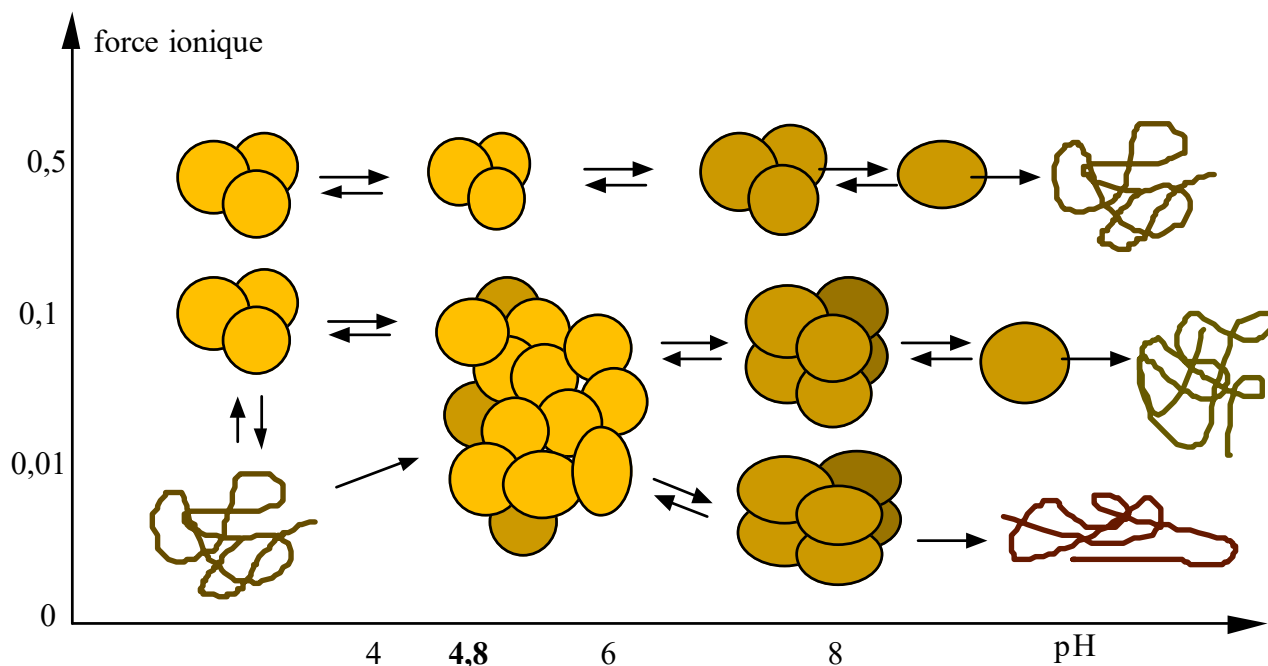


Figure 25. Structure évolutive de la β conglycinine en fonction du pH et de la force ionique

On rencontre 4 hémagglutinines (lectine), 2 lipoxygénases et une β amylase dont les séquences sont connues. Les hémagglutinines contribuent à la fixation du *Rhizobium* par les légumineuses.

X.6.5. Glutélines

Il s'agit de lipoprotéines insolubles dans l'eau de masse molaire élevée qui possèdent de remarquables propriétés d'élasticité. Leur teneur en glutamine est très élevée, tandis que celle en lysine est très faible. Il existe de nombreux résidus de cystine et quelques résidus cystéine.

Leur solubilisation (partielle) dans l'acide acétique conduit à la séparation de sous-unités dont les poids moléculaires sont souvent supérieurs à 200 000. Après réduction des ponts disulfure, de nombreuses sous-unités sont caractérisables et classées en 3 principaux types (A, B, C pour le blé). Les poids moléculaires des monomères protéiques isolés par électrophorèse varient d'environ 20 000 et 140 000.

X.6.6. Distribution de quelques classes de protéines dans les graines de légumineuses

La distribution des teneurs en albumine, globuline et glutéline de quelques graines de légumineuses est indiquée dans le tableau 28.

Tableau 23. Distribution des protéines dans les légumineuses (g % g)

	albumine	globuline	glutéline	viciline/légumine
soja	10	90	0	1,6
tournesol	22	56	17	
pois	21	66	12	0,5
haricot, lupin	10-20	80-90	0	1,3
fève	20	60	15	0,5

X.6.7. Les principales protéines du soja

Par ultracentrifugation, 4 fractions sont obtenues (2, 7, 11 et 15S). Leurs caractéristiques sont indiquées dans le tableau 29.

Tableau 29. Principales protéines du soja

	Fraction							
	2S		7S				11S	15S
% de protéines	15		35				40	10
nature des protéines	inhibi- -teurs trypsiques	cytochro- -me C	β -amylase	lipoxygé- -nase	lectines	β -congly- -cinine	glycinine	protéines 11S associées
poids moléculaire	7860 21500	12000	62000	102000	110000	140000 185000	320000 363000	600000

La β -conglycinine représente plus de 50 % de la fraction 7 S. L'urée de masse moléculaire voisine de 480 000 daltons représente de 0,2 à 0,3 % des protéines totales.

L'inhibiteur tryptique de **KUNITZ** est une globuline sphérique de 181 acides aminés qui contient 2-S-S-. Son centre actif est composé d'une douzaine d'acides aminés et c'est au niveau de la liaison ARG⁶³-ILE⁶⁴ que se produit la liaison avec la trypsine.

L'inhibiteur de **BOWMAN-BIRK** est constitué de 71 acides aminés (PM 7860) et possède 7 S-S- qui confère à la molécule une très grande stabilité à la chaleur et à l'hydrolyse. Les sites actifs sont constitués par les résidus LYS¹⁶ - SER¹⁷ (trypsine) et LEU⁴³ - SER⁴⁴ (chymotrypsine).

Ces inhibiteurs de protéases peuvent être inactivés par la chaleur.

Les lipoxigénases du soja ne contiennent pas de fer héminique et catalysent l'hydro-péroxydation des lipides polyinsaturés qui contiennent des séquences cis,cis-1,4-pentadiène. L'oxygène moléculaire est un substrat et les produits primaires de la réaction sont des hydroperoxydes cis, trans-conjugués. Ces produits sont à l'origine de l'odeur caractéristique du soja et de ses dérivés.

Il existe des iso-lipoxigénases dont la masse moléculaire est voisine de 100 000 daltons.

La composition en acides aminés des glycinine et β -conglycinine du soja sont indiquées dans le tableau 30.

Tableau 30. Composition en acides aminés (%) de la β -conglycinine et de la glycine du soja

	β-conglycinine				glycine				
		sous-unités					sous-unités		
		α	α'	β		α1a	α2	β1a	β4
ASX	14,1	12,6	11,8	14,1	11,8	10,8	12,4	14,6	11,8
THR	2,8	2,1	2,7	2,8	4,2	3,5	3,6	4,6	3,1
SER	6,8	6,9	7	7,6	6,6	5,4	4,8	7,7	7,1
GLX	20,5	23,5	23,4	18,1	18,8	25,1	25,4	12,9	12
PRO	4,3	6,4	7,1	4,7	6,3	7,1	6,3	6	5,2
GLY	2,8	4,8	5,6	5,2	7,8	9,1	8,8	6,3	9,2
ALA	3,7	4,5	4	5,7	6,7	4,2	5,3	8,9	6,4
VAL	5,1	3,4	3,4	4,1	5,6	3,5	4,5	6,5	11
MET	0,2	0,4	0,6	0	1	1	1,7	1,3	0,7
ILE	6,4	4,5	3,7	4,4	4,6	5,2	4,5	5,3	4,2
LEU	10,2	8,3	7	9,6	7,2	5,9	5,9	10,2	10,3
TYR	3,6	1,5	2,1	2,6	2,5	2,1	1,9	1,6	4,8
PHE	7,4	5	4,7	6,1	3,9	3,6	3,6	4,9	3,3
HIS	1,7	1,1	3,6	1,8	1,8	1,8	0,8	1,2	2,4
LYS	7	6	7	5,8	4,1	6,2	4,4	3,4	3,7
ARG	8,8	8	6,9	7,2	5,9	5,3	6,7	5,1	7,1
CYS	0,3	0,4	0,2	0	1,1	1,3	1,3	1	0,9
TRP	0,3								

X.6.8. Interactions glycine / β - conglycinine

Les deux protéines majeures du soja sont la glycine et la β -conglycinine. Au cours des traitements technologiques (μ , pH, chaleur) des interactions se produisent entre ces deux molécules.

En solution diluée (inférieure à 1 %), à pH 8, à faible force ionique à 80°C et en présence de β mercaptoéthanol (10 mM) la glycine est dissociée en unités basiques et acides respectivement chargées positivement et négativement tandis que la β -conglycinine est dissociée en monomères chargés négativement. Il se forme alors un complexe soluble entre la β -conglycinine et les sous-unités basiques de la glycine (figure 26).

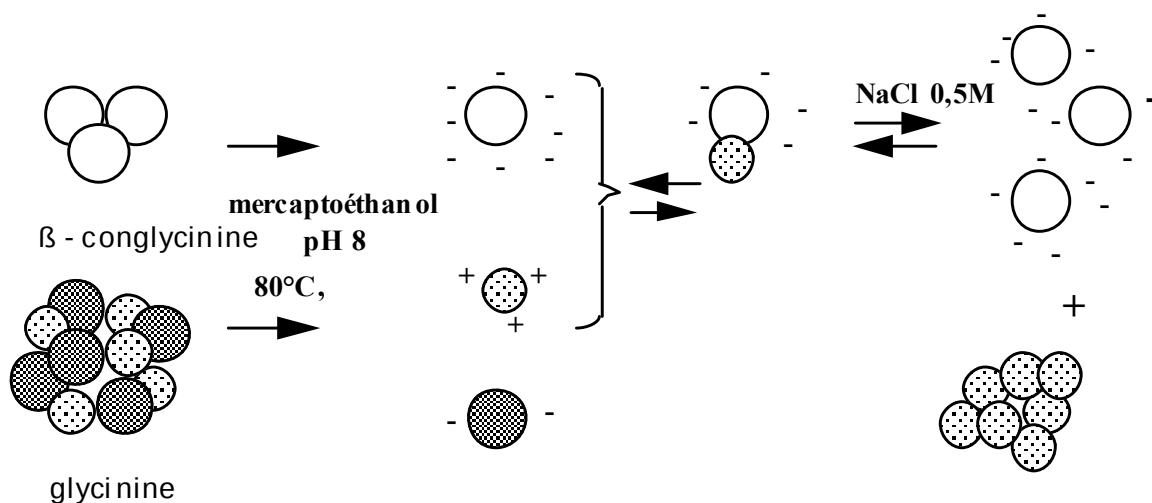


Figure 26. Interactions des protéines du soja à 80°C.

L'addition de chlorure de sodium (0,5 M) conduit à la dissociation du complexe et les sous-unités basiques précipitent par formation de liaisons hydrophobes.

A pH 7 et en absence de réducteur, les protéines de soja en solution à 1% chauffées à 95°C s'aggrègent. Cette réaction est optimale entre pH 4 et 6 et à force ionique faible (NaCl 0 à 0,2 M). Cette réaction ne se produit pas avec des solutions protéiques diluées (0,1 %) à force ionique très faible.

Le **chauffage** de solutions protéiques concentrées (5 % au moins) à des pH voisins de 7 conduit à la formation d'un **gel**. A faible force ionique le déplissement des protéines (β -conglycinine essentiellement) intervient vers 70°C et à une température plus élevée si m est élevé ; la viscosité de la solution augmente alors. Au refroidissement il se forme un gel dont la rigidité et la fermeté diminuent avec l'intensité du chauffage. Ces gels perdent leur stabilité au cours de la stérilisation.

Cette gélification peut être induite par addition d'éthanol ou de glycol à la solution protéique mais aussi par alcalinisation suivie de neutralisation. L'alcool provoque un déplissement des molécules par démasquage de groupements hydrophobes. Plus l'alcool est hydrophobe et plus le déplissement et la fermeté du gel est élevée (pour des concentrations en protéines voisines de 10 %). Des concentrations élevées en alcool (< 40 %) conduisent à un coagulum sans gélification.

X.7. TECHNOLOGIES ACTUELLES DE VALORISATION

C'est par la mise au point de technologies adaptées que s'est accrue la disponibilité des protéines de légumineuses aussi bien en alimentation humaine qu'animale. Le principe de base de ces technologies consiste d'abord en un fractionnement plus ou moins poussé des divers composants des graines. Les fractions ainsi obtenues, et plus particulièrement la fraction protéique, sont ensuite consommées après restructuration ou après incorporation dans des produits alimentaires ou des plats cuisinés.

En ce qui concerne la terminologie des produits obtenus, la farine correspond à une mouture de la graine généralement dépelliculée et délipidée, le tourteau aux flocons délipidés, le concentrat protéique à un produit contenant entre 50 et 75% de protéines et l'isolat protéique à une préparation dont la teneur en protéines dépasse 90%. Les rendements de fractionnement sont généralement supérieurs à 80 % pour les protéines et dépassent 95 % dans le cas des huiles.

Les caractéristiques des matières premières conditionnent les choix technologiques de valorisation.

La composition relative de quelques graines est donnée sur la figure 27.

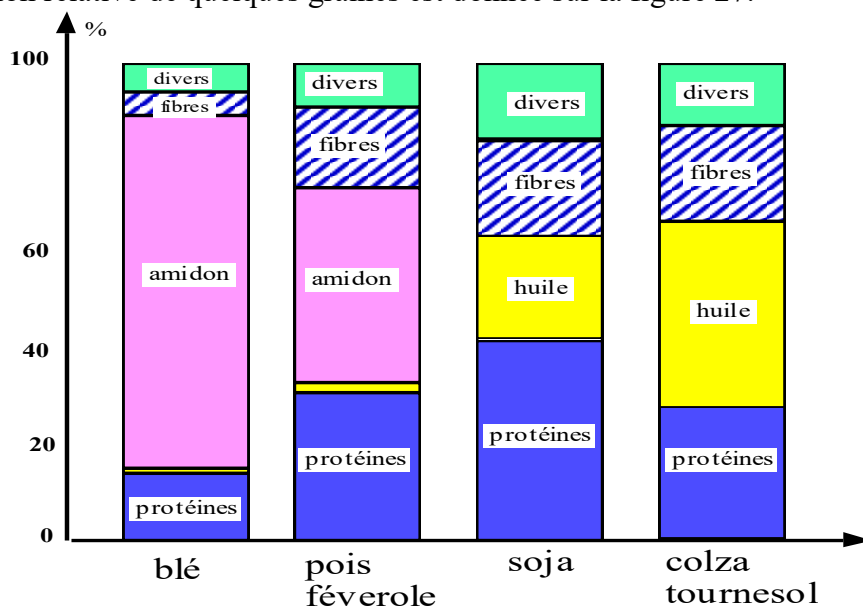


Figure 27. Composition relative de quelques graines.

X.7.1. Fractionnement des composants des graines de légumineuses

Bien que les technologies mises en jeu soient spécifiques pour chaque espèce de graine de légumineuse, il est possible de décrire d'une façon schématique les diverses opérations conduisant aux fractionnements des composants.

a) nettoyage et dépelliculage

Les enveloppes de ces graines sont riches en fibres indigestibles et sont généralement éliminées par des moyens mécaniques (abrasion et tamisage), quelques fois après une hydratation préalable de la graine pour faciliter la séparation, les cotylédons augmentant plus de volume que les enveloppes. Ces enveloppes sont utilisées pour l'alimentation des ruminants. Cette opération de dépelliculage n'est pas toujours nécessaire quand les produits sont destinés à subir un fractionnement plus poussé ou quand il s'agit de fabriquer des produits destinés à l'alimentation animale. Parfois, le dépelliculage est obligatoire quand la "coque" contient des composés susceptibles de se solubiliser et de réagir avec les protéines (acide chlorogénique du tournesol).

Le schéma du décortiquage nettoyage des graines est indiqué sur la figure 28.

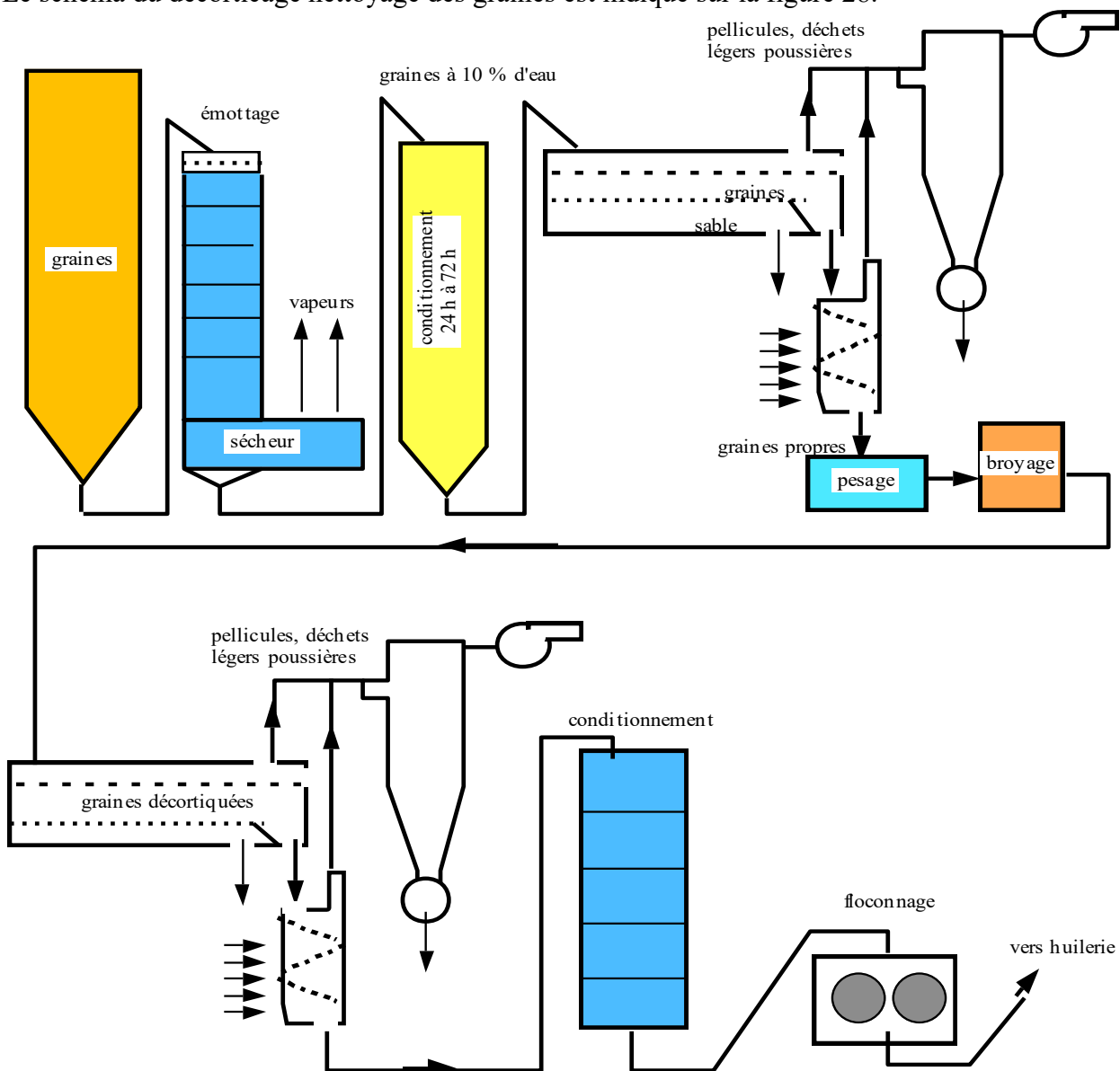


Figure 28. Nettoyage, décortiquage et floconnage des graines de soja.

b) Mise en flocons ou Broyage

Cette opération est réalisée au moyen de broyeurs ou de rouleaux et conduit à l'obtention des deux cotylédons qui sont fractionnés en quatre parties ("pellet " ou flocons). A cette étape, les flocons ont des dimensions voisines de quelques millimètres.

Les cotylédons et germes à faible teneur en fibres peuvent parfois être d'abord soumis à un chauffage (cylindre ou toasting : grillage) puis moulus : le produit obtenu est la farine entière (full fat).

Les technologies de fractionnement utilisables à ce niveau varient en fonction de la teneur en huile ou en amidon des graines.

c) Fractionnement par voie sèche ou turboséparation

Cette technologie est applicable aux farines finement broyées dans lesquelles il existe deux populations de particules différenciées par leur taille et leur densité (grains d'amidon qui constituent la fraction lourde et les fines particules riches en protéines qui constituent la fraction légère). Le fractionnement par voie sèche ou **turboséparation** s'applique dans de bonnes conditions aux graines riches en amidon (pois, fève) tandis que le fractionnement par voie humide est réalisable sur toutes les graines de légumineuses.

La séparation est réalisée dans un flux d'air spiral et peut être répétée un certain nombre de fois pour augmenter son efficacité.

Ainsi, à partir d'une farine de pois dépelliculée on obtient des fractions dont la composition est indiquée dans le tableau 31. La fraction légère constitue un concentrat dont la teneur en protéines est voisine de 75 %. Cette technologie est difficilement applicable au lupin, au pois-chiche ou au soja en raison de leurs teneurs élevées en lipides.

Tableau 31. Composition des fractions lourdes et légères obtenues par turboséparation de farine de pois dépelliculés (% de la matière sèche)

composant	farine	fraction lourde	fraction légère
protéine (Nx6,25)	30	12	61
amidon	48	70	8
lipides	2	1	4
sucres	9	4	11
fibres	1,5	1	2
phytate	0,7	0,2	1,9
protéine (%)	32	13	69
amidon (%)	52	80	9

d) Fractionnement par voie humide.

Dans cette technologie, l'huile est d'abord extraite par solubilisation avec un solvant dans le cas des graines oléagineuses ou riches en lipides.

Pour obtenir des produits enrichis en protéines deux principales voies technologiques sont employées. Dans la première les protéines sont maintenues dans les flocons ou la farine et on réalise une extraction la plus poussée possible des autres composants. Dans la deuxième, les protéines sont d'abord solubilisées (le résidu insoluble étant éliminé) puis précipitées sélectivement, les autres composants solubles étant à leur tour éliminés. Dans le premier cas on obtient un concentrat et dans le deuxième un isolat.

1. Extraction de l'huile par solvants

Cette opération est réalisée sur les légumineuses riches en huile (oléagineux). L'extraction de l'huile des flocons s'effectue actuellement à température modérée et à contre courant au moyen de solvants apolaires (hexane) ; elle s'avère nécessaire pour fabriquer des isolats ou concentrats de bonne qualité. Après élimination de l'hexane par distillation, l'huile et d'autres composés (lécithines du soja) sont purifiés. Les flocons déshuilés sont désolvatés au moyen de désolvatiseurs à vapeur ou flash. Les flocons délipidés non chauffés peuvent être broyés ; le produit obtenu est la farine délipidée blanche qui est utilisée pour blanchir des farines grâce à son activité lipoxygénasique ou pour enrichir en protéines des aliments soumis à une cuisson préalable à leur consommation (incorporation au taux de 10-15 %, P/P). En effet, cette farine contient entre autres et à l'état natif les facteurs antinutritionnels de nature protéique.

2. Toastage, cuisson, texturation et/ou broyage des flocons

Dans le cas de certaines graines une cuisson des flocons est réalisée par toastage ou dans des échangeurs de chaleur chauffés à la vapeur ou par cuisson-extrusion. Cette opération inactive les facteurs antinutritionnels de nature protéique (inhibiteurs trypsiques, lectines, uréase). Le broyage des flocons chauffés conduit à l'obtention d'une farine délipidée toastée (ou chauffée) dans laquelle la teneur résiduelle en hexane est très faible (de l'ordre du ppm). Les flocons cuits - texturés sont quant à eux consommables directement après réhydratation (environ 75 g pour 125 ml d'eau tiède) et parfois aromatisation (citron, vinaigre, hydrolysate de viande, etc.). Après broyage ces flocons donnent une farine délipidée chauffée utilisable dans les produits carnés pour ses propriétés d'absorption et de rétention d'eau.

La production mondiale annuelle de ces divers types de farine, dépasse actuellement 2,5 millions de tonnes.

3. Fabrication de concentrats (figure 26)

Les flocons ou parfois la farine sont traités en milieu humide dans des conditions telles que les protéines qu'ils contiennent restent insolubles. Trois technologies conduisant à des concentrats aux propriétés différentes sont utilisées :

a) extraction en milieu alcoolique à 60 %. Dans ces conditions l'alcool dénature et insolubilise les protéines qui restent associées aux glucides insolubles (amidon, fibres). Dans la phase hydroalcoolique sont extraits avec des rendements variables les composés solubles (sucres, sels minéraux, acides aminés etc...). Après centrifugation, le concentrat est séché. Les protéines qu'il contient sont peu solubles, ont une bonne capacité de rétention d'eau (3,5 fois leur poids sec), n'ont pas de pouvoir émulsifiant et ont un goût neutre. Ce type de produit est utilisable en boulangerie et incorporable à des produits carnés.

b) extraction à pH voisin de 4,5. Dans ce cas, le pH choisi correspond au pHi des protéines. Après centrifugation et neutralisation, le concentrat est séché. Les protéines sont très solubles dans l'eau, ont un bon pouvoir émulsifiant et une bonne capacité de rétention d'eau. Ces produits sont utilisables dans des boissons ou comme agents liants.

c) extraction en milieu aqueux à chaud. Dans cette troisième technologie, les protéines sont dénaturées et insolubilisées par la chaleur. Les protéines présentes dans ces concentrats, légèrement jaunes et d'un goût agréable, sont peu solubles.

La composition de concentrats obtenus par ces trois méthodes à partir de graines de soja est indiquée dans le tableau 32.

Tableau 32. Composition de concentrats de soja obtenus par voie humide

composant	milieu d'extraction		
	alcool	acide	chaleur
protéines	66	65	67
eau	7	7	6
lipides	0,3	0,3	0,2
fibres	3,5	3,5	3,8
cendres	6	5	4
glucides insolubles	17,2	19,2	19

4. Fabrication d'isolats (figure 29)

La première étape de ce fractionnement réalisé à partir de la farine ou du tourteau délipidé consiste en une solubilisation optimale des protéines. Cette opération est réalisée en milieu aqueux à force ionique peu élevée et dont le pH est légèrement alcalin ($8 < \text{pH} < 12$). Dans ces conditions plus de 90 % des protéines totales sont solubilisées.

Une filtration ou une centrifugation permet d'éliminer des composés insolubles (fibres, amidons).

La récupération des protéines contenues dans le filtrat ou le surnageant peut être obtenue par 4 méthodes :

- précipitation au pHi (en général autour de 4,5)
- coagulation thermique (100°C)
- précipitation par des cations ou des copolymères
- ultrafiltration (dans ce cas les protéines restent retenues par la membrane).

Après une nouvelle filtration ou une nouvelle centrifugation, les protéines récupérées dans le rétentat ou le culot sont lavées puis séchées, le plus souvent par atomisation. Le produit obtenu qualifié d'**isolat** a une teneur en protéines qui dépasse 90 %. Le rendement de la précipitation est fonction de la nature des protéines et varie entre 70 et 85 %. Le rendement global de récupération des protéines initialement présentes dans la farine varient d'environ 65 % (lupin, haricot) à environ 80 % (soja, fève, pois).

Ces procédés de fractionnement par voie humide éliminent la plupart des facteurs antinutritionnels ou toxiques de faible masse molaire (facteurs de flatulence, aflatoxines, phytate) mais concentrent les facteurs antinutritionnels de nature protéique (inhibiteurs des protéases, lectines).

Si la farine n'a pas subi de traitement thermique permettant l'inactivation de ces molécules, il est nécessaire de la pratiquer sur l'isolat ou le concentrat. Dans ce cas, il vaut mieux le réaliser après fabrication du produit ou incorporation. De la sorte, les propriétés fonctionnelles des autres protéines ne sont pas préalablement altérées (solubilité, capacité de rétention d'eau, pouvoir gélifiant etc.).

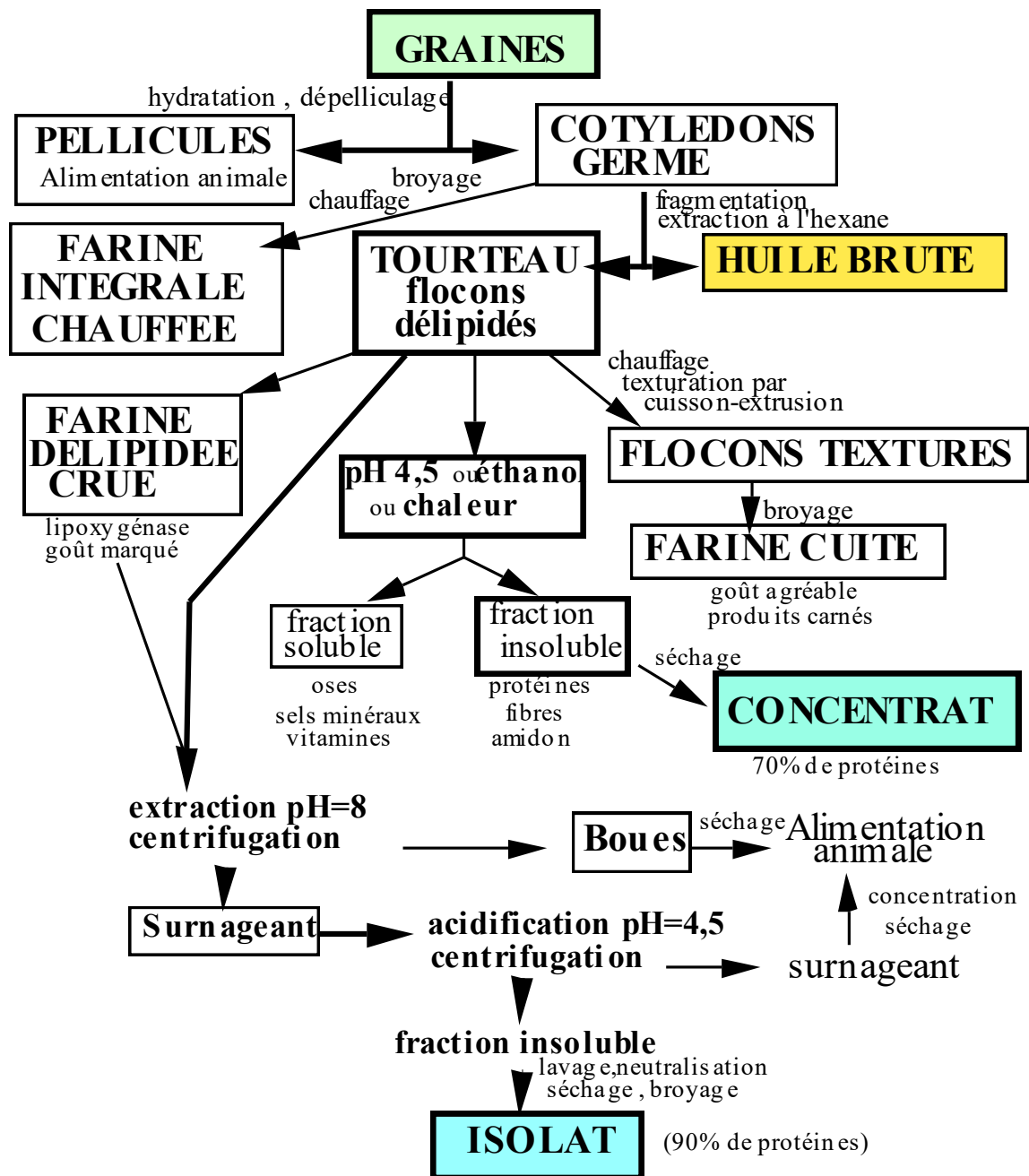


Figure 29. Schéma de fabrication d'isolat et de concentrat à partir de graines de soja

S'il est techniquement possible d'obtenir des farines, concentrats et isolats protéiques à partir de la plupart des graines de légumineuses, ce sont, pour des raisons économiques, les graines de soja qui représentent la plus importante source de tels produits.

e) Méthodes microbiologiques ou chimiomicrobiologiques

Dans ces technologies, des microorganismes sont utilisés pour cataboliser des composés toxiques ou antinutritionnels qui sont solubilisés à partir du tourteau (ou de la farine) en même temps que les protéines (cf VII.6.3). A partir de l'azote non protéique il y a synthèse de protéines microbiennes (figure 30).

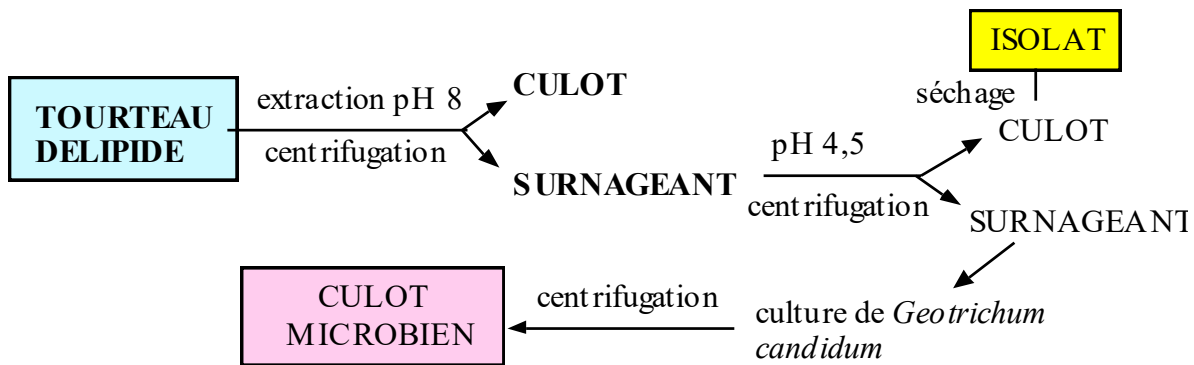


Figure 30. Méthodes chimio-microbiologiques de préparation de produits enrichis en protéines à partir de graines.

X.7.2. Optimisation de la fabrication d'isolats

Dans la fabrication d'isolats par voie humide deux étapes sont déterminantes en ce qui concerne le rendement final : il s'agit de la **solubilisation** et de la **précipitation** ultérieure des protéines. Les paramètres de cette solubilisation étant nombreux (microstructure, taille des particules, concentration, pH, force ionique, température, temps, etc.) l'optimisation de la fabrication devra passer par une approche statistique rationnelle comme un **plan d'expérience** afin de limiter le nombre d'essais d'études interactives.

L'extraction étant réalisée en milieu aqueux, le rappel des propriétés de l'eau puis des interactions intervenant entre les protéines et l'eau est indispensable pour procéder à une optimisation de l'extractibilité puis de la précipitation de ces macromolécules.

XI - SOLUBILISATION ET PRECIPITATION DES PROTEINES

XI.1. GENERALITES

L'optimisation de l'extraction des protéines présentes dans une matière première comme les graines requiert l'optimisation d'abord de leur solubilisation puis de leur "récupération", ces deux phénomènes mettant évidemment en jeu deux composants (les protéines qui sont le **soluté** et le **solvant** le plus souvent constitué par de l'eau additionnée ou non de substances diverses) dont il convient de bien connaître les propriétés interactives.

Dans la graine, la localisation et le niveau d'hydratation des protéines varient avec leur nature ; par rapport à leur teneur pondérale totale un pourcentage important de ces composants est localisé dans des cellules des cotylédons au niveau d'organites appelés **corps protéiques**. La fragmentation de la graine (concassage, broyage) conduit à des particules contenant de nombreuses cellules. Après délipidation éventuelle, la solubilisation des protéines, correspondant à une **extraction liquide / solide** peut être étudiée selon un **modèle diffusionnel**.

Comparées à d'autres molécules présentes dans des structures végétales (ou animales) comme les lipides ou le saccharose qui sont relativement faciles à extraire et à purifier, les macromolécules protéiques sont beaucoup plus complexes. Par ailleurs, il existe une grande hétérogénéité de structures et de propriétés dans cette fraction protéique qui est liée à la fonction même de ces molécules. Ainsi, avec ces **solutés macromoléculaires**, les interactions avec l'eau comme solvant sont multiples et passent généralement par des changements de conformation, donc de propriétés. Il

faut aussi signaler que l'environnement de ces protéines varie selon les graines, mais aussi selon l'état de maturité et de nombreux autres paramètres.

La solubilité des protéines en milieu aqueux est une des propriétés les plus importantes des protéines alimentaires ; elle conditionne entre autre l'extractibilité à partir d'une matière première, mais aussi, pour les protéines alimentaires, des propriétés fonctionnelles comme les pouvoirs moussant ou émulsifiant.

XI.1.1. L'extractibilité

Il s'agit d'un processus complexe impliquant :

- 1 - la mise en contact solvant / particule
- 2 - l'entrée du solvant dans la particule
- 3 - la redistribution du solvant dans les compartiments cellulaires et l'expansion de la matrice solide
- 4 - la solubilisation et/ou la destruction des composants (solutés ou non)
- 5 - le transport du soluté vers l'extérieur de la particule
- 6 - la migration du soluté extrait de la surface de la particule vers la phase solvante.

La vitesse de l'extraction est plus contrôlée par des processus internes à la particule que par des facteurs externes. Aussi, la microstructure et la structure des particules jouent-elles un rôle essentiel dans l'extractibilité.

Il est possible de décrire un modèle mathématique à une extraction en discontinu (batch) en ne considérant que deux phases à l'extraction :

- 1 - l'élimination instantanée des protéines de surface
- 2 - l'extraction dépendante du temps des protéines solubles intracellulaires. Dans ce cas l'extraction suit une cinétique d'ordre apparent égal à 1:

$$C_f - C_t = (C_f - C_s) \cdot e^{-k \cdot t}$$

dans laquelle

C_f est la concentration finale hypothétique maximale en protéine de l'extrait

C_t est la concentration en protéine dans l'extrait au temps t

C_s est la concentration en protéine au temps 0 (après le lavage initial par exemple)

t est le temps et k la constante de vitesse

Le calcul du **coefficient de diffusion** est obtenu par la seconde loi de Fick *appliquée à deux cas* :

- 1) *concentration superficielle constante et concentration initiale uniforme,*
- 2) *concentration superficielle variable et concentration initiale égale à 0 autour des protéines*

$$D \cdot A \frac{\delta C_i(r, t)}{\delta r} = \frac{d \{ C_f - (C_f - C_s) \cdot e^{-kt} \}}{dt}$$

dans laquelle r est le rayon de la sphère particulaire, D le coefficient de diffusion, A la surface accessible aux transferts de masse et C_i la concentration de la protéine dans la sphère.

XI.1.2. la solubilité

Il s'agit d'une propriété de composants (solutés) à former avec les molécules d'une phase dispersante (solvant) une phase dispersée homogène (solution).

Du point de vue **thermodynamique**, la solubilisation d'un composé correspond à une dissociation simultanée des molécules du solvant et de soluté puis à une "juxtaposition" des molécules de solutés dans le solvant avec une surface de contact maximale.

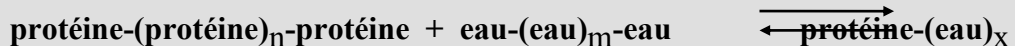
Pour se solubiliser (dispersion dans le solvant) une molécule doit donc donner des interactions avec les molécules de solvant (liaisons hydrogène, liaisons ioniques, liaisons dipôle-dipôle, interactions hydrophobes). S'il n'y a pas d'interaction (soluté hydrophobe dans solvant polaire par exemple) il ne se produira pas des réactions d'échange "positives" et soluté et solvant se sépareront en deux phases avec une vitesse régie par la loi de Stokes .

Si le solvant est polaire (eau) les interactions à établir avec le soluté seront du type polaire ionisé (liaison ionique) ou non ionisé (liaison hydrogène, liaison dipôle-dipôle). Ainsi, au cours du contact entre l'eau et un soluté cohésif du fait de liaisons polaires (figure 31) il va d'abord s'établir des liaisons polaires entre l'eau et le soluté. L'intensité des interactions polaires entre les molécules de soluté diminue ce qui contribue à la perte de cohésivité du soluté qui se disperse alors, entouré d'une "couche" de molécules de solvants, molécules capables de donner des interactions avec les autres molécules de solvant : c'est la **solubilisation**.

Il apparaît donc que plus une molécule sera polaire (ionique ou non), plus ses interactions avec un solvant polaire comme l'eau seront importantes, et plus sa solubilité sera grande.

Les substances apolaires (sans dissymétrie électrique) peuvent s'entourer d'un édifice pseudocristallin d'eau. En effet l'association de nombreuses molécules d'eau fournit un ensemble apolaire capable de réagir avec ce type de soluté (liaisons hydrophobes de type Van der Waals). Il ne s'agit plus d'une solution mais d'une dispersion dont la stabilité est régie par la loi de Stokes.

La solubilisation d'une protéine peut être schématisée par cet équilibre :



Il s'agit d'un système hétérogène ; si la "concentration" en eau augmente, l'équilibre est déplacé vers la droite; si la concentration en protéines augmente, l'équilibre sera déplacé vers la gauche.

Du point de vue **thermodynamique** la solubilisation, c'est à dire le passage du soluté dans la phase solvante à l'état dispersé s'accompagne d'une modification de l'énergie libre du système.

Dans un tel système en équilibre comportant 2 (ou plus) phases, les facteurs d'équilibre sont :

- 1) les conditions physiques dont le nombre est p (température et pression)
- 2) les constituants indépendants dont le nombre C est égal au nombre de constituants diminué du nombre de relations qu'ils ont entre eux ($C = n - r$).

A chacune des phases du système correspond une équation exprimant son équilibre par :

$$dG = 0 \text{ ou encore :}$$

$$\Delta H / T \cdot dT + V dp + m_1 dn_1 + m_2 dn_2 + \dots = 0$$

Il y a f relations pour le système total et pour que le système soit déterminé il faut disposer de :

$v = C - f + p$ équations ou fixer arbitrairement la valeur de v variables , v étant alors appelé variance du système ou nombre de degrés de liberté. Les conditions physiques se réduisant à 2, l'équation devient alors :

$$v = C - f + 2 \quad (\text{équation de Gibbs})$$

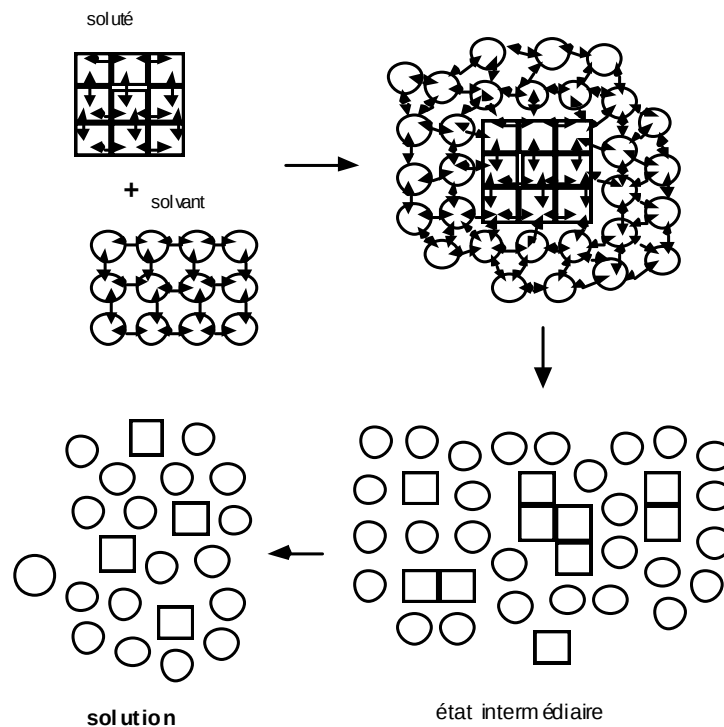


Figure 31. Schéma de solubilisation

Le **potentiel chimique** μ' est l'énergie libre molaire d'un composé en solution. A saturation, le potentiel chimique du composé en solution est identique à son potentiel chimique dans la phase insoluble μ'_s . S'il n'y a pas d'équilibre, $\mu' - \mu'_s$ déterminera le sens de l'évolution (<0 : la saturation n'est pas atteinte ; >0 : le soluté précipité ou cristallise).

En excès de soluté, le système est invariant ($\mu' = \mu'_s$) comme le prévoit la loi de Gibbs.

A température et pression constantes, le nombre de degrés de liberté devient égal à :

$$v = C - p$$

Ainsi un système binaire contenant un soluté dissous dans un liquide est uniquement défini par la composition du système ($v = 1$) alors qu'à saturation $v = 0$.

L'expression de la solubilité peut, dans un système binaire être exprimée en fonction du potentiel chimique par la relation :

$$\mu' = \mu'_s - RT \ln (M_s \cdot \gamma_s)$$

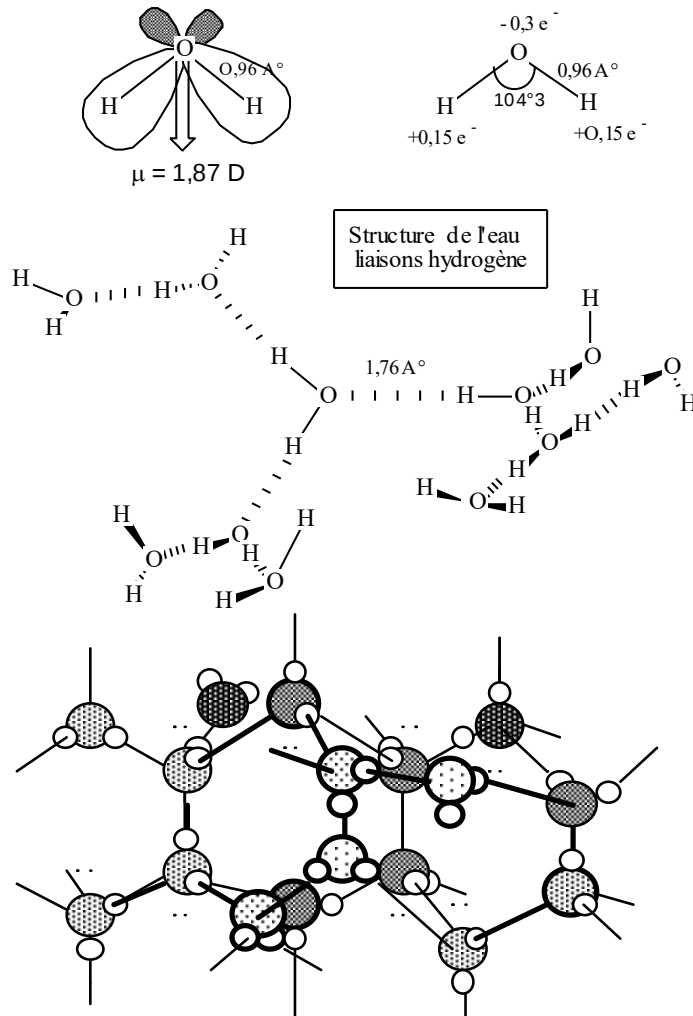
relation dans laquelle R est la constante des gaz parfaits, T la température absolue, γ_s le coefficient d'activité de S, **M_s la fraction molaire de S qui est souvent utilisée pour exprimer la solubilité en concentration molaire.**

Si la solubilité de "petites" molécules se définit parfaitement il n'en est pas de même avec des macromolécules telles que les polymères glucidiques ou les protéines dont les dimensions et l'état agrégatif varient énormément. Ainsi, en présence d'eau, une protéine peut se trouver en solution vraie (surface d'échange maximale avec le solvant), sous forme de molécules dispersées ou encore sous forme de suspension stable de molécules ou particules plus ou moins agrégées (associations de monomères dans certaines structures quaternaires).

Ces remarques montrent donc que la mesure de solubilité sera délicate et très dépendante de la méthode utilisée.

XI.2. PROPRIETES DE L'EAU

L'eau étant le milieu de synthèse des protéines « alimentaires » et le milieu généralement utilisé pour solubiliser les protéines, il est bon de rappeler ici quelques unes de ses propriétés. La structure de la molécule d'eau est schématisée ci-dessous :



Structure de la glace

L'électronégativité importante de l'oxygène dans la molécule et l'angle que forment les liaisons σ avec les atomes d'hydrogène se traduisent par l'existence d'un moment dipolaire permanent important. Ces molécules sont les types mêmes de molécules aptes à donner des liaisons hydrogène, liaisons linéaires entre un atome d'hydrogène lié de façon covalente à un atome électronégatif (O, N) possédant au moins un doublet électronique.

Dans la glace un réseau cristallin régulier, dans lequel chaque atome d'oxygène occupe le sommet d'un hexagone, est constitué, chaque molécule d'eau étant à même de donner deux liaisons hydrogène. En phase liquide il existe des associations de molécules d'eau par liaison hydrogène (O - -H -O) dont le nombre diminue avec la température.

La molécule d'eau étant dipolaire, il faut rappeler brièvement les propriétés des liaisons mettant en jeu de charges électriques.

La loi de Coulomb permet de déterminer la force qui s'exerce entre deux charges électriques, distantes de d et placées dans le vide :

$$f = \frac{q \cdot q'}{d^2}$$

Dans un milieu matériel cette force est diminuée si les molécules qui composent le milieu sont porteuses de charges électriques (même partielles). La loi s'écrit alors :

$$f = \frac{1}{D} \frac{q \cdot q'}{d^2}$$

avec D = constante diélectrique : $\epsilon\epsilon_0$

Les solvants qui possèdent une constante diélectrique élevée sont constitués par des molécules dipolaires - $\delta \rightarrow +\delta$. Si ces molécules sont placées dans un champ électrique ces dipôles s'orientent dans le sens du champ. Il y a neutralisation plus ou moins grande du champ, ce qui revient à dire que les forces qui s'exercent entre Q et Q' sont diminuées (figure 32).

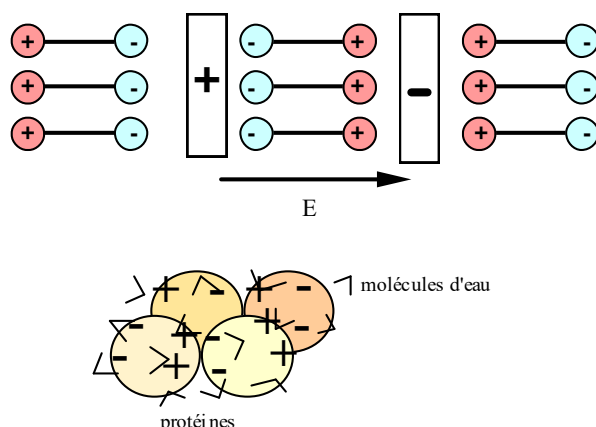


Figure 32. Comportement de molécules dipolaires dans un champ électrique

Dans un agrégat protéique, les charges locales superficielles s'attirent ou se repoussent avec une force au niveau de chaque zone définie par la loi de Coulomb. En présence de molécules dipolaires comme celles d'eau, il y a interaction entre ces zones chargées et le dipôle, ce qui diminue la charge impliquée dans la liaison interprotéique et donc facilite la dissociation.

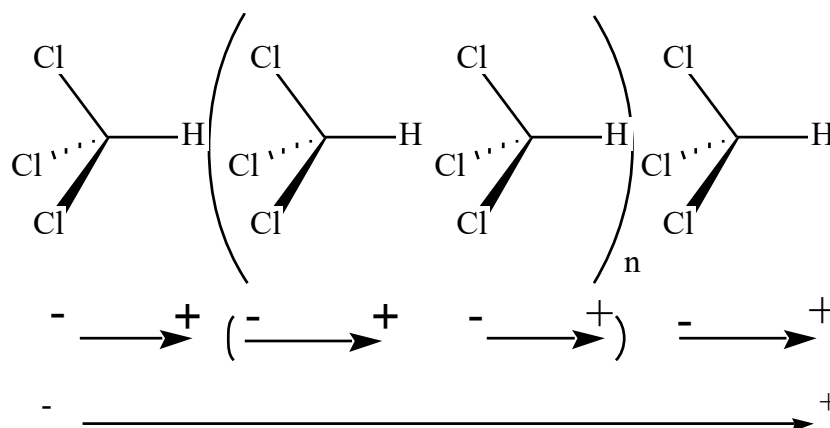
Il est donc clair que plus un milieu possèdera une constante diélectrique élevée plus son moment dipolaire ($M = ne \cdot d$) par unité de volume sera élevé et plus son effet sur la diminution de f sera grand.

Les valeurs de la constante diélectrique D pour quelques solvants sont indiquées dans le tableau 33.

Tableau 33. Constante diélectrique pour quelques liquides à 20°C

glycine 2,5 M	$D = 134$	toluène	$D = 2,3$
urée 6 M	$D = 130$	benzène	$D = 2,2$
acide sulfurique	$D = 84$	cyclohexane	$D = 2$
eau	$D = 81$	n-hexane	$D = 1,9$
acide formique	$D = 59$	chloroforme	$D = 5,1$
glycérol	$D = 56$	éthanol	$D = 26$
nitrobenzène	$D = 36$	acétone	$D = 22$
méthanol	$D = 34$	chlorobenzène	$D = 10$

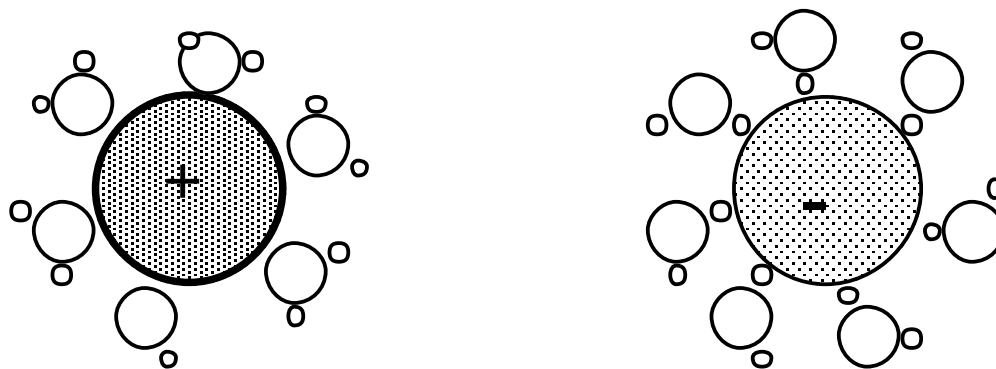
Dans ces valeurs, la molécule de chloroforme fait exception. Son D est faible alors que la molécule est très polaire. En réalité les charges partielles sont élevées et les molécules s'associent par liaison ionique. La molécule "polymère" résultante possède alors un moment dipolaire très faible.



Le chloroforme est alors considéré comme une "molécule" à polarité très faible (clathrates).

La **sphère de solvation** autour des cations est très rigide tandis que celle autour des anions possède plus de liberté. Ceci résulte de la forme de la molécule d'eau au niveau de laquelle la charge négative partielle est portée par 1 seul atome d'oxygène tandis que la charge positive partielle est portée par les deux atomes d'hydrogène. Il se crée un réseau pseudocristallin de grand volume autour des cations, les molécules d'eau autour des anions occupant un volume plus faible. Dans ces deux cas l'eau autour des ions occupe un volume inférieur à celui de ces mêmes molécules en solution : c'est le phénomène d'**électrostriction**.

Le nombre de moles d'eau fixées par groupement ionisé des chaînes latérales d'acides aminés est plus élevé pour les anions (groupements carboxyliques d'ASP et GLU) que pour les cations (LYS, ARG). Le nombre de moles d'eau fixées par mole de groupement est indiqué dans le tableau 36 .



XI.3. PROPRIETES DES PROTEINES (cf Cours Biochimie des Protéines STIA1)

Les protéines sont des polymères d'acides aminés liés entre eux par une liaison peptidique. Rappelons que la **structure primaire** ou séquence correspond à l'ordre d'enchaînement des acides aminés, que les **structures secondaires** sont les formes que prennent des parties de cette chaîne dans l'espace selon un axe principal, que la **structure tertiaire**, caractéristique unique à chaque protéine correspond à l'organisation spatiale de l'ensemble de la molécule et que la **structure quaternaire** résulte d'associations de molécules protéiques identiques ou différentes par des liaisons hydrogène, hydrophobe ou disulfure.

La liaison peptidique a une structure telle que les atomes **C, O, N et H** et les deux **C α** sont dans un même plan. Ceci provient d'un phénomène de résonance car la liaison C(O)-N possède un caractère partiel de double liaison (40%) et la liaison C=O de simple liaison (40%). L'oxygène et l'hydrogène de l'azote sont donc en position trans et la chaîne polypeptidique est une succession de plans rigides séparés par des C α -HR, les substituants de cet atome de carbone étant situés dans l'espace aux sommets d'un tétraèdre (figure 20).

Du fait de sa structure, la liaison peptidique est à même de donner des liaisons hydrogène avec d'autres liaisons peptidiques ou avec des molécules d'eau.

La libre rotation des "plans" autour des liaisons σ C-C(O) et C-N(H), schématisée par des angles ϕ et ψ , permet une infinité de conformations. Cependant, dans des conditions normales (physiologiques) de pH, force ionique, température etc. la plupart des protéines possèdent une conformation plus ou moins stable mais très spécifique et unique : **forme native**.

La seule variable dans cette structure est apportée par la chaîne latérale des résidus d'acides aminés. Le "volume" ou l'encombrement stérique de cette chaîne latérale associé à ses propriétés chimiques (présence de groupements polaires ionisables ou non, de groupements apolaires etc.) conditionne les angles ϕ et ψ , ce qui conduit à des structures secondaires puis tertiaires bien définies.

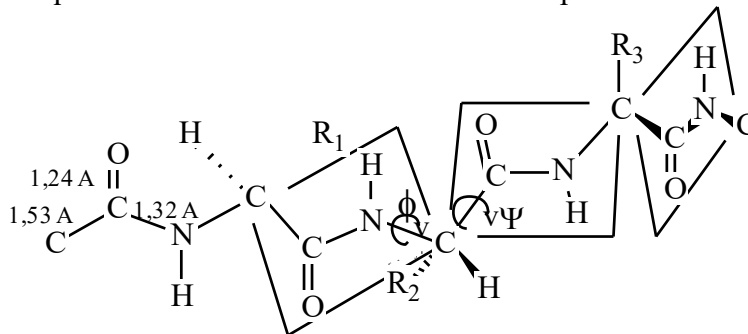


figure . Schéma de la liaison peptidique

Structures et principales propriétés des chaînes latérales des acides aminés sont données dans la figure 22.

S'il n'existe qu'une forme générale bien définie au niveau d'une protéine donnée, cela résulte des conditions de sa synthèse séquentielle. Il ne faut pas cependant perdre de vue que ce sont des modifications légères de configuration qui sont à l'origine de la plupart des propriétés des protéines (contractiles, enzymatiques, etc.) et que ce sont des modifications plus ou moins importantes de cette structure (**dynamique des protéines**) qui conditionnent beaucoup des propriétés de nos protéines alimentaires (texturation, tendreté, émulsification, formation de mousse etc.).

In vivo, cette synthèse commence par l'acide aminé N-terminal, le "sens" de biosynthèse de ces polypeptides étant donc $\text{>CO} \rightarrow \text{NH}$ - au niveau des ribosomes. Sur un plan conceptuel cette biosynthèse peut se schématiser de la façon suivante (figure 33). Les protéines **chaperonnes** contribuent à la synthèse unique des ces structures complexes.

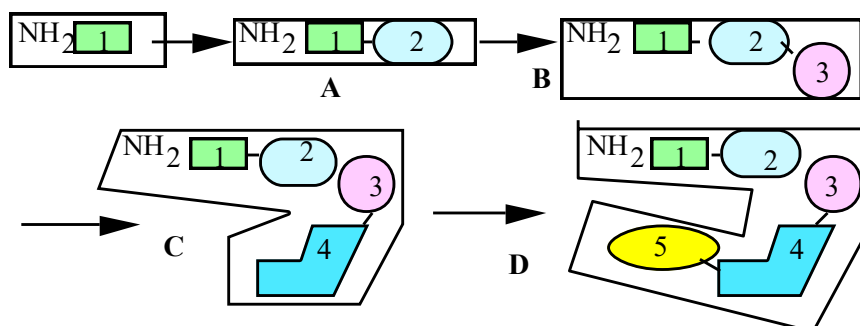


figure 33. Schéma de la synthèse séquentielle "structurée" d'une protéine

Dans ce schéma le premier acide aminé impliqué dans la synthèse (N terminal) s'associe à l'acide aminé n° 2 et la conformation du dipeptide dépend des propriétés des chaînes latérales de 1 et 2. Quand le troisième acide aminé s'associe au dipeptide, la position de sa chaîne latérale dépendra beaucoup du n°2 mais aussi du dipeptide 1-2 dans son ensemble et ainsi de suite.

Quand le nombre d'acides aminés engagés est élevé (polypeptide), la rotation permise au niveau des $C\alpha$ peut alors laisser des interactions se produire entre chaînes latérales éloignées. Sur un plan thermodynamique, c'est le système le plus stable en milieu aqueux aux température, pH et force ionique du milieu de la synthèse qui correspondra alors à la forme native.

XI.3.1. Principales structures spatiales protéiques (cf Biochimie des Protéines STIA1)

a) Structures secondaires

Il s'agit de structures rencontrées avec des fréquences très variables dans la plupart des protéines. Schématiquement il s'agit de structures organisées selon un axe principal.

L'**hélice α** est une structure stable qui possède 3,6 résidus par tour, les chaînes latérales se placent à l'extérieur de l'hélice (figure 34). De nombreuses liaisons hydrogène existent entre les H de la fonction NH et l'O de la fonction $C=O$ de la liaison peptidique. Les dipôles de la liaison peptidiques sont orientés dans le même sens ce qui contribue également à la stabilisation de cette structure. De par sa "densité", l'hélice α n'engendre pas de liaisons avec d'autres molécules (eau par exemple) et donc sa solubilité dans l'eau est faible. C'est cette structure qui est dominante dans de nombreuses protéines de structure plus ou moins fibreuse. Par contre, sa déstabilisation par chauffage, induisant le "débobinage", conduit à des polypeptides généralement solubles. L'hélice α a un moment dipolaire.

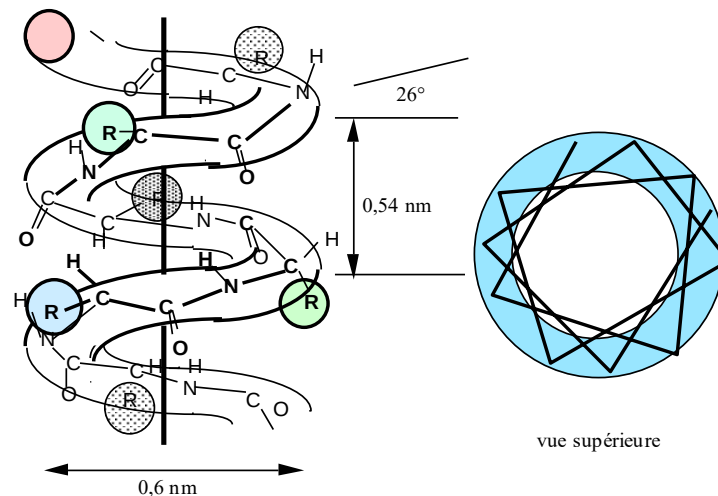


Figure 34. L'hélice α .

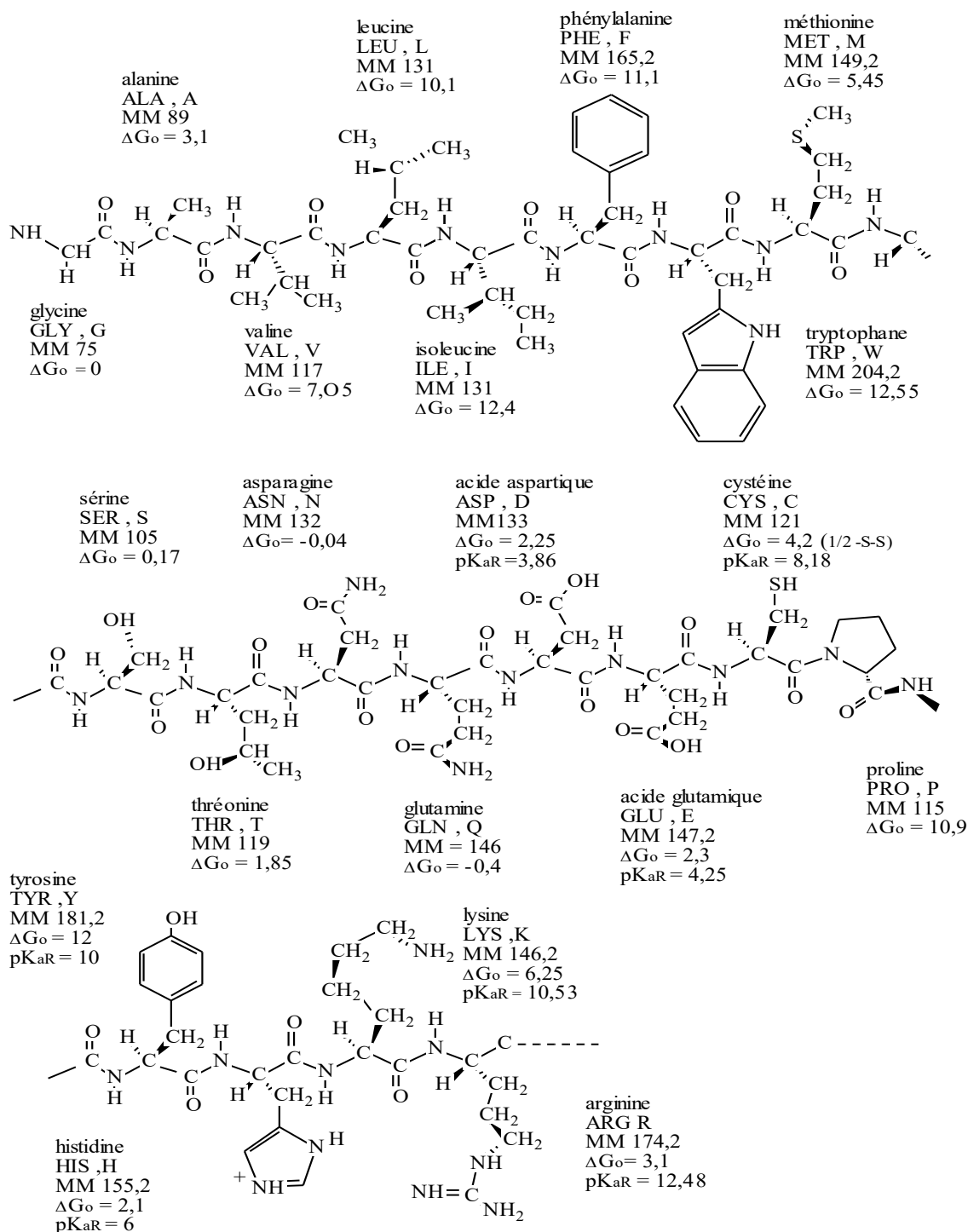
La **proline**, en raison de sa structure pyrrolinique, ne s'intègre pas dans cette hélice ce qui rend sa formation impossible. Il en est de même avec des acides aminés dont les chaînes latérales possèdent une charge ou un volume incompatibles avec cette structure secondaire.

Ainsi la **polylysine** et le **polyacide glutamique** ne donnent une hélice α que pour des pH où le groupement ionisable de la chaîne latérale n'est pas chargé (pH > 11 pour la lysine et pH < 4 pour l'acide glutamique). Dans ces cas c'est la répulsion électrostatique des chaînes latérales qui rend impossible la formation de l'hélice α , la chaîne polypeptidique prenant une structure en pelote statistique pour laquelle les groupes chargés sont éloignés au maximum et l'énergie libre électrostatique répulsive minimale. Avec la polyisoleucine, c'est l'encombrement stérique de la chaîne latérale qui inhibe la formation de l'hélice.

Les acides aminés sont classables en fonction de leur aptitude à former ou à rompre l'hélice α (tableau 34).

Si on définit F_α comme la fréquence de participation de chaque acide aminé à la structure α ($F_\alpha = n_\alpha / n$ avec n nombre total de résidu et n_α nombre de résidus impliqués dans une structure α) et P_α comme le niveau relatif de participation d'un résidu à la structure α ($P_\alpha = F_\alpha / F'_\alpha$ avec $F'_\alpha =$ valeur moyenne de F_α , c'est-à-dire la somme des F_α divisée par le nombre de résidus différents, le plus souvent 20) on constate que lorsque :

- $P_\alpha = 1$, le résidu adopte la structure α avec la même fréquence que le résidu moyen de la chaîne
- $P_\alpha > 1$, le résidu a une forte tendance à adopter la conformation α
- $P_\alpha < 1$, sa tendance à participer à l'hélice est faible ou impossible. F_β , F_p , P_β et P_p peuvent être calculés de la même façon pour les régions en feuillets plissés et en pelote statistique.



Les **feuillets β** (feuillets plissés) correspondent à une structure en zig zag étirée. Souvent la destruction de liaisons hydrogène d'une hélice α par la chaleur en milieu aqueux conduit à la formation de feuillets. Les chaînes parallèles ou antiparallèles (2, 3 ou quelquefois 4) sont liées par des liaisons hydrogène (figure 35) qui peuvent être détruites par chauffage en milieu aqueux.

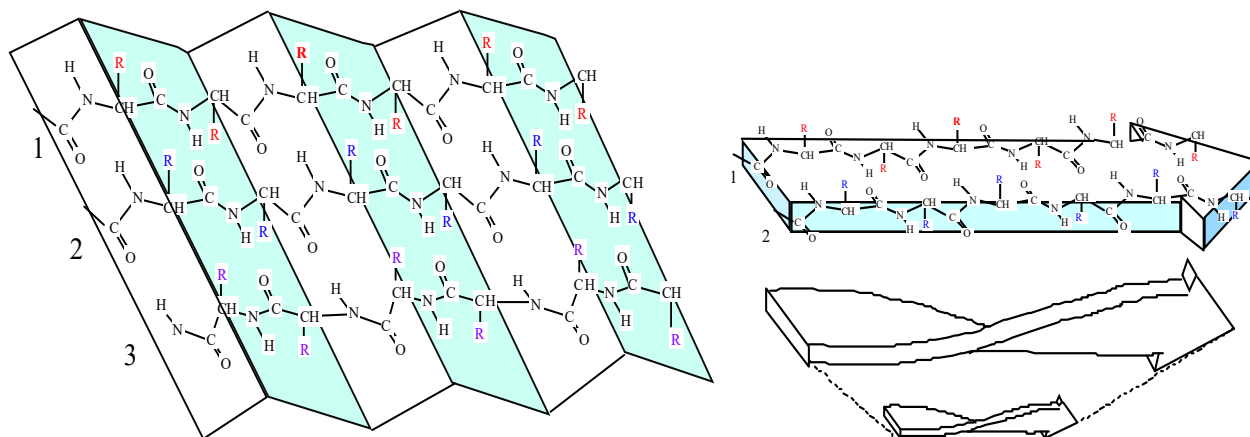


figure 35. Structure en feuillets plissés β parallèles et antiparallèles

Cette structure se retrouve par exemple avec des protéines fibreuses (fibroïne de la soie). Les feuillets β prédits également par Pauling ne sont pas plats mais vrillés.

Il existe une **conformation β** qui permet aux chaînes de se replier sur elles-mêmes, une liaison hydrogène assurant la stabilisation.

A côté de ces principales conformations, il existe d'autres structures secondaires telles que les hélices 3_{10} , M, α , polyproline I ou II. Dans le collagène c'est la structure polyproline II qui est dominante. Cette protéine du tissu conjonctif (peau, tendon, os) est la plus abondante chez les animaux. En milieu aqueux, sous l'action de la chaleur elle se transforme en gélatine.

Il existe dans la plupart des protéines des zones à structure non définie et sans axe de symétrie : **pelote statistique.**

acide aminé	Hélice α			feuillet plissé			pelote statistique	
	F α	P α		F β	P β		F p	P p
ALA	0,52	1,45	S	0,17	0,97	I	0,31	0,66
ARG	0,28	0,79	I	0,15	0,9	I	0,56	1,2
ASN	0,26	0,73	D	0,11	0,65	D	0,62	1,33
ASP	0,35	0,98	I	0,14	0,8	I	0,51	1,09
CYS	0,28	0,77	I	0,22	1,3	S	0,5	1,07
GLN	0,42	1,17	S	0,21	1,23	S	0,37	0,79
GLU	0,55	1,53	S	0,04	0,26	D	0,41	0,87
GLY	0,19	0,53	D	0,14	0,81	I	0,67	1,42
HIS	0,45	1,24	S	0,12	0,71	D	0,43	0,92
ILE	0,36	1	I	0,27	1,6	S	0,37	0,78
LEU	0,48	1,34	S	0,21	1,22	S	0,31	0,66
LYS	0,38	1,07	I	0,13	0,74	D	0,49	1,05
MET	0,43	1,2	S	0,29	1,67	S	0,29	0,61
PHE	0,4	1,12	S	0,22	1,28	S	0,38	0,81
PRO	0,21	0,59	D	0,11	0,62	D	0,68	1,45
SER	0,28	0,79	I	0,12	0,72	D	0,59	1,27
THR	0,3	0,82	I	0,21	1,2	S	0,49	1,05
TRP	0,41	1,14	S	0,2	1,19	S	0,39	0,82
TYR	0,22	0,61	D	0,22	1,29	S	0,56	1,19
VAL	0,41	1,14	S	0,28	1,65	S	0,31	0,66

Tableau 34. Acides aminés stabilisants (S), destructeurs (D) ou indifférents (I) de la structure secondaire des protéines. Selon CHOU et FASMAN, Biochemistry, 1974, 13, 211.

b) Structures tertiaires (cf cours Biochimie des Protéines STIA1)

La structure tertiaire qu'adopte une protéine présentant des zones à structures secondaires bien définies (hélice α , feuille β , courbures β) est fonction de son environnement (température, μ , solvant, pH). En milieu aqueux les résidus d'acides aminés hydrophobes sont pour la plupart d'entre eux localisés vers l'intérieur de la molécule tandis que les acides aminés polaires sont plus représentés en surface. Des distributions anisotropiques de charges ou de groupements polaires ou hydrophobes peuvent contribuer à conférer à la protéine une fonction donnée. Dans tous les cas, la conformation que prend la protéine est obtenue pour un niveau énergétique minimum.

Un ensemble d'éléments de structures secondaires constitue la région centrale (interne) hydrophobe stable et les boucles se regroupent à la surface des protéines. Les éléments des boucles, très souvent hydrophiles, n'établissent pas de liaisons hydrogène entre eux mais avec le solvant. Au cours de l'évolution, la partie internalisée des protéines a moins évolué que les boucles externes. Par exemple, les anticorps reconnaissent les antigènes au niveau de 6 boucles externes.

Les éléments de structure secondaire sont reliés en formant des motifs simples. On retrouve par exemple les profils « clé grecque », « $\beta - \alpha - \beta$ » dont deux brins β sont parallèles, etc. Les **domaines structuraux** sont de zones compactes dans lesquelles sont organisées dans l'espace des structures secondaires.

Actuellement il est possible de décrire des classes ou des types de structures tertiaires en fonction de la prédominance et de la distribution dans la molécule (ou même une zone structurée d'une partie de la molécule) de structures secondaires en hélice α ou en feuillet β (cf cours Biochimie des Protéines STIA1)

c) Structures quaternaires et structures supramoléculaires

Il s'agit d'une organisation spatiale d'assemblages de molécules protéiques par des liaisons ionique, hydrogène, hydrophobe ou par pont disulfure. Cet assemblage symétrique ou non est en général constitué par un nombre limité de sous-unités (**monomères**) identiques ou non. L'entité moléculaire, dont le poids moléculaire peut dépasser plusieurs millions, possède des propriétés souvent remarquables; chaque association a une structure souvent unique et contribue à la fonction biologique puis aux propriétés fonctionnelles de la protéine aliment.

Le **muscle (la viande)** est une structure composée de protéines fibreuses (figure 36) :

- en super hélice constituées de monomères en structure hélicoïdale (*tropocollagène de 300 nm de long et 1,5 nm de diamètre formé de 3 monomères en hélice α avec pas à droite*)
- associées à des protéines globulaires (*myosine constituée de deux monomères avec zones continues en hélice α et zone terminale en pelote statistique*)
- en double hélice constituées de monomères globulaires (*monomères de G actine associés en F actine dont deux chaînes en hélice forment un filament*).

Il existe des protéines globulaires souvent extrêmement complexes qui constituent la base de produit comme le lait ou les produits protéiques issus du soja. Il s'agit souvent de protéines globulaires constituées par l'assemblage de sous-unités de structures non fibreuses (*glycinine du soja - micelle de caséine - etc*).

d) Moyens d'études de ces structures (cf cours Biochimie des Protéines STIA 1)

Rappelons que la détermination de la structure primaire est réalisable après des hydrolyses enzymatiques ménagées ou des hydrolyses chimiques spécifiques (BrCN et met par exemple) suivies du dosage des acides aminés totaux et des parties N terminales (méthodes de Sanger ou d'Edman) ou C terminale.

Il existe de nombreux moyens d'étude des structures protéiques et de leurs modifications. Ils peuvent être classés en méthodes physiques, chimiques ou biologiques .

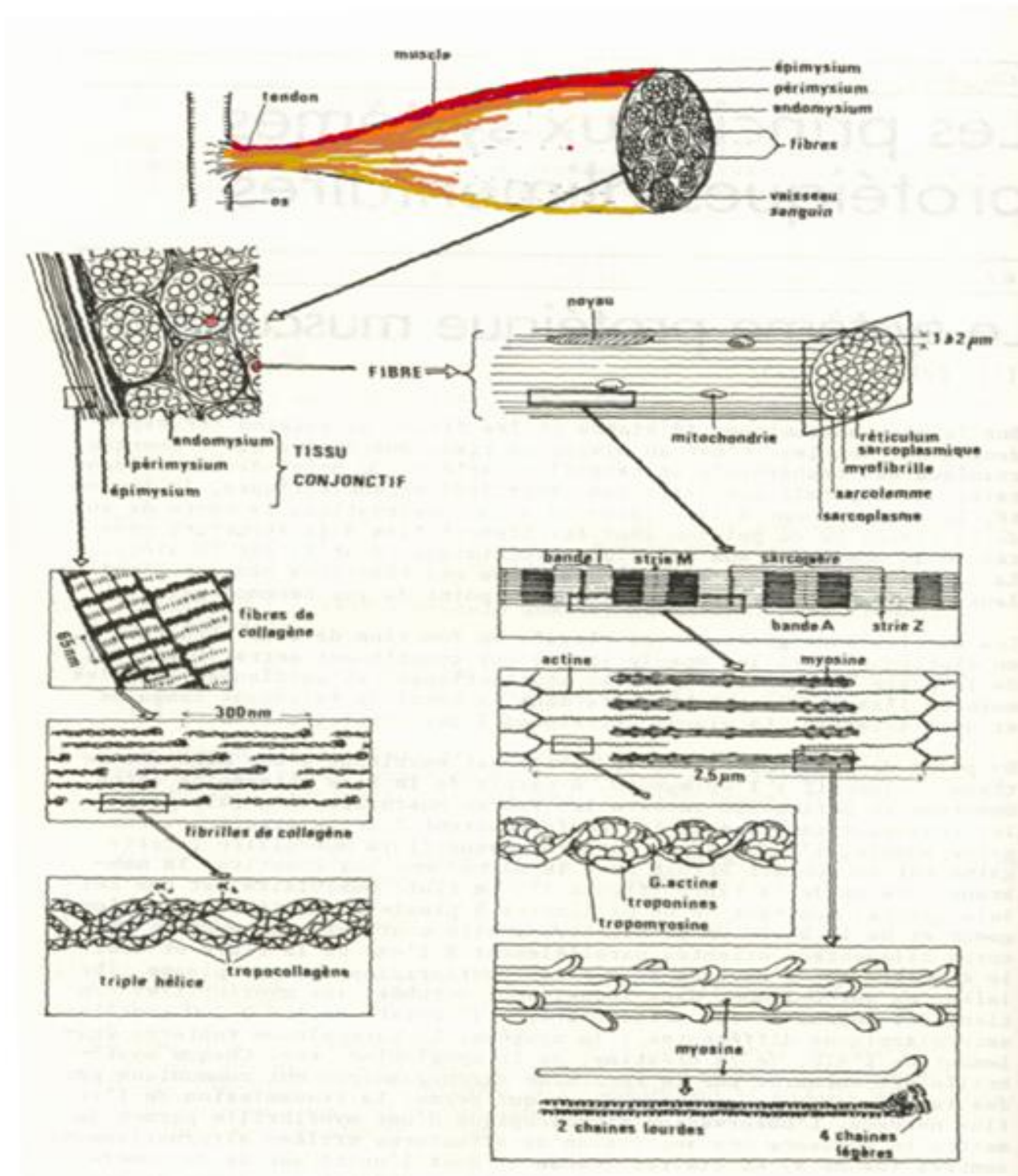


Figure 36. Le système protéique musculaire actine / myosine / collagène.

1) Méthodes physiques.

Ces méthodes sont applicables soit à des protéines cristallisées soit à des protéines en solution soit à des protéines préalablement traitées et deshydratées.

La **microscopie électronique** par **transmission** ou à **balayage** est largement utilisée et des techniques modernes comme la **microscopie à platine froide** réfrigérée par de l'azote liquide ou la **microscopie environnementale** sont aujourd'hui disponibles.

La **microscopie à effet tunnel** permet d'obtenir des images de macromolécules protéiques comme les immunoglobulines.

La **diffusion de neutrons** permet de donner une image du volume de la molécule.

Le **dichroïsme circulaire** permet l'évaluation des structures secondaires (α hélicité, feuillets) et de la structure native "globale" de la protéine .

La **spectroscopie aux rayons X** n'est applicable qu'aux protéines cristallisables

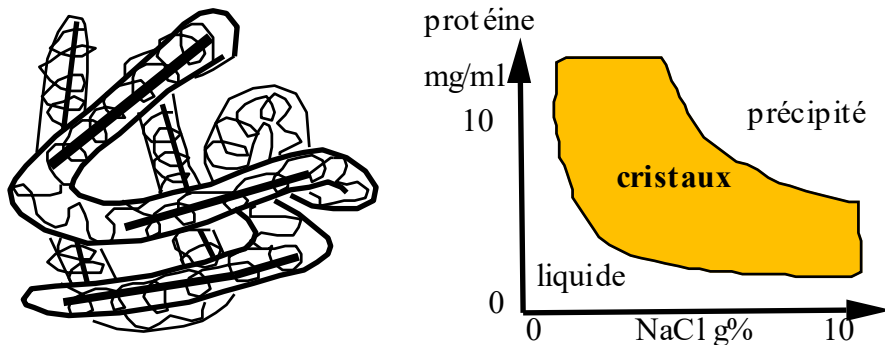


Schéma de la structure tertiaire de la myoglobine et diagramme de cristallisation

La **spectroscopie Raman** renseigne sur les modes de vibration et de rotation des molécules protéiques. Applicable à des études de structure, elle permet aussi l'étude de la fixation d'ions à ces macromolécules.

La **résonance magnétique nucléaire** permet la localisation des protons dans les protéines, d'en déterminer le nombre et la disposition. Cette technique permet de déterminer des couplages par liaison covalente et des couplages dipolaires si $d < 0,5$ nm (effets COSY et NOESY) et donc de situer des repliements. L'effet NOE se manifeste entre 0,2 et 0,5 nm.

La **ESR** (electron spin resonance) ou **RPE** (résonance paramagnétique électronique) permet d'évaluer la diffusivité rotationnelle (ou fréquence de réorientation-Drot) qui est un paramètre étroitement relié à la diffusion translationnelle (D_{trans} -sous l'influence d'un gradient de concentration) et permet d'estimer la mobilité de traceurs et de solutés au sein de molécules protéiques. La méthode par sondage de spin utilise des sondes paramagnétiques appelées marqueurs de spin telles que le 4-hydroxy,2-2-6-6-tétraméthylpipéridinooxyl qualifié de tempol.

La **calorimétrie différentielle à balayage** (ATD : analyse thermique différentielle) permet d'évaluer la température de dénaturation des protéines (pic endothermique) mais aussi la quantité d'énergie qu'il faut amener à la protéine pour la dénaturer

La **fluorimétrie** permet d'évaluer l'environnement et la mobilité de chaînes latérales très fluorescentes comme celle du tryptophane. Les phénomènes de quenching sont liés à l'environnement (et ses modifications) de cet acide aminé.

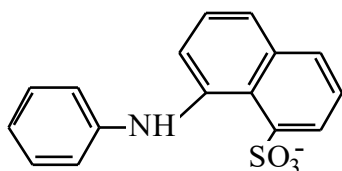
L'**électrophorèse** en milieu dénaturant (SDS-PAGE) est une technique analytique permettant de déterminer la masse moléculaire ainsi que le nombre de sous-unités dans une structure quaternaire. L'isotachophorèse permet, quant à elle de mesurer le pHi de la protéine.

Certaines **méthodes chromatographiques** utilisant des phases stationnaires polaires, apolaires ou "spécifiques" (Chromatographie d'affinité) contribuent à l'étude des structures protéiques et de leurs évolutions.

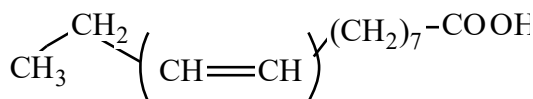
2) Méthodes chimiques

Certaines de ces méthodes reposent sur la *détermination de propriétés hydrophiles ou hydrophobes* de surface des molécules protéiques en utilisant respectivement des sondes ou des phases stationnaires en chromatographie qui sont respectivement hydrophiles ou hydrophobes (**acide cis-parinarique**, l'acide 8-anilino-1-naphtalène sulfonique (**ANS**) ou le **rétinol**. Ces composés deviennent fluorescents lorsqu'ils se fixent sur les sites hydrophobes des protéines. La mesure de fluorescence, proportionnelle au nombre de molécules de ligand fixé, permet, par la méthode de Scatchard ou de Klotz d'estimer le nombre de sites.

On peut aussi estimer l'**hydrophobicité de surface** d'une protéine par chromatographie avec des phases stationnaires apolaires (RPC : reversed phase chromatography). Le facteur de capacité sera d'autant plus élevé que la molécule possèdera des zones hydrophobes importantes et de forte énergie.



ANS



acide cis-parinarique

Il est possible de déterminer le nombre de **sites hydrophiles "ionisables"** en surface en utilisant des composants qui sont capables de donner des liaisons ioniques avec les groupements chargés des chaînes latérales. Le plus souvent il s'agit de composés colorés porteurs soit de groupements sulfonés (SO_3^-) soit des groupements aminés (R-NH_3^+). Le traitement des données se fait par la méthode de Scatchard ou de Klotz. Il faut remarquer ici que la formation d'un COOH à partir d'un COO^- (par diminution du pH en dessous du pK_a) se traduira par une diminution de l'hydrophilicité ou inversement par une augmentation de l'hydrophobicité.

3) Méthodes biologiques

Ces méthodes sont basées sur la réaction antigène-anticorps et s'appuient sur les techniques de l'immunologie.

IX.3.2. Interactions mises en jeu dans ces structures (cf cours Biochimie des Protéines - STIA1)

a) Les interactions de Van der Waals

La distance moyenne pour laquelle ces forces sont attractives est comprise entre 0,3 et 0,5 nm.

Ces interactions de Van der Waals contribuent surtout à la stabilisation des structures internes des protéines et peut-être à leur précipitation quand la sphère de solvation diminue par augmentation de la force ionique ou encore quand les effets répulsifs de type électrostatique sont minimisés (par exemple au pHi).

Ces interactions attractives diminuent quand la température augmente; le relargage des protéines sera donc favorisé par abaissement de la température. L'énergie mise en jeu est de l'ordre de 1 à 10 kJ.mole^{-1} .

b) Les interactions dipolaires

Les énergies de ces interactions sont comprises entre 1 et 10 kJ.mole⁻¹.

c) Les interactions ioniques (électrostatiques) : loi de Coulomb

Elles sont essentiellement dues aux groupements ionisables des chaînes latérales et se traduisent par des répulsions ou des attractions selon le signe. Dépendantes du pH elles contribuent à la stabilisation des structures spatiales (2aire ou 3 aire) et aux échanges avec l'environnement.

L'énergie de liaison comprise entre 40 et 85 kJ.mole⁻¹. Ces interactions affectent la solubilité, et les propriétés émulsifiantes et moussantes des protéines .

d) Liaisons par pont hydrogène

Ce type de liaison s'établit entre un atome électronégatif possédant au moins un doublet électronique (O, N, S) et un atome d'hydrogène lui-même lié à un atome électronégatif. Dans les protéines ces ponts se forment par exemple entre l'O du C = O d'une liaison peptidique et l'hydrogène du NH d'une autre liaison peptidique. La distance — O — H — est d'environ 17,5 nm. Dans les protéines ces liaisons se forment entre amide et carbonyl (ASN-GLN), phénol et carbonyl (TYR - ASN ou GLN), carbonyl et hydroxyl (ASP-GLU-SER). L'énergie de ces liaisons est de l'ordre de 10 à 40 kJ.mole⁻¹ et varie en fonction de l'électronégativité et de l'environnement.

Ces liaisons jouent un rôle déterminant dans la stabilisation de structures secondaires (hélice α , feuillets β) et tertiaires.

L'énergie de ces liaisons est réduite par la chaleur, l'urée, le chlorure de guanidine.

e) Interactions hydrophobes

L'énergie de ces interactions, voisine de 3 à 13 kJ.mole⁻¹ augmente avec la température en milieu aqueux .

f) Ponts disulfure

Ces ponts formés par oxydation de deux résidus de cystéine permettent la stabilisation des conformations protéiques et limitent leur nombre. Leur énergie est élevée (320 - 385 kJ.mole⁻¹). Ils sont réduits par des réducteurs puissants, et sont rompus par sulfitolyse.

XI.3.3. Hydrophobicité et hydrophilicité des acides aminés et des protéines

Une substance hydrophobe est une substance qui ne donne pas d'interaction avec l'eau (et donc qui la fuit) et inversement une substance hydrophile est un composé qui donne des interactions avec l'eau .

a) l'hydrophobicité

La variation d'énergie libre de transfert d'une mole de l'acide aminé de la solution aqueuse à une solution éthanolique est exprimée par

$$\Delta G^0 = RT \frac{S_{\text{éthanol}}}{S_{\text{eau}}}$$

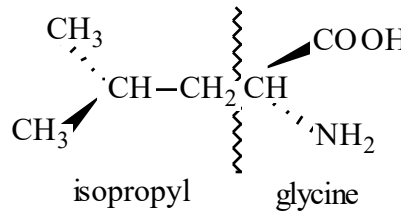
où $S_{\text{éthanol}}$ et S_{eau} sont les solubilités de l'acide aminé dans l'alcool et dans l'eau exprimées en mole.l⁻¹.

¹⁰ R est la constante des gaz parfaits et T la température absolue, les coefficients d'activité sont négligés.

Si la molécule possède une structure complexe, ΔG^0 est une fonction additive de ses différentes parties.

Ainsi, la leucine peut être subdivisée en deux parties en ce qui concerne son énergie libre de transfert de l'eau vers l'éthanol : une partie avec un "isopropyl" et une autre partie avec un groupement amino-

carboxylique, groupement qui est, à un hydrogène près, analogue à la glycine. Le ΔG° pour la glycine est déterminé par l'équation, le ΔG° pour la leucine également. La différence entre les deux valeurs correspond à l'énergie libre de transfert de la chaîne latérale de leucine .



$$\Delta G^\circ_{\text{chaîne latérale}} = \Delta G^\circ_{\text{acide aminé}} - \Delta G^\circ_{\text{glycine}}$$

Ce paramètre est important puisque dans les protéines les fonctions α -aminés et α -carboxyliques sont engagées dans la liaison peptidique et l'hydrophobicité de la protéine, liée à ses chaînes latérales, sera égale à la somme des hydrophobicités des chaînes latérales de l'ensemble des résidus.

$$\Delta G^\circ_{\text{protéine}} = \sum_{0 \text{ à } n} \Delta G^\circ_{\text{chaînes latérales}}$$

Généralement, on calcule une hydrophobicité moyenne en divisant l'hydrophobicité totale par le nombre de résidus d'acides aminés n :

$$\Delta G_m^\circ = \frac{\Delta G_{\text{protéine}}^\circ}{n}$$

L'hydrophobicité moyenne d'une protéine ΔG_m° permet d'estimer l'éventuelle **amertume** des hydrolysats. NEY a ainsi montré que les peptides dont l'hydrophobicité est :

- **inférieure à 5,43 kJ.résidu⁻¹ ne sont pas amers**

- **supérieure à 5,85 kJ.résidu⁻¹ sont amers.**

La séquence des acides aminés n'a pas d'incidence sur l'amertume.

Les valeurs de ΔG_m° sont de :

- **6,44** (kJ.résidu⁻¹) pour un isolat de soja
- **6,71** pour la caséine
- **6,19** pour la zéine,
- **5,38** pour le collagène,
- **4,25** pour la myosine,
- **4,4** pour l'actine,
- **5,15** pour la β -lactoglobuline,
- **4,8** pour l' α -lactalbumine,
- **4,7** pour la sérum albumine
- **4,5** pour les gliadines.

Les valeurs de l'hydrophobicité des chaînes latérales des acides aminés sont données par BIGELOW, C.C., J. Theoret. Biol., 1967, 16, 187-211. (cf poly STIA 1 tableau 4).

Il faut cependant noter qu'il n'existe aucune corrélation entre l'hydrophobicité moyenne d'une protéine et sa structure. Par contre il est possible, à partir de la séquence de la protéine, d'obtenir une

distribution des groupes hydrophobes (et hydrophiles). Il existe pour cela des programmes informatiques basés sur les travaux de CHOU & FASMAN, de LIM et de GARNIER & ROBSON et accessibles par Modem comme par exemple B.I.S.A.N.C.E.* (Base informatique sur la séquence d'acides nucléiques pour les chercheurs européens * CITI 2, 45, rue des Saint-Pères - 75270 PARIS) qui permettent d'obtenir les diagrammes de distribution de l'hydrophobicité et d'autres paramètres (figure 37).

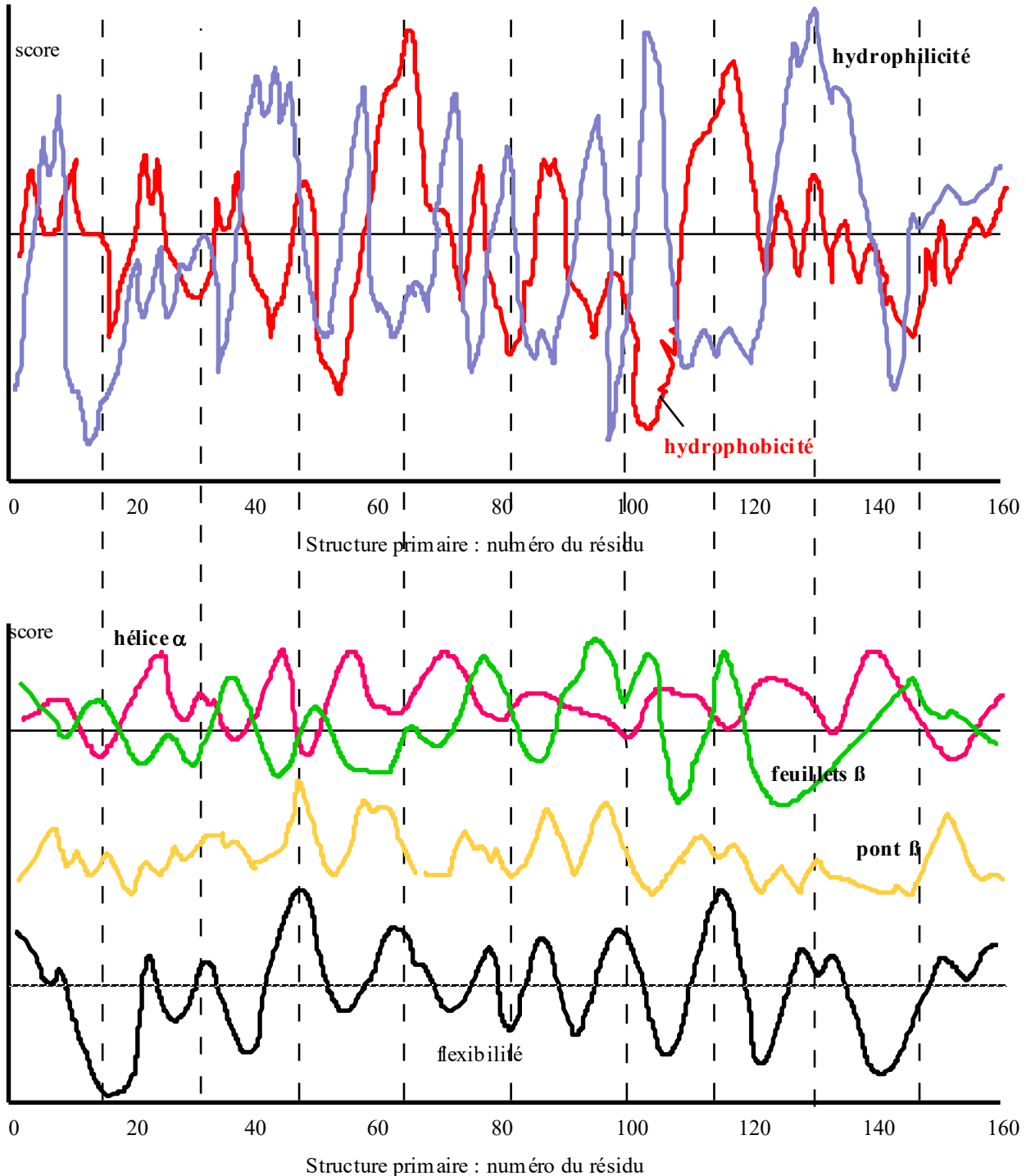


figure 37. Analyse probabiliste de la structure et des propriétés des protéines.
Analyses selon CHOU et FASMAN, GARNIER et ROBSON pour la β -lactoglobuline

b) Hydrophilicité des acides aminés et des protéines

L'hydrophilicité des acides aminés libres est d'abord liée à l'ionisation des fonctions α -aminé et α -carboxylique. Dans les protéines, ces fonctions sont engagées dans la liaison peptidique et seules seront à prendre en considération les fonctions αNH_2 et αCOOH N et C terminales ainsi que les groupements polaires ionisables (β et $\gamma\text{-COOH}$, εNH_2 , $\phi\text{-OH}$, R-SH) ou non (R-OH) des chaînes latérales des résidus d'acides aminés. En ce qui concerne les groupements polaires ionisables des protéines, ce sont les fonctions β ou γ carboxyliques des acides aspartique et glutamique qui sont souvent déterminantes dans la solubilisation. En effet le nombre de résidus ASP et GLU est généralement élevé, leur somme pouvant représenter jusqu'à 25-35 % de l'ensemble des résidus. Les pK_a des groupements α et γ carboxyliques des acides aspartique et glutamique sont respectivement égaux à 3,86 et 4,25. A des pH voisins de la neutralité ces groupes sont chargés négativement. Par contre, dans ces conditions les fonctions ε -aminés et guanidine de LYS et ARG sont encore chargées positivement, leur pK_a étant de 10,5 et 12,5. Il peut alors s'établir des liaisons ioniques intra et surtout intermoléculaires qui limiteront les interactions avec l'eau et donc la solubilité. Pour des valeurs de pH comprises entre 11 et 12, la charge positive des chaînes latérales de LYS et ARG diminue. La molécule ne contient alors que des charges négatives qui en se repoussant et en donnant des interactions avec l'eau contribueront à la solubilisation mais aussi à la dénaturation de la protéine. L'hydrophilicité liée aux chaînes latérales portant des groupements carboxyliques ou aminés est donc essentiellement fonction du pH du solvant. Par contre l'hydrophilicité des chaînes latérales polaires non ionisables (SER, THR, CYS, GLN, ASN) sera à l'origine de réactions d'échange avec l'eau qui ne dépendront pas du pH.

XI.3.4. Prédiction des structures (cf cours de Biochimie STIA1)

Les liaisons et interactions qui viennent d'être décrites sont à l'origine des structures secondaire, tertiaire et quaternaire des protéines. En raison de la liberté de rotation autour du C_α des résidus d'acides aminés il existe de très nombreuses possibilités de conformation d'une chaîne polypeptidique. Pourtant, dans des conditions données (pH, t° , μ) cette chaîne ne prend qu'une seule conformation qui est qualifiée de native. Du point de vue thermodynamique le système ainsi organisé est stable et son énergie libre est minimale. Cette conformation est fonction entre autre de la polarité, l'hydrophobicité et l'encombrement stérique des chaînes latérales. Les méthodes prédictives des structures tertiaires, malgré les outils informatiques puissants mis à disposition, restent encore peu précises.

a) Prise en compte des contraintes stériques

Les contraintes stériques sont liées aux degrés de liberté de rotation des liaisons peptidiques ϕ et ψ qui peuvent prendre toutes les valeurs comprises entre 180° et -180° (figure 32). Cependant la nature de R (ionisation, volume, hydrophobicité, hydrophilicité) va impliquer des répulsions des R ou des attractions se traduisant par un rapprochement ou un éloignement maximum et donc par des angles ϕ et ψ bien définis.

Pour les résidus de glycine les zones de conformations permises sont importantes et symétriques tandis que pour les résidus d'alanine les degrés de libertés de ϕ et ψ sont plus faibles (figure 38).

Dans leur analyse, CHOU et FASMAN (cf paragraphe IX.3.1.a et tableau XXIII) ont étudié dans de nombreuses protéines à séquence et structure connues la localisation des résidus d'acides aminés puis leur probabilité à participer à des structures secondaires données.

Par exemple sur un total de 2573 résidus totaux il y a 890 résidus impliqués dans des hélices α . Sur ces 2573 résidus il y a 238 résidus d'alanine dont 119 sont impliqués dans des hélices α . La probabilité qu'a l'alanine de participer à l'hélice α est égale à :

$$P_{\alpha}(\text{ALA}) = (119 / 238) / (890 / 2573) = 1,45$$

Comme P_{α} est supérieur à 1 le résidu est qualifié de formateur de la structure secondaire tandis qu'il est casseur si P_{α} est inférieur à 1.

Dans une séquence donnée on associe les résidus par 4 ou 6 (fenêtres) et on fait la somme des P_{α} , P_{β} , P_{p} . On obtient ainsi une distribution linéaire de probabilité de structures secondaires déterminées mais aussi, en utilisant la même démarche une distribution probabiliste de propriétés particulières aux protéines.

Il est ainsi possible de prédire les déterminants antigéniques (HOPP et WOODS, 1983, Molecular Immunology, 20, 483-489) ou des distributions liées à des propriétés telles qu'amphipathicité (SETTLE et Coll., 1986, Molecular Immunology, 23, 807-810) ou amphiphilicité (EISENBERG et coll., J. Cell. Biochem., 1986, 31, 11-17).

Certains auteurs adoptent comme valeurs de l'hydrophobicité les valeurs relatives suivantes (TRP = 14,2, PHE = 10,45, TYR = 9,61, LEU = ILE = 7,52, VAL = 6,27, MET = 5,43, ALA = 2,1, CYSTEINE = 2,1, les autres acides aminés = 0).

Dans ces méthodes, la séquence est représentée par une chaîne d'éléments cubiques ou sphériques séparés par 0,4-0,6 nm. Ces éléments correspondants aux résidus d'acides aminés sont définis comme des volumes élastiques régulés par un certain nombre de paramètres (hydrophobicité, charge partielle, pK, flexibilité et longueur de la chaîne, accessibilité aux solvants, volume, susceptibilité à la formation de structures α ou β). Ces paramètres sont ensuite intégrés par la méthode des fenêtres mobiles.

Dans leur approche, GARNIER et ROBSON ont par analyse de probabilité introduit une constante de décision.

En ce qui concerne l'hydrophobicité, l'énergie libre d'une protéine est donnée par :

$$G_H = \sum_{1 \text{ à } n} \Delta G^{\circ}_{\text{résidu}} \cdot M(x_i)$$

avec $\Delta G^{\circ}_{\text{résidu}}$ représentant l'hydrophobicité du résidu et $M(x_i)$ l'hydrophobicité de l'environnement.

En supposant que S / S° de la surface du résidu soit accessible au solvant et que le reste du résidu $(1 - S / S^{\circ})$ soit impliqué dans des interactions protéiques, on admet que l'hydrophobicité de l'environnement du solvant aqueux est + 1/2 et que l'hydrophobicité de l'environnement de l'intérieur de la protéine - 1/2.

On a alors :

$$G_H = \sum_{1 \text{ à } n} \Delta G^{\circ}_{\text{résidu}} (S_i / S_i^{\circ} - 1)$$

S_i et S_i° pouvant être calculés par les valeurs données par NOVOTNY et coll., (J. Mol. Biol., 1984, 177, 787). Les moments hydrophobiques sont calculés pour des segments de structure secondaire par

$$\mu_H = \sum_{1 \text{ à } n} \Delta G^{\circ}_{\text{résidu}} \cdot v_i$$

v_i étant un vecteur unitaire allant du carbone α au centre de la chaîne latérale du résidu. Le vecteur μ_H pour chaque segment est positionné par pointage du centre du segment vers la zone la plus hydrophobe.

En ce qui concerne la prédiction des épitopes (déterminants antigéniques), c'est à dire des zones réactives à activité antipeptidique des anticorps, il apparaît que ce sont les zones en boucles β (β turns) qui sont le plus souvent impliquées. Des programmes informatiques basé sur la probabilité de présence des β -turns sont utilisables dans ce but (KRCHNAK et coll., 1987, Anal. Biochem., 165, 200-207).

Quelques données fournies par l'utilisation de ces programmes sont indiquées, pour la β -lactoglobuline pour laquelle nous avons "rentré" la séquence dans le programme, sur la figure 25.

XI.3.5. Estimation de la structure protéique. Aspects dynamiques

L'approche informationnelle est très complexe et repose sur la recherche d'interactions entre résidus d'acides aminés proches et éloignés.

L'estimation des structures secondaire et tertiaire des protéines à partir de leur séquence (structure primaire) ou la prédiction de leur localisation dans un ensemble moléculaire font toujours l'objet de très nombreux travaux. Il n'est pas inconcevable d'imaginer que bientôt, grâce en particulier aux moyens de calcul de plus en plus puissants mis à la disposition du biochimiste, il sera bientôt possible de connaître la structure spatiale des protéines alimentaires et par là même prédire les propriétés fonctionnelles de ces molécules protéiques (solubilité, pouvoirs moussant, gélifiant, émulsifiant etc...) d'après la seule connaissance de leur séquence. La connaissance des mouvements de ces molécules (déplissements plus ou moins partiels, démasquage de zones internes hydrophobes, etc.) au cours de traitements technologiques est directement corrélable aux propriétés engendrées par ces mouvements.

Actuellement il existe des programmes informatiques permettant la localisation "linéaire" de zones hydrophiles, hydrophobes ou antigéniques et des progrès remarquables sont réalisés tous les jours pour évaluer la structure moléculaire et ses changements. D'ailleurs ce sont ces changements qui sont à l'origine des propriétés de certaines molécules protéiques.

Pour donner un exemple d'études prédictives déjà anciennes, on peut signaler les travaux de RAFTERY et al. (Cold Spring Harbor Symp., 1976, 40, 193) qui permettent de situer une protéine dans une structure donnée. Pour cela, l'hydrophobicité moyenne et le rapport des fréquences des chaînes latérales à propriétés opposées (hydrophobes, hydrophiles par exemple) sont d'abord calculés.

$$R = \sum_i F_k / \sum_j F_j$$

Le calcul de R avec k = Arg, Lys, His, Gly, Gl, Asp, Asn et His et j = Ile, Tyr, Phe, Leu, Val et Met peut être réalisée. R est égal à 1,26 pour des protéines non membranaires, à 1,37 pour des protéines membranaires externes et à 0,59 pour des protéines membranaires internes.

Les valeurs correspondantes respectives de G_o sont de 4,18, 4,13 et 5,01 KJ.résidu⁻¹. Ces données traduisent une distribution importante des chaînes latérales polaires à l'extérieur des protéines non membranaires ou membranaires externes, alors que les résidus apolaires sont situés vers la partie centrale des molécules. Le calcul d'une fonction discriminante

$Z = - 0,345 R + 0,60 G_o$ permet de rendre maximales les variations entre protéines membranaires internes et externes (Z prend une valeur moyenne de 0,52 pour les protéines internes et de 0,12 pour les protéines externes). Ainsi, par l'analyse de G_o et de Z, il est possible de situer la molécule protéique dans une membrane (tableau 35).

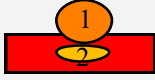
Quand G_o est peu élevé (inférieur à 5 kJ.résidu⁻¹) la protéine membranaire est externe si Z est inférieur à 0,40.

Il existe des méthodes de calcul du mouvement supposé des résidus d'acides aminés dans les protéines. Les forces auxquelles sont soumis les résidus sont estimées à partir des potentiels dont elles dérivent (cF VIII-2-d). La force résultante exercée sur chaque résidu peut être estimée à :

$$F_i = - \sum_j U_{ij}$$

où U_{ij} est le potentiel d'énergie entre i et j . Chaque force produit une accélération g_i selon la loi de Newton. Dans un calcul de mouvement ces deux équations sont résolues simultanément pour tous les résidus i à un temps donné. Ensuite on calcule les nouvelles positions des résidus et ainsi de suite. Il existe des méthodes physiques telles que la relaxation RMN¹³C, l'ESR ou la polarisation de fluorescence qui permettent d'estimer le mouvement de certaines chaînes latérales d'acides aminés.

Tableau 35. Estimation par calcul de la localisation membranaire de protéines.

Protéine	Go kJ.résidu ⁻¹	Z	localisation	représentation
Récepteur de l'acétylcholine				
sous-unité 1	4,94	0,38	externe	
sous-unité 2	4,68	0,29	externe	
sous-unité 3	4,77	0,31	externe	
sous-unité 4	4,77	0,25	externe	
Acétyl cholinestérase	4,43	0,25	externe	
Cytochrome oxydase				
sous-unité 1	4,95	0,51	interne	
sous-unité 2	4,23	0,25	externe	
sous-unité 4	4,32	0,16	externe	
sous-unité 6	4,30	0,14	externe	
Na ⁺ -K ⁺ ATPase				
sous-unité 1	5,22	0,42	Externe	
sous-unité 2	5,47	0,42	Interne	
Rhodopsine	5,05	0,51	interne	

La mesure de la perméabilité de la protéine ou de l'accessibilité de certains résidus à l'eau ou à certains produits est difficile (par exemple, la pénétration de l'oxygène modifie la fluorescence des résidus de tryptophane internes, tandis que celle des ions iodure ne la modifie que partiellement) et la technique de la RPE permet de donner de bonnes informations. Les variations de perméabilité peuvent engendrer des erreurs dans certaines évaluations chimiques: ainsi la mesure de la lysine réactive au 1-fluoro, 2-4 dinitrobenzène ne devrait être applicable que lorsque tous les résidus de lysine sont identiquement accessibles au réactif dans la ou les protéines.

Alors que des modifications de la structure tertiaire sont difficiles à analyser, les variations des associations moléculaires au cours des traitements technologiques par exemple, sont plus aisées à suivre. Par FPLC, il est possible par exemple d'analyser les différentes formes de la molécule (monomère, dimère, tétramère etc.) et par microscopie électronique d'évaluer les modes d'associations.

Parmi les logiciels d'étude des structures des protéines, il faut signaler **RasMol v2.6** et **MolView 1.3.1** dont quelques renseignements sont indiqués ci-après :

RasMol is a molecular graphics program intended for the visualisation of proteins, nucleic acids and small molecules. The program is aimed at display, teaching and generation of publication quality images. The program has been developed at the University of Edinburgh's Biocomputing Research Unit and the Biomolecular Structures Group at Glaxo Research and Development, Greenford, UK.

RasMol reads in molecular co-ordinate files in a number of formats and interactively displays the molecule on the screen in a variety of colour schemes and representations. Currently supported input file formats include Brookhaven Protein Databank (PDB), Tripos' Alchemy and Sybyl Mol2 formats, Molecular Design Limited's (MDL) Mol file format, Minnesota Supercomputer Center's (MSC) XMol XYZ format and CHARMM format files. If connectivity information and/or secondary structure information is not contained in the file this is calculated automatically. The loaded molecule may be shown as wireframe, cylinder (dried) stick bonds, alpha-carbon trace, spacefilling (CPK) spheres, macromolecular ribbons (either smooth shaded solid ribbons or parallel strands), hydrogen bonding and dot surface. Atoms may also be labelled with arbitrary text strings. Different parts of the molecule may be displayed and coloured independently of the rest of the molecule or shown in representations simultaneously. The space filling spheres can even be shadowed. The displayed molecule may be rotated, translated, zoomed, z-clipped (slabbed) interactively using either the mouse, the scroll bars, the command line or an attached box. RasMol can read a prepared list of commands from a 'script' file (or via interprocess communication) to allow a given image or viewpoint to be restored quickly. RasMol can also create a script file containing the commands required to regenerate the current image. Finally the rendered image may be written out in a variety of formats including both raster and vector PostScript, GIF, PPM, BMP, PICT, Sun rasterfile or as a MolScript input script or Kinemage.

RasMol will run on a wide range of architectures and systems including SGI, sun4, sun3, sun386i, SGI, DEC, HP and E&S workstations, IBM RS/6000, Cray, Sequent, DEC Alpha (OSF/1, OpenVMS and Windows NT), IBM PC (under Microsoft Windows, Windows NT, OS/2, Linux, BSD386 and *BSD), Apple Machintosh (System 7.0 or later), PowerMac and VAX VMS (under DEC Windows). UNIX and VMS versions require an 8bit, 24bit or 32bit X Windows frame buffer (X11R4 or later). The X Windows version of RasMol provides optional support for a hardware dial box and accelerated shared memory rendering (via the XInput and MIT-SHM extensions) if available.

The source code is public domain and freely distributable provided that the original author is suitably acknowledged. The complete source code and user documentation may be obtained by anonymous FTP from ftp.dcs.ed.ac.uk [129.215.160.5] in the /pub/rasmol. The source code, documentation and Microsoft Windows executables are stored in several files appropriate for the receiving operating system. Please read the "README" file in the distribution directory. UNIX and VAX systems should retrieve either RasMol2.tar.Z, RasMol2.tar.gz. Apple Mac users should retrieve RasMac.sit.hqx. Windows users should retrieve RasWin.zip and optionally the Visual Basic package RasMenu.zip. All these files include source code, on-line help, user manual and reference card. RasMac.sit.hqx, RasWin.zip and RasMenu.zip also contain executables for the required platform. Please remember to use "binary" mode when transferring these files between systems. Check that the file size is the same before and after transfer.

Any comments, suggestions or questions about the package may be directed to the author at "rasmol@ggr.co.uk".

Roger Sayle, INTERNET: ras32425@ggr.co.uk
 Glaxo Research & Development (GRD) ros@dcs.ed.ac.uk
 Greenford Road, Greenford Tel: (+44) 081 966 3567 (direct line)
 Middlesex UB6 0HE, UK. Fax: (+44) 081 966 4476

XI.3.6. Dénaturation et changements de conformation

La conformation native de la plupart des protéines est fragile et peut être modifiée par des traitements mécaniques, physiques (irradiation, chaleur) ou chimiques (pH, sels, solvants, réactifs etc.) . Ces changements qui affectent les structures quaternaires, tertiaires et secondaires sont complexes, parfois fugaces et dépendent d'abord des quantités d'énergie mises en jeu.

Ce sont en général les liaisons de plus faible énergie qui "cassent" les premières. Les ponts β qui ne sont stabilisés que par 2 liaisons hydrogène sont par exemple facilement ouverts et les zones en hélice α qu'ils rapprochaient se retrouvent alors éloignées sans que la structure secondaire bien stabilisée par de nombreuses liaisons hydrogène soit modifiée.

Le "déroutement" qui se produit est ensuite suivi par des destructurations de zones en feuillets β et en hélice α , le stade ultime de la dénaturation correspondant souvent à une structure "déroutée" au sein de laquelle peuvent ou non subsister des zones interactives à niveau énergétique élevé. Chaque protéine présentera une forme dénaturée donnée pour un agent dénaturant donné (par exemple en milieu aqueux la chaleur augmente les interactions hydrophobes intra et interprotéiques, alors qu'en milieu éthanolique elle les diminue).

Parmi les agents de dénaturation on peut signaler :

- la **chaleur** qui conduit par agitation (et en milieu aqueux) d'abord à des ruptures de liaisons hydrogène, puis de liaisons ioniques puis plus rarement de ponts disulfure. Il peut se produire des

désulfurations mais il arrive souvent que des ponts S-S inter ou intramoléculaires se forment au cours du chauffage par échanges irréversibles et ce à partir de 60-70°C. La polymérisation désordonnée qui en résulte conduit à une diminution de la solubilité (BSA, β -lactoglobuline). Une gélification, précédée par une forte augmentation de la viscosité peut être observée dans certains cas.

La vitesse de dénaturation dépend de la température et avec les protéines cette vitesse est multipliée par environ 600 quand la température augmente de 10°C au voisinage de la température pour laquelle il se produit une dénaturation. En milieu aqueux, le chauffage renforce les interactions hydrophobes et ces effets sont largement dépendants de la nature et la concentration de la protéine, de la force ionique et de la nature des sels et du pH. L'eau favorise certaines dénaturations, en particuliers celles mettant en jeu des liaisons hydrogène (il se produit une cassure intramoléculaire et l'eau vient réagir avec les deux résidus d'acides aminés initialement impliqués dans la liaison, les empêchant ainsi de la reformer).

En absence d'eau, les protéines sont moins sensibles à la dénaturation thermique car une liaison coupée aura tendance à se reformer spontanément. Signalons enfin que sous l'effet de la chaleur il peut se former des ponts covalents inter ou intramoléculaires (lysinoalanyl, β aspartyl-lysyl, γ glutamyl-lysyl etc). Pour les protéines globulaires, la dénaturation se traduit généralement par une augmentation de la surface interfaciale et une augmentation des interactions protéine-eau et donc de la capacité de rétention d'eau. Par exemple, pour l' α -chymotrypsine la surface passe de 10^{-16} m² à $3,6 \cdot 10^{-16}$ m² après dénaturation tandis que la quantité d'eau liée (eau de structure - eau interfaciale) passe de 0,37 à 0,42 g/g.

- Le **froid** peut provoquer des changements de conformation par renforcement de l'énergie de stabilisation des liaisons hydrogène et création de liaisons intermoléculaires. Dans ce cas il n'y a pas déroulement mais agrégation et précipitation. Ce sont les protéines possédant un rapport acides aminés apolaires / acides aminés polaires élevé qui sont généralement les plus sensibles au froid, les interactions hydrophobes diminuant avec la température. Les phénomènes associés aux basses températures comme la formation de glace ou l'augmentation de concentration en solutés dans les phases liquides non congelées engendrent parfois une baisse de solubilité. Défavorable pour certaines protéines (oeuf), ce phénomène est mis à profit pour texturer des protéines : cryotexturation(kori tofu).

- Les **traitements mécaniques** (contraintes de cisaillement). En présence d'eau, ces traitements peuvent "casser" des hélices et des feuilletts. Les **hautes pressions** ($P > 2000$ bars) sont suffisamment énergétiques pour rompre des liaisons de faible énergie (hydrophobe, hydrogène, Van der Waals). Elles sont donc capables de rompre simultanément par contrainte mécanique des liens sur lesquels les solvants ou la chaleur ont un effet "sélectif".

- Le "**positionnement d'une protéine à une interface eau / fluide hydrophobe** (huile, air etc.) qui permet par exemple de stabiliser des émulsions ou des mousses provoque une distribution anisotrope des résidus d'acides aminés dans les deux phases et donc une modification de conformation par rapport à la forme native. C'est la distribution des résidus apolaires et polaires (regroupés en zones bien définies) qui assurera ou non ces pouvoirs à la protéine.

- De nombreux **agents chimiques** peuvent engendrer des dénaturations.

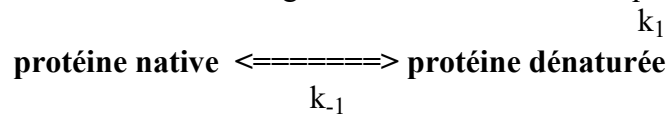
Les acides et les bases modifient l'ionisation de certaines chaînes latérales et donc les interactions ioniques stabilisant les structures.

La plupart des métaux divalents en se fixant sur les protéines au niveau de deux groupements SH intermoléculaires entraînent des modifications de conformations (il y a création et non destruction de liaisons).

La plupart des solvants organiques donne des interactions avec les groupements hydrophobes qui sont ainsi "démasqués"; une dénaturation s'en suit alors. Le chloro-2-éthanol augmente l' α -hélicité.

Des composés en solution comme l'urée ou le dodécyl sulfate de sodium donnent avec les protéines des interactions respectivement avec les liaisons hydrogène et hydrophobe, ce qui modifie la structure.

En conclusion il faut donc retenir que la structure modifiée par un traitement qualifié de dénaturant variera avec la protéine mais surtout l'agent dénaturant . Schématiquement on peut écrire :



L'équation de vitesse est la suivante :

$$d(P_n) / dt = k_1 (P_n) - k_{-1}(P_d)$$

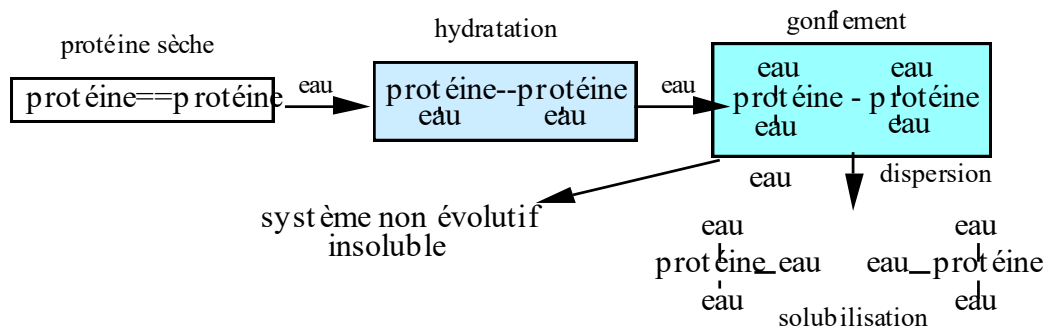
L'énergie d'activation peut être calculée à partir de la loi d'Arrhénius. Ces énergies d'activation sont généralement élevées (150 à 1000 kJ.mole⁻¹) au cours de la dénaturation par la chaleur car le nombre de liaisons à rompre est très élevé (bien qu'elles soient de faible énergie).

XI.4. INTERACTIONS PROTEINES / EAU

La conformation d'une protéine en solution ou en milieu peu hydraté dépend évidemment de ses interactions avec les molécules d'eau.

Au cours de la préparation d'isolats protéiques à partir d'une graine par exemple les protéines devront subir une hydratation conduisant à leur solubilisation puis seront isolées et déshydratées pour enfin être utilisées dans nos aliments le plus souvent après une nouvelle hydratation .

Dans une protéine, il existe plusieurs états de l'eau, états qui diffèrent entre eux essentiellement en fonction de l'énergie d'interaction protéine-eau mise en jeu. Leur description pseudo-discontinue la plus souvent donnée est la suivante :



- **l'eau de structure** et **l'eau de la couche monomoléculaire** sont fortement adsorbées sur des sites spécifiques et représentent de 0,003 à 0,009 g/g de protéine sèche. Cette eau liée à la protéine par des liaisons hydrogène n'est pas congelable et correspond à l'eau absorbée par la protéine placée dans un milieu dont l' $a_w < 0,8$. Evaluable par RMN ou calorimétrie différentielle, cette eau contribue à la conformation de la molécule protéique. La durée des interactions est de 10⁻⁶ sec et les énergies de liaison protéine-eau sont supérieures à 25 kJ.mole⁻¹.

- **L'eau interfaciale** (multicouche ou "voisine") est localisée à la surface des résidus d'acides aminés déjà hydratés. Dans cette phase les interactions eau-eau sont plus fortes que dans l'eau libre. Cette structure persiste 10⁻⁹ sec et représente de 0,1 à 0,5 g d'eau par g de protéine.

- **L'eau d'imbibition**, retenue physiquement dans les crevasses ou pores de la protéine, possède les propriétés de l'eau libre, les structures persistant en moyenne 10⁻¹² sec. Cette eau peut représenter jusqu'à 10 g/g de protéine dans le cas de structures gélifiées comme les fromages, viandes etc...

Pour l'eau de structure et de la couche monomoléculaire, la mise en évidence des groupements protéiques impliqués dans l'échange a été réalisée par KARMAS (1970) et KUNTZ (1971) respectivement par calorimétrie différentielle et par RMN. Il apparaît que la quantité d'eau liée

diminue dans l'ordre groupes ioniques-groupes polaires-groupes hydrophobes. Ainsi KUNTZ, à partir de peptides de synthèse a évalué l'hydratation de chaînes latérales (Tableau 36).

Tableau 36. Moles d'eau fixées par moles de chaîne latérale d'acide aminé (selon KUNTZ, 1971)

types de résidus	mole d'eau fixée par mole de résidu
résidus ioniques	
ASP-	6
GLU-, TYR-	7
ARG+	3
HIS+, LYS+	4
résidus polaires	
ASN , GLN	2
SER , THR , ASP	2
GLU	2
PRO , TYR, ARG	3
LYS	4
Résidus apolaires	
PHE	0
ALA , GLY, VAL , ILE	1
LEU , MET	1

Il est clair que la conformation d'une protéine est liée entre autre à l'ionisation des groupes COOH et NH₂ des chaînes latérales. Selon le pH ces groupes donneront entre eux et avec l'eau solvante des interactions d'intensité variable.

L'**absorption d'eau** et la **capacité de rétention d'eau** sont deux propriétés technologiques importantes des protéines alimentaires (cf propriétés fonctionnelles).

L'**extractibilité** et la **solubilité** correspondent aussi à deux propriétés technologiques importantes qui conditionnent la fabrication d'isolats par exemple mais aussi certaines des utilisations des protéines (émulsifiantes, moussantes).

XI.5. PARAMETRES DE SOLUBILITE & PRECIPITABILITE DES PROTEINES

La solubilité des protéines en milieu aqueux conditionne de façon prépondérante le rendement d'extraction lors de la purification en vue de la fabrication d'isolat mais aussi bon nombre de propriétés fonctionnelles telles que les propriétés gélifiantes, émulsifiantes et moussantes. Cependant, il ne s'agit pas là du paramètre unique du "rendement". Ainsi d'autres facteurs interviennent et parmi ceux-ci on peut citer :

XI.5.1. La microstructure, les états physiques et de surface, le niveau d'hydratation, la taille des particules.

Il s'agit là de caractéristiques qui sont particulières à chaque variété de graines mais aussi, au sein d'une variété donnée, de caractéristiques qui peuvent varier avec les conditions de culture, d'humidité relative etc. Les effets de la **taille des particules** sur l'extractibilité des protéines sont très importants (cf IX.1.a). Toutes conditions étant égales par ailleurs, il apparaît que plus la taille des particules diminue et plus la quantité de protéines extraites augmente (figure 40).

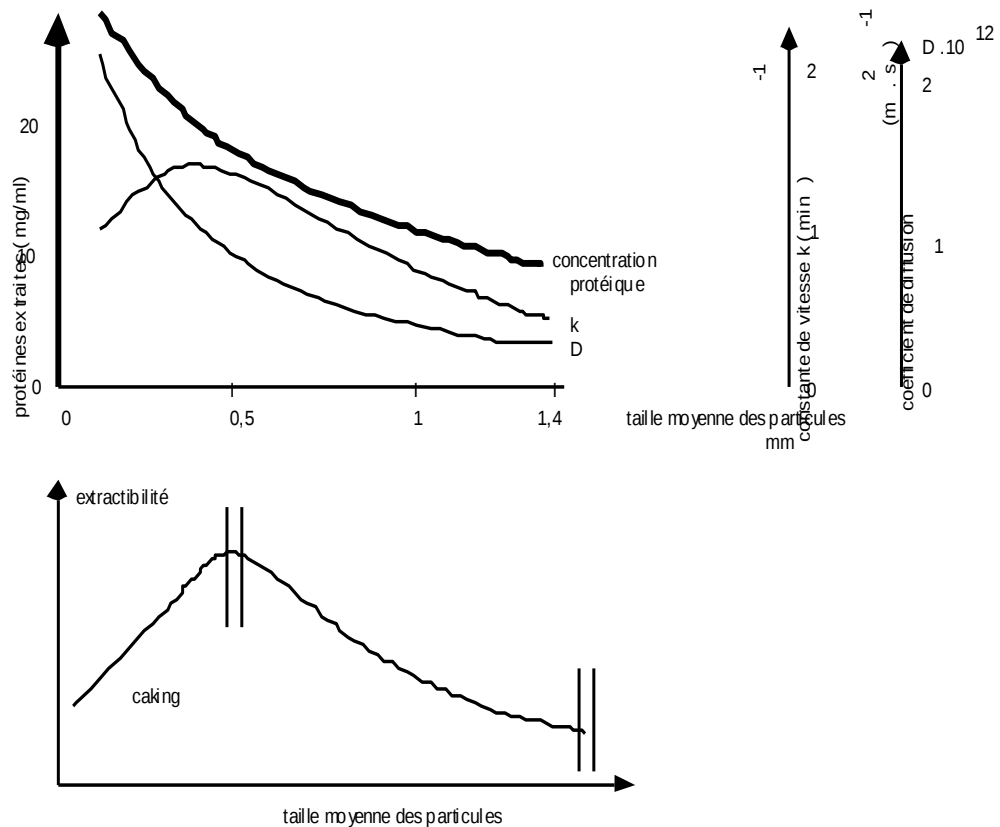


figure 40. Variations de l'extractibilité des protéines en fonction de la taille des particules (à température, pH, force ionique, rapport solide / solvant et temps constants)

Quand la taille des particules diminue, la *constante de vitesse* k augmente, passe par un optimum puis diminue. Le *coefficient de diffusion* D varie entre $0,5$ et $5 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Ce coefficient est plus élevé avec des particules mises en flocons ou explosées (les particules sont d'abord équilibrées à une teneur en eau de 28% , puis dépressurisées en moins d'une seconde de 4 MPa à la pression atmosphérique) et possède une énergie d'activation voisine de $40 \text{ kJ} \cdot \text{mole}^{-1}$.

L'*extractibilité*, exprimée par la concentration en protéine dans la phase aqueuse solvante, augmente quand la taille des particules diminue; ce phénomène correspond à une augmentation de la surface d'échange proportionnelle au carré du diamètre. Cependant, à partir d'une taille donnée il peut se produire une diminution de l'extractibilité alors que le diamètre moyen des particules diminue; ce sont des phénomènes d'agrégation (caking) des particules par des interactions hydrophobes de surface qui en sont à l'origine, les particules "reconstituées" possédant un diamètre apparent qui augmente. Ces particules piègent souvent de l'air et sont difficilement dispersibles dans des phases aqueuses.

La **microstructure** des particules et plus particulièrement des cellules et de leur contenu conditionne l'extractibilité. Dans la plupart des cellules végétales de cotylédons de graines, la membrane présente des ouvertures (plasmodesmes) au travers desquelles les protéines solubilisées à partir des corps protéiques vont passer vers le milieu d'extraction (figure 41). Des traitements susceptibles de casser ces membranes tels que mise en flocons ou explosion favoriseront l'extractibilité. De la même façon une *hydratation* préalable provoque une turgescence des cellules (courant d'endosmose) et donc une "dilatation" des particules ce qui favorise une augmentation du diamètre des plasmodesmes et donc de l'extractibilité. Cette hydratation préalable de la surface des corps protéiques est la première étape de la solubilisation des protéines qu'il contient. La dissolution des protéines conduit à un milieu intracellulaire à concentration élevée en protéine. Un transfert de matière par diffusion se produit vers le milieu d'extraction par un courant d'exosmose. L'*état physique cristallisé ou amorphe* des corps protéiques conditionne la solubilisation.

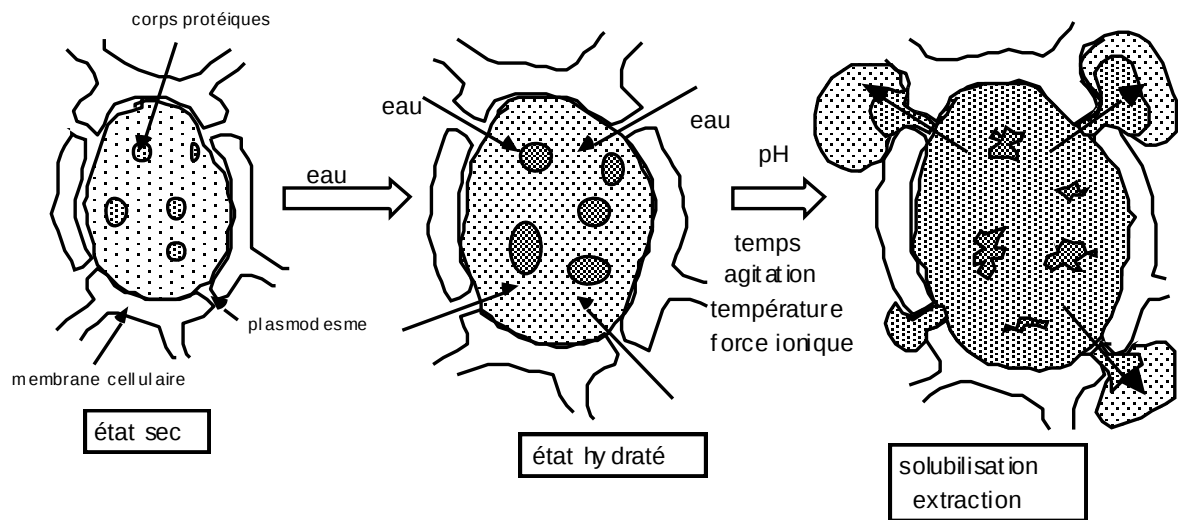


figure 41. Schéma de l'extraction des protéines d'une graine

Une analyse microscopique des particules soumises à l'extraction permet de bien visualiser les structures cellulaires ainsi que les corps protéiques (figure 42).

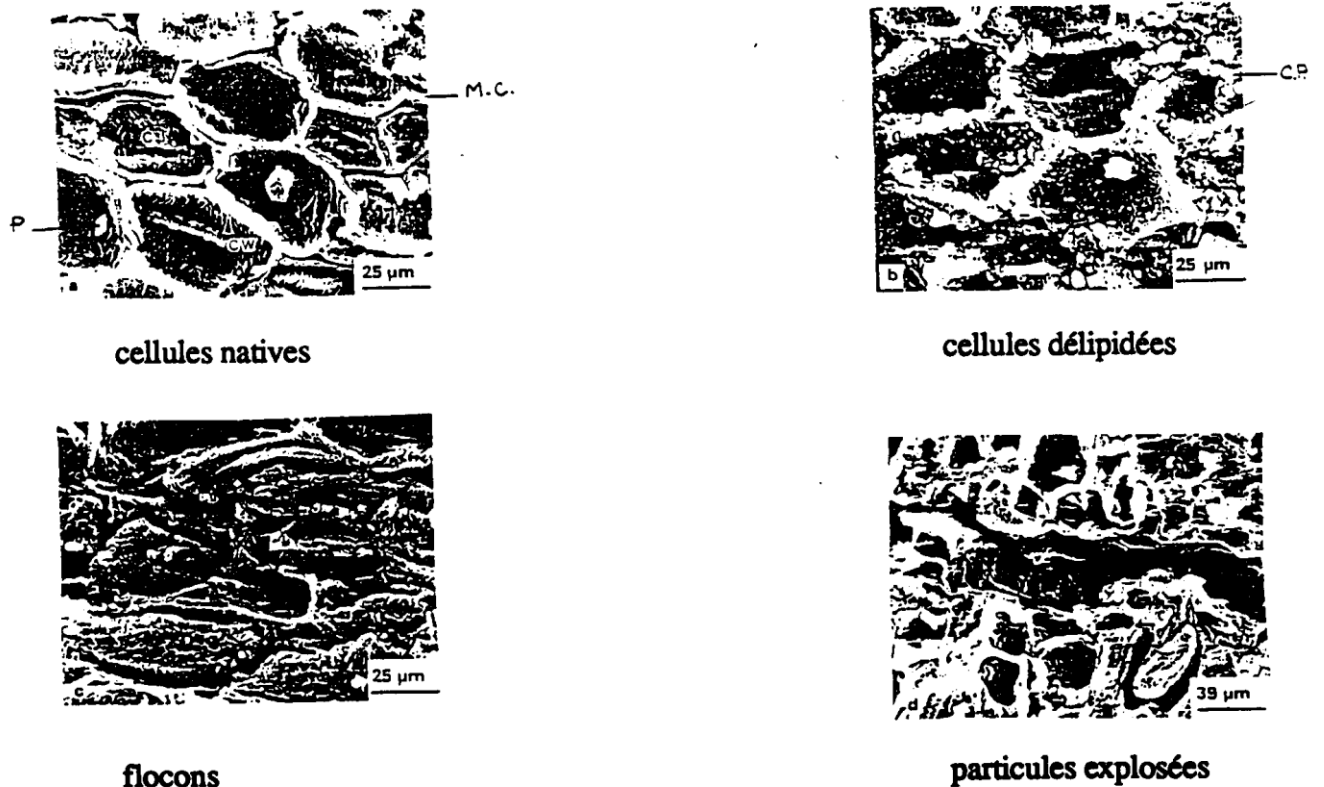


figure 42. Structure microscopique des cellules de cotylédons de lupin cru, délipidé, en flocons ou explosé. Microscopie électronique à balayage (CP corps protéiques, MC membrane cellulaire, P plasmodème)

XI.5.2. Rapport solvant / soluté et vitesse d'agitation

L'extraction des protéines de graines broyées (délipidées éventuellement) en milieu aqueux est généralement réalisée avec un rapport solide / solvant (P / V) voisin de 1/20. Il est évident que toute augmentation de ce rapport qui se traduira par une augmentation de la différence de concentration entre solvant et milieu intracellulaire sera favorable au rendement. Néanmoins, pour des raisons technologiques évidentes (volumes de liquide à maîtriser et à retraiter), le rapport généralement

adopté se situe entre 1/10 et 1/20. Le rendement de l'extractibilité (protéines solubilisées / protéines initialement présentes dans la graine) peut être amélioré en procédant à des extractions successives. La vitesse des transferts augmente avec la vitesse d'agitation. Cependant, si l'agitation est trop importante, des mousses risquent de se former et compromettre l'extraction voire la qualité finale des protéines par dénaturation à l'interface eau/air.

XI.5.3 . Effets des caractéristiques du solvant aqueux

Ce sont essentiellement le pH, la concentration et la nature des sels qui constituent les paramètres essentiels du solvant .

La solubilité d'une protéine donnée en milieu aqueux va dépendre de l'équilibre suivant :



Les conditions qui favorisent les interactions protéine-protéine diminuent la solubilité, tandis que celles qui favorisent les interactions protéine- solvant augmentent la solubilité.

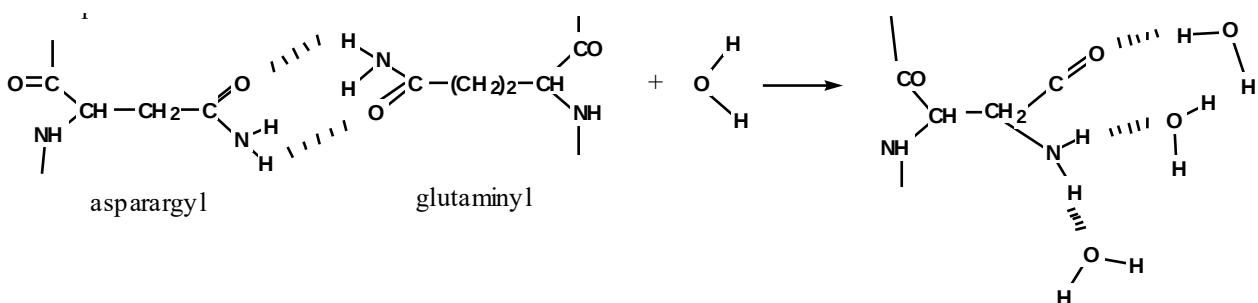
Les forces impliquées dans ces interactions de cet équilibre sont les suivantes :

- protéine - eau : liaisons H, liaisons électrostatiques
- protéine - protéine : liaisons H, interactions électrostatiques, interactions hydrophobes.

Les paramètres agissant sur ces liaisons sont les suivants :

• pour les *liaisons hydrogène*

Les protéines végétales sont riches en résidus de glutamine et d'asparagine qui donnent des liaisons hydrogène entre eux ou avec d'autres molécules comme l'eau.



En milieu aqueux, la formation de liaisons H entre résidus d'amide est moins favorable, du point de vue énergétique, que la formation de liaisons H entre amide et eau. Néanmoins, il est possible que dans les protéines, ces liaisons H entre amide soient coopératives, ce qui conduit alors à une énergie de liaison supérieure à celle qui existerait avec l'eau (système de la fermeture éclair). Dans ce cas, c'est par élévation de la température et en présence d'eau qu'il sera possible de rompre des liaisons amide-amide et d'augmenter les interactions amide-eau , donc la solubilité de la protéine.

• pour les *liaisons électrostatiques*

Ces liaisons interviennent entre les protéines et l'eau mais surtout entre molécules protéiques. Ces liaisons répulsives ou attractives entre groupements ionisés des protéines sont largement fonction du pH et de μ . Si la protéine , molécule amphotère, est chargée (Pr^- à $\text{pH} > \text{pHi}$ et Pr^+ à $\text{pH} < \text{pHi}$) les forces de répulsion électrostatiques ne permettent pas aux interactions hydrophobes ou aux forces de Van der Waals d'intervenir. Il y aura donc une bonne stabilité de leur suspension donc plus grande solubilité. Dans ces conditions les protéines solubles dans l'eau ont leurs groupements hydrophobes (25-30 % du nombre total de résidus) distribués statistiquement davantage vers l'intérieur de la molécule et leurs groupements hydrophiles à l'extérieur au contact de l'eau. La charge nette, fonction du nombre de groupements ionisables, favorise par ailleurs les interactions avec l'eau.

- *pour les interactions hydrophobes*

Il s'agit là des principales forces favorisant les interactions protéine-protéine, donc l'insolubilisation. Ces interactions interviennent au niveau de zones apolaires de surface des protéines. Les forces mises en jeu résultent plus d'effets sur la structure de l'eau autour de ces zones que d'effets attractifs directs par des forces de Van der Waals. Ces interactions augmentent avec la température.

Dans les protéines contenant plus de 30 % de résidus d'acides aminés hydrophobes, il est stériquement impossible que ces résidus se localisent tous à l'intérieur de la structure. De telles protéines présentent alors des zones hydrophobes en surface qui permettent la formation de dimères ou d'oligomères (globulines 7 S ou 11 S). De plus au voisinage de ces zones hydrophobes, les interactions électrostatiques endogènes sont accrues ce qui conduit à l'exclusion de l'eau et à la formation de liaison H entre amides.

Si la protéine présente une charge globale nulle (autant de + que de -), ce qui est observé au pHi, les changements de conformation à ce pH peuvent se traduire par un démasquage de groupes hydrophobes (ou tout au moins par une augmentation de leur accessibilité en surface). En absence de répulsion électrostatique, ces molécules protéiques vont pouvoir se rapprocher. S'il existe en surface des groupements hydrophiles non ionisés (glucides par exemple), ceux-ci fixent beaucoup d'eau et la distance à laquelle peuvent se rapprocher les molécules est relativement grande, les interactions hydrophobes ou de Van der Waals n'interviennent pas, les molécules restent en solution (glycoprotéines). Par contre, si des groupes hydrophobes sont présents en surface, les forces de van der Waals peuvent contribuer à la coalescence des molécules et à leur précipitation. C'est au pHi que les interactions intramoléculaires ioniques sont les plus fortes et la protéine est très "ramassée" sur elle-même, sa masse volumique étant alors la plus élevée.

La **précipitation** des protéines en milieu aqueux sera favorisée

- par démasquage de groupements hydrophobes qui, localisés en surface donneront une tendance à l'aggrégation, donc à la précipitation. Ce démasquage augmente avec la température.
- par minimisation de la charge nette (pHi) pour minimiser les répulsions intermoléculaires (favorisées par diminution de la température)
- par diminution de l'agitation moléculaire (de la température) pour favoriser les contacts moléculaires efficaces .

- *pour les ponts disulfure*

Ces ponts stabilisant des structures quaternaires sont rompus par la chaleur, à des pH supérieurs à 8 ou par des agents réducteurs ou encore par sulfitylolyse.

a) Influence du pH et de la nature des bases

Dans l'eau pure, les molécules protéiques inter-réagissent par des liaisons électrostatiques et sont en général peu solubles. Le pH de cette solution est "bizarrement" qualifié de *point isoionique* .

La solubilité d'une protéine passe par un minimum au pHi. Pour des valeurs de pH supérieures ou inférieures au pHi, la protéine est chargée négativement ou positivement. Ces charges donnent des réactions d'échange avec l'eau, ce qui contribue à la solubilisation, et ce d'autant plus facilement que si les protéines présentes dans une solution à un pH donné possèdent la même charge : effet répulsif.

Pour une protéine donnée, les variations de la solubilité en fonction du pH sont indiquées sur la figure 43. Généralement, la courbe obtenue est en V ou en U, la solubilité minimale étant observée au pHi.

Le paramètre pH est un des principaux paramètres à optimiser lors de l'extraction-purification des protéines à partir de feuilles ou de graines (tourteaux). Avec la plupart des végétaux, la solubilité des protéines est supérieure aux pH alcalins qu'aux pH acides. Ceci résulte du nombre élevé de résidus capables de s'ioniser négativement (COO^- des ASP et GLU) par rapport au nombre de résidus capables de s'ioniser positivement (LYS - ARG - HIS). Généralement une bonne solubilisation est obtenue pour des pH compris entre 7 et 11. Ainsi par rapport à l'azote, le pourcentage d'extractibilité atteint, pour les graines d'oléagineux, des valeurs comprises entre 50 et 95 %. La solubilité des protéines globulaires est celle qui est la moins sensible aux variations de pH .

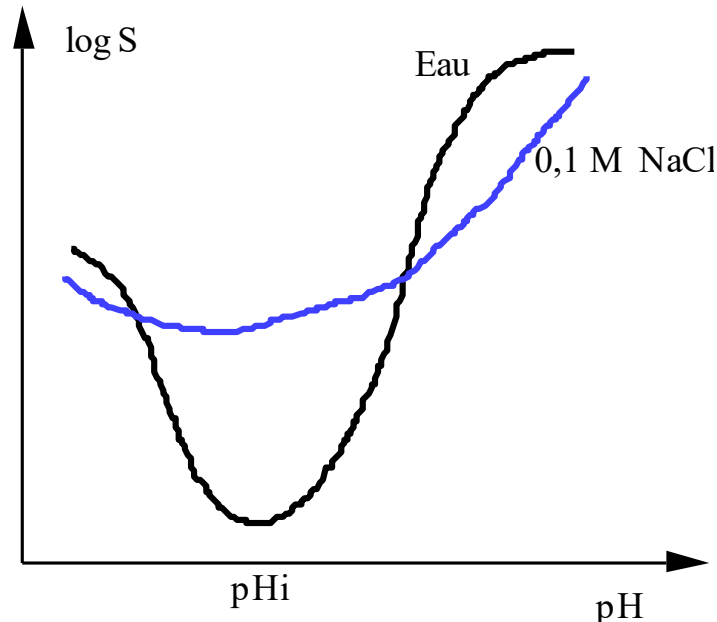


Figure 43. Solubilité des protéines en fonction du pH

Il faut noter ici que lors de la solubilisation à des $\text{pH} > \text{pH}_i$ de la protéine, plus la solubilité de la protéine augmente et plus le pH de la solution a tendance à diminuer, ce qui nécessite un ajustement permanent du pH. Par ailleurs, la solution contenant un mélange d'acides faibles (COOH) et de bases avec leurs sels, un effet tampon apparaît.

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{[\text{base}]}{[\text{acide}]}$$

Les agents d'alcalinisation les plus couramment employés pour solubiliser les protéines à partir de tourteaux de graines de protéagineux sont l'hydroxyde de sodium et à un degré moindre l'hydrogencarbonate de sodium. L'hydroxyde de calcium (ou de magnésium) permet d'éliminer certains composés de la solution tels que les acides polyphénoliques (acide chlorogénique du tournesol) sous forme de sels insolubles (chlorogénates). Cependant l'ion calcium bivalent peut former des ponts intra et surtout interprotéiques, ce qui contribue à abaisser la solubilité des protéines par rapport à un autre agent d'alcalinisation, et ce, pour un même pH. Par ailleurs, les ions Ca^{++} peuvent, par formation de ponts intermoléculaires, contribuer à la formation d'un réseau avec augmentation de viscosité, voire même une solidification (gélification). Pour des pH supérieurs à 8, les ponts disulfure sont plus facilement réduits, ce qui contribue à augmenter la solubilité.

Aux pH supérieurs à 10, des réactions défavorables peuvent apparaître (hydrolyse - isomérisation - oxydations... voir Influence des traitements). A des pH inférieurs à 2, ce sont surtout des réactions d'hydrolyse qui sont susceptibles de se produire.

b) Influence de la force ionique μ . Effets réciproques

La force ionique d'une solution est définie par

$$\mu = 1/2 \sum_i c_i z_i^2$$

avec c concentration molaire et z électrovalence des ions présents.

Les ions salins influencent la solubilité des protéines en fonction de leur concentration dans le milieu selon l'équation de KIRKWOOD (simplifiée) :

$$\log S = \log S_0 + B \sqrt{\mu} - A \cdot \mu$$

dans laquelle S est la solubilité de la protéine

S_0 est la solubilité de la protéine dans l'eau pure à $\mu = 0$

A est une constante qui est fonction de la protéine (r^3 : rayon de la molécule), de la nature du sel, de la constante diélectrique et de la température. A est indépendante du pH.

B est une constante qui est fonction de la nature du sel, de la constante diélectrique et de la température. Généralement on a $B > A$, ce qui conduit à des variations du $\log S$ en fonction de μ comme schématisées sur la figure 44.

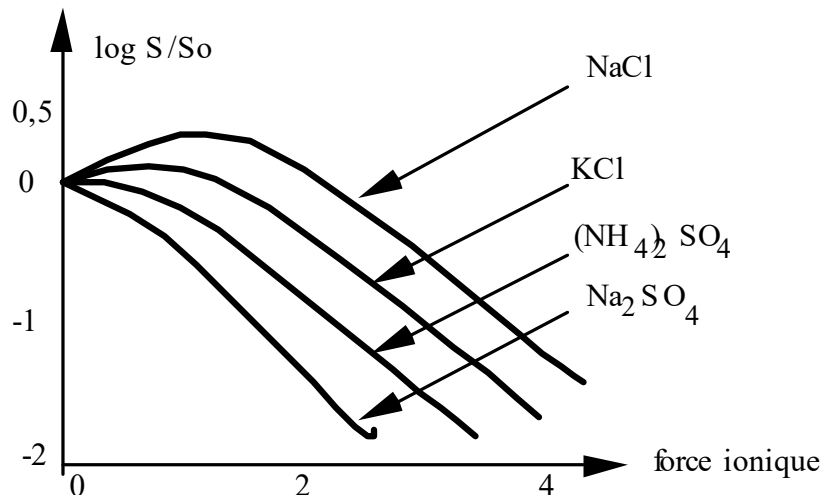


Figure 44. Influence de la force ionique sur la solubilité des protéines (SAB, 20°C)

L'équation de DEBYE-HUCKEL décrit les effets des sels selon :

$$\log S = \log S_0 + \frac{e^3 \cdot z_i^2}{D \cdot K \cdot T \cdot 3/2} \cdot \frac{2 p \cdot N_0 \cdot \mu}{1000}$$

dans laquelle e est la charge, z la valence, D la constante diélectrique, K la constante de Boltzman, N_0 le nombre d'Avogadro.

1. Augmentation de la solubilité : **salting in**

Avec des molécules globulaires ou à l'état dénaturé on constate, pour des molarités comprises entre 0,5 et 1 M, que certains sels (NaCl, LiCl, NaI etc...) augmentent leur solubilité. Les ions réagissent avec les charges des protéines en diminuant les interactions électrostatiques attractives intra ou interprotéiques. De plus ces ions en réagissant avec les protéines fixent moins d'eau, leur sphère de solvation diminue et on a plus d'eau solvante.

La présence de sels affecte les interactions polaires ionisées intra ou interprotéiques ou encore entre les protéines et l'eau. Ainsi en présence de sels monovalents (NaCl par exemple), les interactions intra ou intermoléculaires du type

- $\text{COO}^- \dots \text{NH}_3^+$ (attractives) ou $-\text{COO}^- \dots \text{COO}^-$ ou $-\text{NH}_3^+ \dots \text{NH}_3^+$ (répulsives) vont être fortement diminuées.

S'il s'agit d'interactions intermoléculaires ou d'interactions intramoléculaires masquant des groupements polaires, leur suppression par les sels se traduira par une augmentation de la solubilité dans l'eau. Généralement les interactions entre sels et groupements polaires ionisés impliquent des molécules d'eau. En présence d'ions bivalents et plus particulièrement de cations (Ca^{2+}), il va se former des ponts salins, ce qui conduit à une diminution de la solubilité ou à la formation de réseaux (gels, pâtes).

Il existe des groupements polaires non ionisables au niveau des chaînes latérales de résidus (SER, THR avec OH, GLN et ASN avec CO-NH_2 , TYR avec ϕOH , CYS avec SH) qui sont capables de donner des liaisons hydrogène avec l'eau et contribuer à la solubilisation. Si des interactions de ce type existent dans les protéines, elles sont diminuées par élévation de la température. Ces groupements polaires constituent des dipôles permanents.

2. Diminution de la solubilité : **salting out**

La plupart des sels en solution à des molarités supérieures à 1 M, conduisent à une diminution de la solubilité des protéines qui peut aller jusqu'à la précipitation. Cet effet de relargage résulte de l'affinité compétitive pour les molécules d'eau des groupements polaires de la protéine et des ions salins. Quand la concentration en soluté est élevée, leur solvation est faible. A forte concentration en sel, la sphère de solvation de la protéine diminue et des interactions protéines-protéines peuvent s'établir, ce qui conduit à une agrégation suivie d'une précipitation (figure 45).

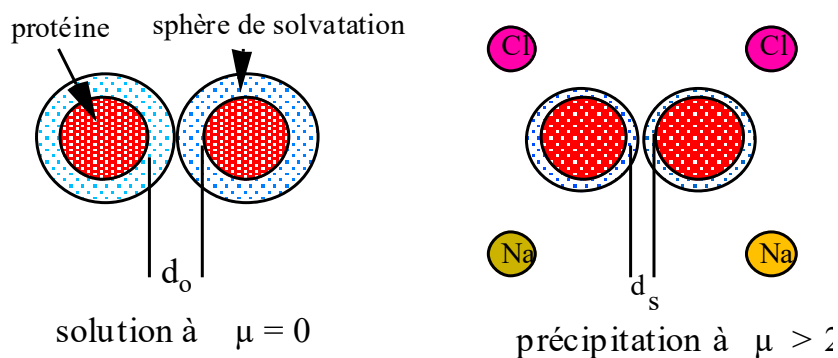


Figure 45. Schéma d'un effet de salting out sur une protéine en milieu aqueux.

A $\mu = 0$, la sphère de solvation des protéines est importante et son épaisseur $d_0/2$ permet aux molécules de se rapprocher à d_0 . Les forces de Van der Waals (cf VIII-2-d) ne deviennent attractives qu'aux faibles distances ($1/d^7$). Séparées par d_0 , l'agitation thermique suffit à maintenir dispersées les molécules protéiques qui restent en solution.

A $\mu > 2$, la sphère de solvation des protéines diminue (de l'eau étant immobilisée autour des ions) et son épaisseur $d_s/2$ permet aux molécules de se rapprocher à d_s ($d_0 > d_s$). Les forces de Van der Waals et les attractions par interactions hydrophobes deviennent supérieures aux forces de dispersion et il se produit une agrégation souvent suivie de précipitation. Il apparaît donc que l'effet de salting out sera d'autant plus élevé que la température de la solution sera faible. Par ailleurs, ces effets de salting out sont à l'origine de la diminution de la température de dénaturation.

c) *Variations des effets réciproques en fonction de la nature des sels*

Les anions et les cations possèdent des effets de salting in ou de salting out qui sont fonction de leur charge et de leur volume. Ainsi plus un ion possède une charge élevée et un volume important, plus il aura tendance à s'hydrater et plus, toutes conditions étant égales par ailleurs, il exercera un effet important de salting out.

HOFMEISTER a classé les anions et les cations en fonction de leurs effets croissants en salting out:

• *pour les anions :*

trichloracétate > citrate > HPO_4^- > SO_4^{2-} > tartrate > SCN^- > ClO_4^- > NO_3^- > acétate > I^- > Br^- > Cl^- > F^-

• *pour les cations :*

Al^{+++} > OH_3^+ > Ba^{++} > Sr^{++} > Ca^{++} > Mg^{++} > NH_4^+ > K^+ > Na^+ > Li^+ .

Cette série qualifiée **de lyotropique ou chaotropique** dépend de l'ion d'accompagnement.

Ainsi, l'effet de salting in obtenu avec un sel comme le NaCl est plus élevé que celui obtenu avec le KCl et inférieur à celui que l'on obtient avec NaF (voir aussi figures 37 et 38).

L'effet des cations est supérieur à celui des anions car ils immobilisent plus d'eau. Les ions situés à droite dans cette série favorisent le déplissement, la dissociation et ceux situés à gauche contribuent au maintien de la forme native.

Selon DAMODARAN et KINSELLA (1982) les effets des ions sur les interactions électrostatiques dans les protéines ne dépendent que de la force ionique, tandis que la nature de l'ion a un effet très important sur les interactions hydrophobes. Ces interactions hydrophobes sont intimement liées à la structure de l'eau et les ions qui modifient cette structure affectent donc la solubilité des protéines.

Les travaux de SHEN (1981) sur les protéines de soja montrent que leur solubilité diminue jusqu'à 0,2 M pour tous les sels (figures 46). Ce phénomène résulte de la "protection" ou du "masquage" des groupements chargés par les sels, ce qui décroît la répulsion électrostatique et augmente de façon apparente les interactions hydrophobes. Au-dessus de 0,15 - 0,2 M la solubilité augmente avec certains sels (salting in) puis diminue avec tous les sels (salting out).

pH et force ionique sont des paramètres de solubilisation étroitement liés. Ainsi à pH = 4,7, pHi des protéines de soja, la solubilité augmente avec la force ionique (figure 40).

Jusqu'à 0,7 M NaCl, la solution protéique est séparée en 2 phases : l'une inférieure concentrée en protéine (coacervat) et l'autre supérieure moins concentrée. Cette augmentation de solubilité résulte d'un effet de salting in. A pH = 2 les groupements ionisables sont sous la forme $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_3^+$. A force ionique nulle, les molécules chargées positivement se repoussent ce qui assure leur solubilisation. Quand la concentration en NaCl augmente, le Cl^- neutralise les charges positives des groupements aminés, ce qui permet aux interactions hydrophobes d'intervenir et de diminuer la solubilité. Au-dessus de 0,7 M en NaCl un léger effet de salting in apparaît, rapidement suivi d'un effet de salting out.

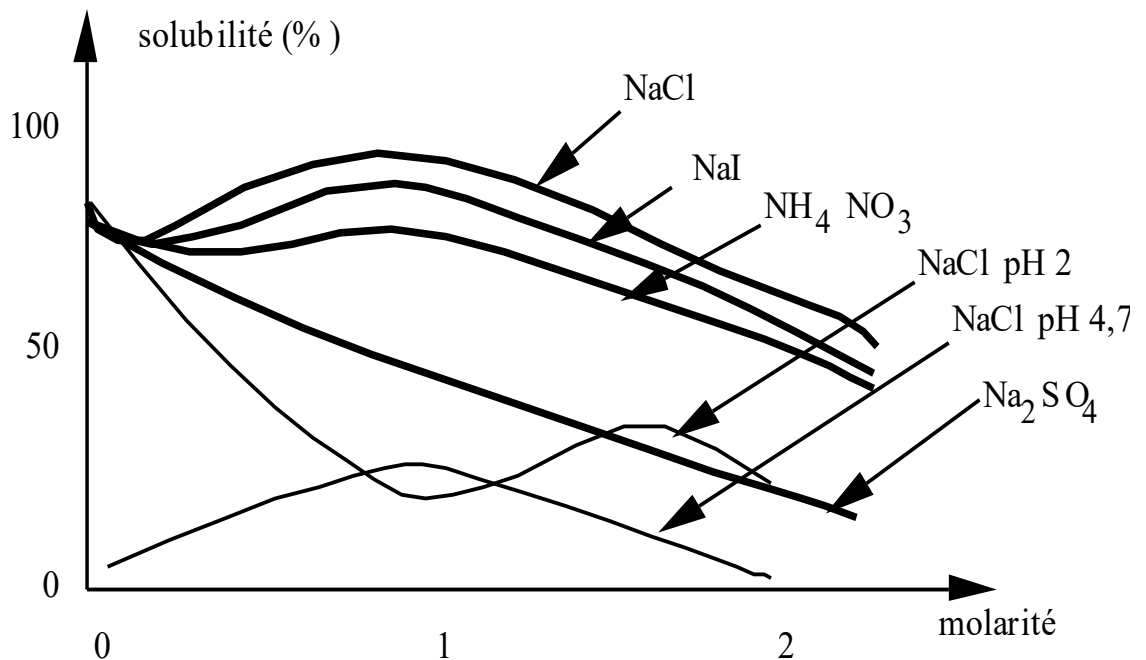


Figure 46. Solubilité des protéines de soja en fonction de la concentration et de la nature de sels. Température 20°C pH = 6,8 (SHEN 1981)

XI.5.4. Influence de la nature, du nombre, de la concentration et de la conformation des protéines sur leur solubilité et leur précipitabilité.

Pour une protéine donnée, la prédominance relative des liaisons hydrogène, hydrophobes ou ioniques inter ou intramoléculaires ainsi que la polarité de surface (exprimée par le rapport groupes polaires / groupes apolaires) conditionnent la solubilité. Pour un rapport groupes polaires / groupes apolaires donné, la polarité de surface est maximale pour des protéines globulaires. Cependant, la taille de la molécule est à prendre en considération: si la masse moléculaire augmente, le rapport groupes polaires / groupes apolaires diminue en surface (le volume d'une sphère étant égal à $\frac{4}{3} \pi r^3$ et sa surface à $4 \pi r^2$, le rapport surface / volume diminue quand le rayon augmente). Cependant, pour un volume donné, la surface peut augmenter si la molécule devient asymétrique. Sinon, des agglomérats (structures oligomériques) se forment à partir du nombre élevé de zones apolaires superficielles accessibles.

La structure quaternaire permet quelquefois aux protéines de rester en suspension colloïdale (dispersion - solution) même sous la forme d'associations volumineuses. Par exemple, les constituants de la caséine ont leur solubilité qui augmente après association: c'est la présence de caséine κ très polaire en surface qui assure la stabilisation de la dispersion. Les protéines de soja ont leur stabilité thermique qui augmente par association d'unités acides et basiques.

Selon leur propriétés de solubilité, les protéines sont classées en albumines, globulines, glutélines et prolamines (cf VIII.6.1). Généralement, des protéines différentes n'ont pas les mêmes solubilités pour une même force ionique et un même pH. Ainsi pour des forces ioniques supérieures à 2, l'effet de salting out observé varie, à un pH supérieur d'environ 2 unités au pHi, en fonction de la masse molaire de la protéine. Ainsi, l'addition fractionnée de sulfate d'ammonium à un mélange de protéines se traduira d'abord par la précipitation du fibrinogène à $\mu = 3$, puis de la globuline à $\mu = 6$, puis de la sérum albumine à $\mu = 8$ et enfin de la myoglobine à $\mu = 10$, les protéines étant éliminées de la solution au fur et à mesure de leur précipitation par centrifugation : c'est la **précipitation fractionnée** (figure 47).

Ce phénomène résulte du fait que l'addition du sel à la solution protéique augmente la force ionique et diminue la quantité d'eau solvante. La sphère de solvation a son épaisseur qui diminue de d à d_1 , les molécules pouvant se rapprocher de $2d$ à $2d_1$. Dans ce dernier cas, la distance $2d_1$ est telle que des attractions peuvent se produire entre molécules, ce qui conduit à leur agrégation puis à leur précipitation.

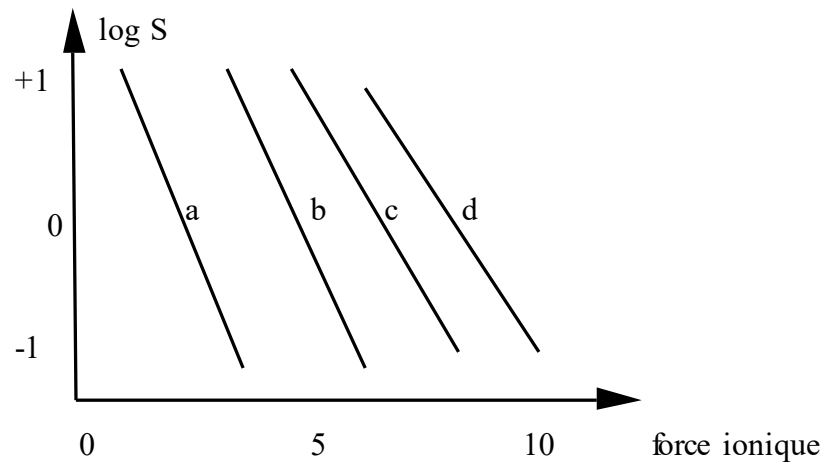


Figure 47. Variations de la solubilité de quelques protéines en fonction de la force ionique en présence de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

S en g/l, $t^\circ = 10^\circ\text{C}$, pH = 6,9

a fibrinogène	PM = 450 000
b globuline	PM = 180 000
c Sérum albumine	PM = 67 500
d myoglobine	PM = 16 800

Quand la concentration en sel augmente, la conformation de la protéine évolue comme si elle se trouvait en milieu moins hydrophile, ce qui se traduit par le démasquage de zones hydrophobes. Pour la plupart des protéines, ce démasquage sera d'autant plus élevé que la concentration en sel du milieu sera grande (figure 48).

Les forces contribuant à la dispersion, donc à la solubilisation des protéines sont liées à :

- des interactions électrostatiques en dehors du pHi. Ces forces diminueront à partir de faibles concentrations en sel par formation de carboxylates ou de sels d'ammonium.
- l'agitation thermique.
- l'hydrophobicité de surface. Si celle-ci est faible, la dispersibilité des protéines dans l'eau, donc leur solubilité, sera élevée.

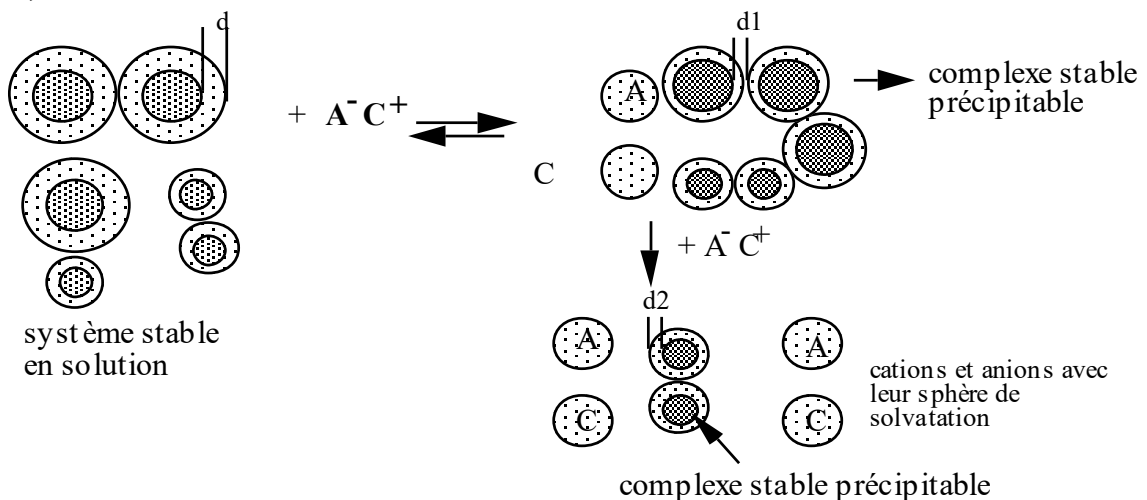
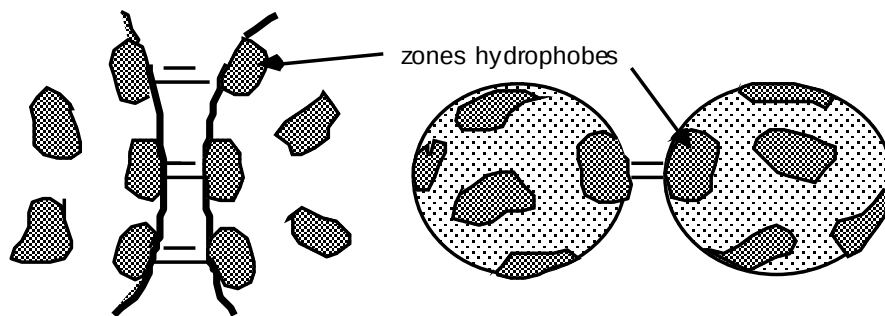


Figure 48. Schéma d'une précipitation fractionnée d'un mélange de 2 protéines en présence d'un sel A^-C^+ .

- au moment dipolaire induit, à l'origine des forces attractives de Van der Waals. Plus la masse molaire de la protéine sera élevée et plus son moment dipolaire induit sera grand. Il en résulte que les forces d'attraction de deux molécules protéiques de masse molaire respectivement égale à m et M seront sensiblement égales à :

$$F_1 = k \frac{1}{T} \frac{M^3}{r^7}, \quad F_2 = k \frac{1}{T} \frac{m^3}{r^7} \text{ avec } F_1 > F_2 \text{ si } M > m$$

Ce sont ces interactions qui, associées aux interactions hydrophobes, contribuent au phénomène de précipitation fractionnée. Il faut signaler que l'attraction liée à l'hydrophobicité sera, pour une densité de surface égale, plus importante pour une grosse molécule que pour une petite.



La solubilité d'une protéine donnée peut être affectée par la présence d'une autre protéine, en particulier quand des phénomènes de saturation sont atteints.

IX.5.5. Influence de la température

La vitesse de solubilisation des protéines suit une loi d'ordre apparent égal à 1 (cf IX.1.a). Dans ces conditions la constante de vitesse est régie par la loi d'Arrhénius et la vitesse de solubilisation augmentera avec la température. Cependant, au cours d'une augmentation de la température, la conformation de la protéine peut subir des modifications (ruptures de liaisons hydrogène, démasquage de zones hydrophobes) qui contribuent à augmenter ou diminuer sa solubilité (figure 49).

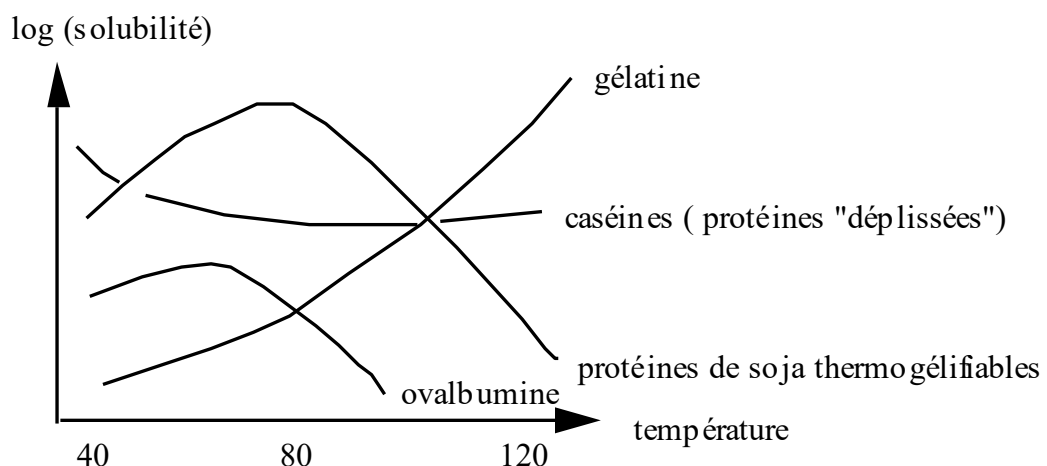


figure 49. Variation de la solubilité de quelques protéines avec la température

La diminution de la solubilité qui résulte de réactions de dénaturation suit une cinétique d'ordre apparent égal à 1. Ainsi, pour une protéine dénaturable dont la solubilité diminue on obtient en fonction du temps et de la température, les solubilités schématisées sur la figure 50.

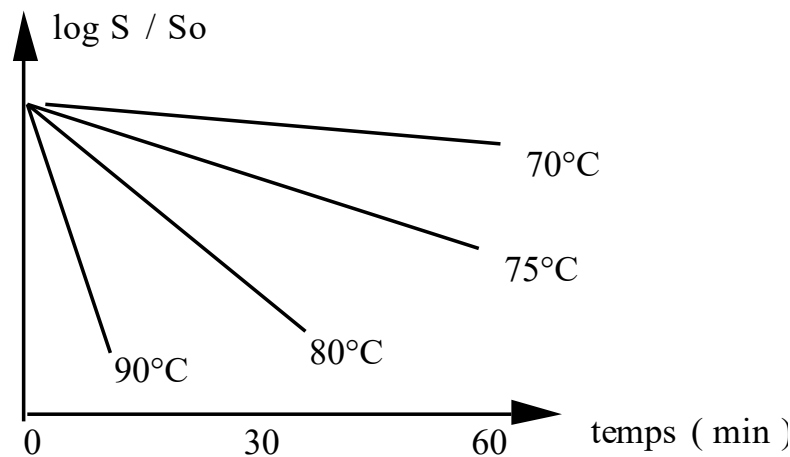


figure 50. Variations de la solubilité du gluten en fonction du temps et de la température (milieu acide acétique dilué)

Pour certaines protéines, la solubilité ne varie pas (ou peu) avec la température car elles sont et restent très insolubles en raison soit d'une hydrophobicité de surface très élevée soit de liaisons covalentes intermoléculaires du type isopeptidique ou de ponts disulfure (élastine, kératine).

D'autres protéines ont leur solubilité qui ne varie pas avec la température (pour des couples temps/température qui n'induisent pas d'hydrolyses); ces protéines sont en général à l'état natif dans une conformation pour laquelle le nombre de groupes hydrophobes en surface ne peut être augmenté (caséinates). Enfin , il existe des protéines qui sont très solubles à l'état dénaturé et pour lesquelles toute augmentation de température se traduit par une amélioration de leur solubilité.

XI.6 . MODIFICATIONS DE LA SOLUBILITE

Des modifications de la solubilité des protéines peuvent être obtenues soit en agissant sur la nature et/ou la composition de la phase solvante, soit en agissant directement sur la protéine en modifiant certaines chaînes latérales de résidus d'acides aminés soit en hydrolysant certaines liaisons peptidiques .

XI.6.1. Par modification de la phase solvante

Les substances qui , en milieu aqueux , provoquent des variations de la constante diélectrique , auront un effet favorable sur la solubilité si D est augmentée et au contraire un effet "précipitant" si D est diminuée. Les interactions de certains solutés qui agissent sur D avec les protéines contribuent également aux variations observées de la solubilité.

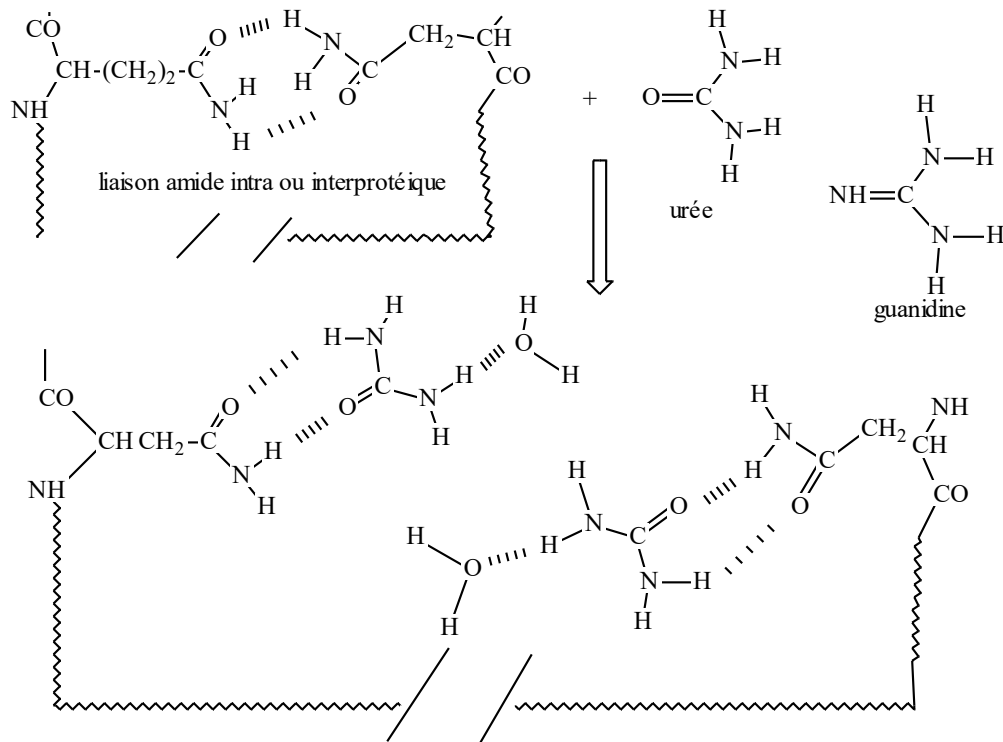
a) Composés modifiant la constante diélectrique

1) L'addition d'urée (ou de guanidine) à de l'eau conduit à une augmentation de la constante diélectrique qui de 80 (eau pure) passe à 130 avec une solution d'urée 6 M. Dans ces conditions les interactions électrostatiques sont diminuées et la protéine démasque des groupes COO^- et NH_3^+ internes, qui s'hydratent et contribuent à la solubilisation.

L'urée contribue, par son moment dipolaire élevé, à la diminution des liaisons hydrogène intra ou inter moléculaires en donnant elle-même ce type de liaison. Ce phénomène est important quand des amides sont impliquées.

L'urée entre en compétition avec les groupements amide, l'équilibre étant déplacé en faveur d'une "fixation" d'urée quand sa concentration est très élevée par rapport à celle de ces groupements. Ainsi "lié" à la structure protéique l'urée peut donner des interactions avec l'eau et donc contribuer à la solubilisation.

Il en est de même avec le chlorhydrate de guanidine dont la structure permet des réactions d'échange de liaisons hydrogène avec les amides et avec l'eau.



2) Le chloro-2-éthanol ($\text{ClCH}_2 - \text{CH}_2\text{OH}$) et l'éthylène glycol

Le chloro-2-éthanol augmente le pourcentage d' α -hélicité des protéines en raison du fait qu'il est moins apte que l'eau à former des liaisons hydrogène. L'eau inhibe la formation de liaisons H intramoléculaires entre résidus d'acides aminés à partir du moment où l'énergie mise en jeu dans la liaison résidu d'acide aminé-eau est supérieure à celle de la liaison qui pourrait s'établir entre résidus de la même molécule.

La constante diélectrique du chloro-2-éthanol est inférieure à celle de l'eau.

Dans le cas du chloro-2-éthanol, l'interaction protéine-solvant passe par un maximum à une concentration en solvant de 30-40 % (v/v). A haute concentration (< 70 %), les interactions protéines-solvant diminuent et l'hydratation est favorisée.

Avec l'éthylène glycol ($\text{CH}_2\text{OH}-\text{CH}_2\text{OH}$), aucune fixation de solvant n'intervient en-dessous de 30 % (v/v) mais à haute concentration des interactions importantes apparaissent. Comme pour le chloro-2-éthanol la formation d' α -hélice est favorisée.

3) Les alcools inférieurs (SCHUBERT et FINN, 1981, Biotechnol. Bioeng.)

Les alcools inférieurs sont utilisés comme agents de purification des protéines par précipitation. Les alcools peuvent être utilisés à large échelle car ils peuvent être facilement recyclés. Les alcools diminuent d'autant plus la constante diélectrique du milieu que leur nombre d'atomes de carbone est élevé et donc leur apolarité élevée (tableau XXII).

A faible concentration, les alcools provoquent une dénaturation forme globulaire pelote statistique. Cependant, à haute concentration et sous l'effet de la température une transition forme globulaire hélice α pelote statistique intervient. La stabilité de la forme intermédiaire a-hélice est d'autant plus grande que la longueur de la chaîne hydrocarbonée est élevée (figure 43). Les effets liés à la dénaturation sont pour la plupart réversibles et plus la masse molaire de la protéine est élevée et plus sa précipitabilité est grande (figure 51).

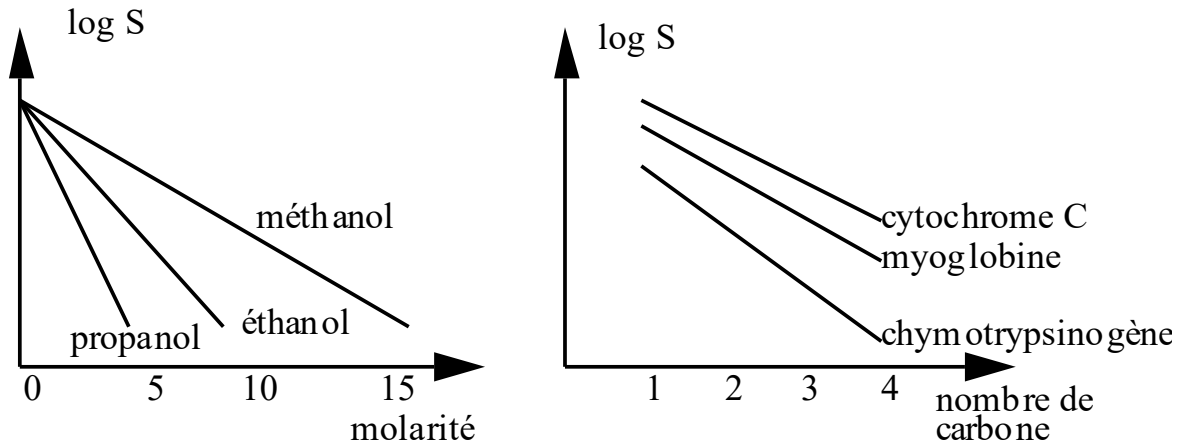


Figure 51. Solubilité des protéines en milieu alcoolique et Corrélation entre la dénaturation et le nombre d'atomes du carbone de l'alcool et la nature de la protéine

La température joue un rôle déterminant dans les phénomènes de dénaturation/précipitation induits par les alcools. La cinétique de précipitation suit un ordre apparent de 1. L'hydrophobicité de la protéine influence également sa susceptibilité à la dénaturation en milieu alcoolique. Ainsi plus une protéine a une hydrophobicité moyenne élevée (mais aussi une hydrophobicité de surface importante) et plus la concentration optimale en alcool pour la précipiter est faible (figure 52).

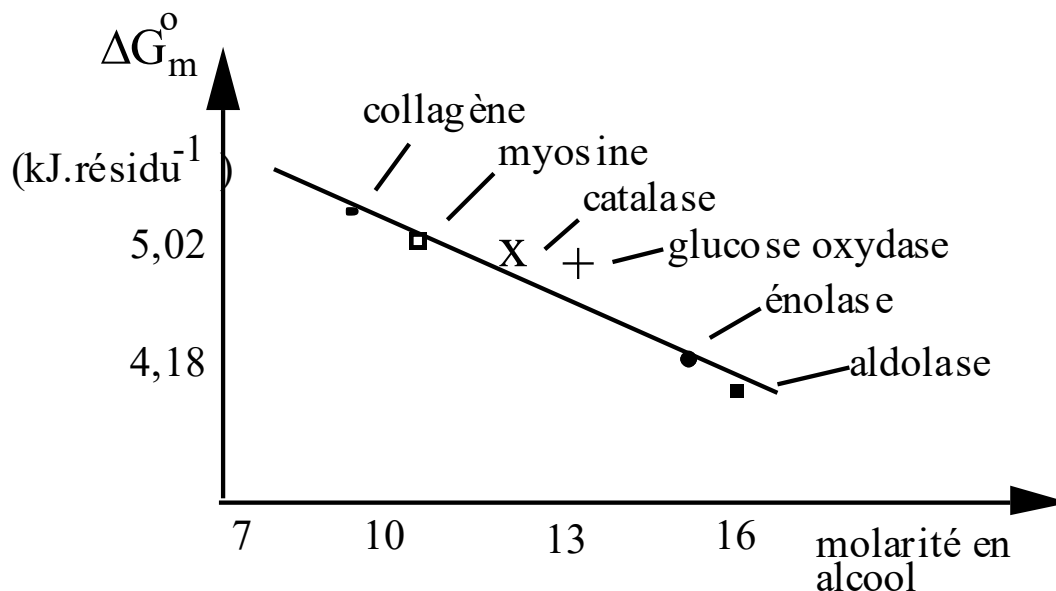
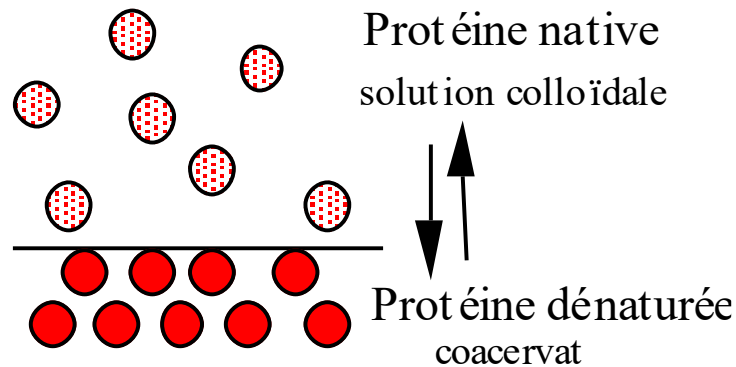


Figure 52. Corrélation entre la susceptibilité à la dénaturation et l'hydrophobicité de quelques protéines.

Pour des teneurs très élevées en alcool, la solubilité de la protéine dénaturée augmente parfois, par interaction entre les groupements hydrophobes démasqués et le solvant.

Phénomène de **coacervation** : si on mélange lentement de l'éthanol à une solution aqueuse de protéine, deux phases apparaissent. La phase supérieure correspond à la solution colloïdale de la protéine native, la phase inférieure au coacervat .



Dans le coacervat, la protéine a subi une dénaturation partielle qui lui permet de rester en solution . L'addition d'alcool augmente la phase inférieure, l'addition d'eau la phase supérieure, la dénaturation partielle étant réversible. Certaines protéines présentant une hydrophobicité de surface importante sont soluble en milieu alcoolique (prolamines).

4) Des **solvants organiques** relativement polaires comme:

- le diméthylsulfoxyde ($\text{CH}_3\text{-SO-CH}_3$)
- ou le diméthylformamide ($(\text{CH}_3)_2\text{C=N-OH}$)

sont des solvants de protéines relativement hydrophobes.

D'autres solvants miscibles à l'eau, comme l'acétone ($\text{CH}_3\text{-CO-CH}_3$) ou le dioxane (1,3 ou 1,4 dioxane) sont, comme les alcools, utilisables dans le fractionnement des protéines.

L'effet solubilisant ou dénaturant des solvants dépend donc de la nature de la protéine mais aussi de son ionisation et de la température.

b) Composés amphipolaires

Les molécules protéiques possédant à la fois des zones hydrophiles et des zones hydrophobes, l'addition au milieu solvant aqueux de substances amphipolaires augmente généralement leur solubilité. Ces substances "tensioactives" donnent des interactions hydrophobes d'abord avec les chaînes latérales des résidus d'acides aminés hydrophobes situés en surface puis avec les chaînes latérales hydrophobes de l'ensemble de la molécule protéique. Si la partie polaire de cette substance est ionisée au pH de la solution (groupements sulfonates à pKa très bas par exemple) un très grand nombre de charges négatives sont apportées à la molécule protéique qui se comporte alors comme un très gros anion (très soluble dans l'eau).

Les effets répulsifs de ces charges entraînent des modifications de conformation par suppression des liaisons initiales intra ou intermoléculaires ioniques, hydrogène et hydrophobes. Seules les liaisons par pont disulfure ne sont pas affectées par la présence à concentration élevée de ces composés amphipolaires. Ces molécules sont à la fois *hydrophiles* par des groupes polaires ionisés (COO^- , $-\text{NH}_3^+$, $-\text{SO}_3^-$) ou non (alcools ou polyols) et *hydrophobes* généralement par une chaîne aliphatique.

Le **SDS** (dodécyl sulfate de sodium) est l'exemple même de ce type de composants. Sa structure $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_{11}\text{-OSO}_3^- \text{Na}^+$ comporte une partie hydrophobe en C_{12} et une partie hydrophile avec un groupement sulfonate. Il est possible de faire réagir de grandes quantités de SDS avec les protéines,

ces quantités variant avec le nombre de résidus hydrophobes. Généralement, une protéine “moyenne” fixe de 1,2 à 1,4 g de SDS par g.

D’autres molécules “détergentes” peuvent contribuer à augmenter la solubilité des protéines en “transformant” ses zones hydrophobes en zones polaires ionisées ou non.

c) **précipitants ou co-précipitants**

De nombreux composés possèdent la propriété de précipiter les protéines. Parmi les plus importants ou les plus utilisés on peut signaler :

- les **métaux lourds** qui pour la plupart d’entre eux réagissent avec les thiols et forment des complexes insolubles avec les protéines. La formation de ces complexes dépend beaucoup de la température, du pH et de la force ionique. Le chlorure mercurique et le nitrate d’argent forment un précipité volumineux qui ne peut être redissous dans un excès de réactif. Le sulfate de cuivre et le chlorure ferrique forment avec les protéines des précipités qui ne peuvent être redissous dans un excès de réactif. L’utilisation de ces métaux lourds et de leurs sels n’est évidemment envisageable qu’à des fins analytiques en raison de leur toxicité.

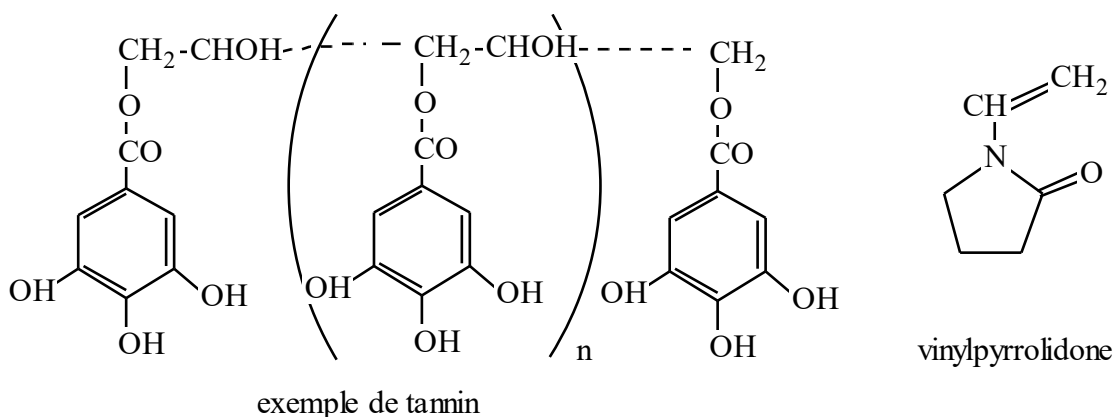
- les **réactifs des alcaloïdes** (acide trichloracétique, acide tannique, acide phosphotungstique, acide phosphomolybdique) peuvent précipiter la plupart des protéines quand le pH est inférieur au pHi. Ces composés ne sont utilisables qu’à des fins analytiques.

Avec l’acide trichloracétique une précipitation pseudo-fractionnée peut être réalisée. Aux faibles concentrations, les protéines de masse moléculaire élevée précipitent les premières, tandis que les protéines ou polypeptides de masse moléculaire faible ne seront précipitables qu’à concentration élevée: très approximativement on admet qu’une solution de TCA à 10 % (P/V) permet la précipitation des protéines dont la masse moléculaire est égale ou supérieure à 10 000 daltons.

- les **coprécipitants**. Il s’agit le plus souvent de polymères porteurs de nombreux groupements polaires ionisables ou non capables de donner de nombreuses interactions plus ou moins réversibles en fonction du pH ou de la température.

Le polyacrylate (acide acrylique : $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{COOH}$), le polyuronate, la carboxyméthylcellulose, les alginates ou les polyphosphates se fixent sur les protéines par liaisons ioniques à un pH où ces composants sont chargés négativement ($\text{pH} > \text{pKa}$ des groupes ionisables) et les protéines chargées positivement ($\text{pH} < \text{pHi}$). Si le polymère anionique est insoluble il est récupérable par centrifugation, la protéine pouvant ensuite être dissociée du complexe à un pH supérieur à son pHi. Si le polyélectrolyte reste fixé à la protéine (polyphosphate), il confère à l’ensemble des propriétés de rétention d’eau, de solubilité souvent remarquables.

Les tannins et la polyvinylpyrrolidone coprécipitent les protéines en formant avec elles de nombreuses liaisons hydrogène .



XI.6.2. Par modification chimique de la protéine

a) Modification de la solubilité de la protéine en phase aqueuse

1) Greffage de groupements polaires

La solubilité d'une protéine peut être améliorée par greffage de groupements polaires ionisables ou non.

La **phosphorylation** des fonctions OH des résidus de sérine d'une protéine par POCl_3 conduit généralement à une amélioration de la solubilité à son pHi (quand celui-ci est compris entre 4 et 5,5). Aux pH pour lesquels l'ionisation des groupements phosphate diminue, la solubilité de la protéine phosphorylée baisse (figure 53).

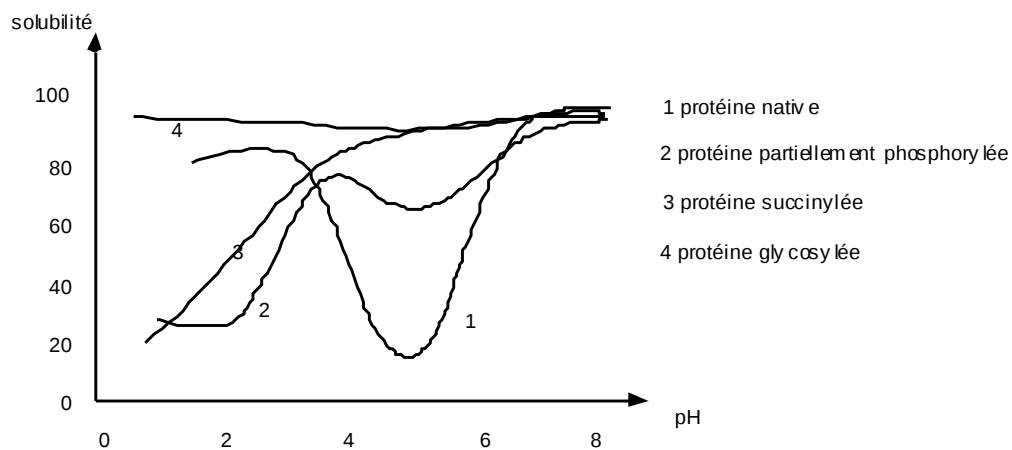
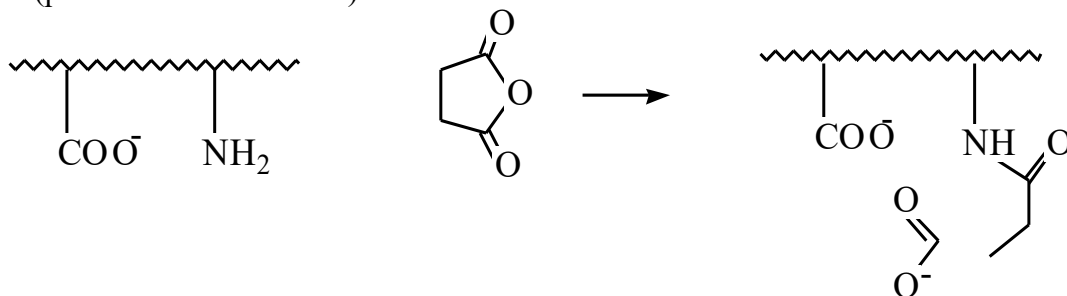


figure 53. Influence des modifications chimiques d'une protéine sur sa solubilité en fonction du pH

La **succinylation** ou la **maléylation** par les anhydride succinique ou maléique des ϵNH_2 des résidus de lysine permet l'incorporation d'autant de groupements carboxyliques qu'il y a des groupements aminés (pour une réaction totale).



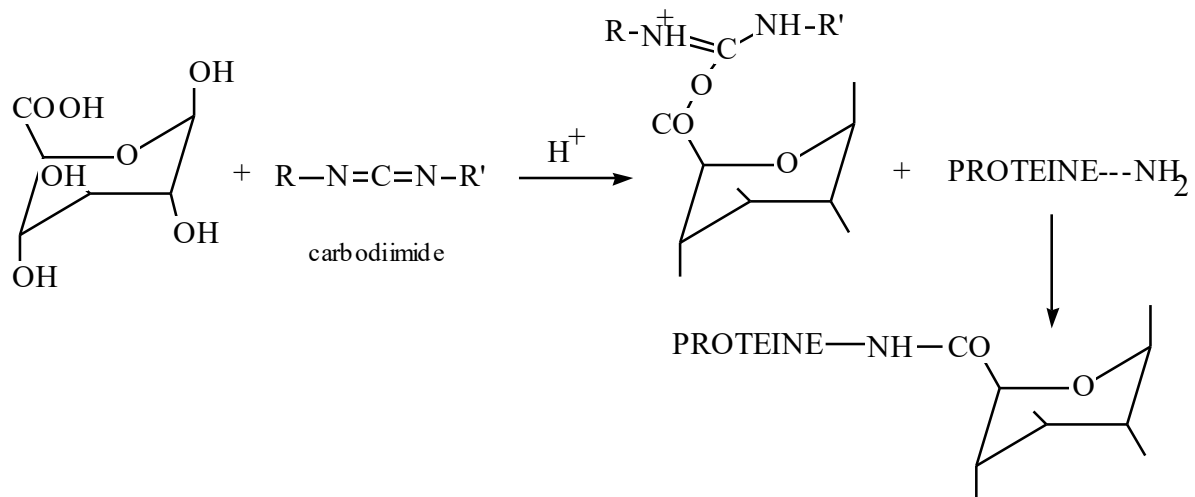
La disponibilité de la lysine n'est pas affectée (ou peu) par le traitement car la liaison isopeptidique formée est digestible *in vivo*. Par contre le pHi de la protéine est très abaissé et sa solubilité reste élevée à des pH supérieurs aux pKa des groupements carboxyliques des chaînes latérales.

Le traitement par d'autres anhydrides (anhydride acétique par exemple) conduit aussi à des réactions de condensation, surtout au niveau des résidus de lysine, avec "substitution" d'un groupe chargé positivement par un groupe apolaire.

Le greffage de groupements *polaires non ionisables* (**glycosylation** par exemple) conduit à des "glycoprotéines" dont la solubilité est pratiquement indépendante du pH. Il existe actuellement

deux méthodes permettant de réaliser ce type de greffage : l'alkylation réductrice et la méthode au carbodiimide.

Dans la méthode au **carbodiimide** (qui est un produit toxique du fait même de ses propriétés), un acide polyhydroxylé du type acide uronique est traité en milieu acide par du carbodiimide. Le dérivé actif formé est alors capable de se condenser avec les groupements ϵNH_2 et αNH_2 par une liaison isopeptidique ; la protéine ainsi "polyhydroxylée" possède une très grande solubilité.



Dans **l'alkylation réductrice**, les glucides réducteurs sont fixés sur les groupements aminés des résidus de lysine grâce à une réaction de Maillard limitée à la formation de la base de Schiff, base qui est alors réduite par du borohydrure de sodium par exemple. Le produit réduit est stable et la protéine ainsi glycosylée a une solubilité pratiquement constante quel que soit le pH du milieu. Par ailleurs, par un choix judicieux du glucide réducteur employé il est possible de moduler la solubilité mais aussi la viscosité ou encore les propriétés de surface.

2) Hydrolyse de ponts disulfure

De nombreuses protéines ont une structure tertiaire "compacte" avec des groupements polaires ionisables ou non enfouis au coeur même de leur structure et d'autres ont des structures quaternaires difficilement dissociables en raison de la présence de ponts disulfure. Les substances réductrices susceptibles de réduire ces ponts en thiols favoriseront donc la solubilité. De nombreux réducteurs "puissants" tels que le β -mercaptoéthanol ($\text{HS-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$) ou le dithiothréitol ($\text{HS-CH}_2\text{-CHOH-CHOH-CH}_2\text{-SH}$) permettent une réduction "totale" des ponts disulfure; cependant leur toxicité interdit leur utilisation pour des protéines alimentaires.

Parmi les composés aptes à rompre les ponts S-S utilisables (ou soumis à une réglementation) en technologie des protéines, le sulfite (SO_2) occupe une place de choix. La **sulfitolyse** des ponts disulfure conduit à la formation de dérivés S-sulfonés (S-SO_3^-). Parmi les autres substances réductrices on peut signaler la cystéine, le glutathion ou encore l'acide ascorbique.

L'hydrolyse des ponts disulfure peut être obtenue en milieu alcalin, un effet significatif étant observé pour des pH supérieurs à 8 ; il se forme des dérivés du type -S-S-.

3) Hydrolyse partielle

La diminution de la masse molaire par hydrolyses chimique ou enzymatique partielles augmente généralement la solubilité des protéines. Chaque hydrolyse d'une liaison peptidique libère en effet deux groupements polaires ionisables (NH_2 et COOH) et la diminution de taille facilite la dispersion dans la phase aqueuse solvante. Certaines protéines "insolubles" comme la plupart des

protéines myofibrillaires, les kératines, certaines protéines végétales ne sont solubilisables que par cette technologie.

Cependant certaines hydrolyses très limitées peuvent conduire à une précipitation. Ainsi la coagulation de la caséine micellaire par la présure ou du fibrinogène par la thrombine est obtenue après libération d'un peptide très hydrophile, le « reste » de la molécule présentant alors une hydrophobicité de surface ne permettant pas son maintien en solution. Parfois, le peptide libéré est très hydrophobe et n'est pas soluble (la précipitation des peptides fixants l'hème de l'hémoglobine permet la décoloration de la protéine).

Dans le cas de l'**hydrolyse chimique partielle**, c'est l'acide chlorhydrique qui est le plus souvent utilisé (HCl N, 50 à 85°C, 1 à 24 heures); sa neutralisation par l'hydroxyde de sodium conduit à la formation de chlorure de sodium dont la présence dans l'hydrolysate après séchage peut en limiter l'utilisation. Une hydrolyse exhaustive est réalisable en milieu HCl 6 N à 110°C pendant 24 à 72 heures. Dans ces conditions, les liaisons peptidiques sont toutes hydrolysées mais des résidus d'acides aminés sont détruits.

L'**hydrolyse enzymatique partielle** est une technologie au cours de laquelle les paramètres suivants doivent être maîtrisés :

- le choix de l'enzyme au niveau de son coût et la possibilité de son recyclage si le système ou l'autolyse le permettent, de son activité, de sa stabilité, de sa spécificité et de son comportement à la température et au pH.
- le choix des paramètres de travail (rapport protéase/substrat, temps, température).
- limitation de la formation de produits indésirables et des développement microbiens.

b) Diminution de la solubilité par fixation d'acides gras

Le principe de la fixation est comparable à celui de la méthode au carbodiimide. Il est possible de greffer des acides gras en utilisant des chlorures d'acide ou encore par voie enzymatique, la difficulté dans ce dernier cas étant la solubilité des réactants.

XI.7. APPLICATIONS ET MESURE DE LA SOLUBILITE

La solubilité est une propriété particulière à chaque protéine qui est susceptible de varier en fonction de nombreux paramètres en particulier au cours de traitements technologiques. Cette propriété est relativement facile à déterminer et dépend de nombreux paramètres parmi lesquels la conformation même de la molécule joue un rôle prépondérant.

Quand il existe une bonne corrélation entre la solubilité d'une protéine et une autre propriété fonctionnelle intéressante (pouvoir moussant, pouvoir gélifiant etc) on doit conserver cette mesure comme critère de choix car il s'agit d'une mesure relativement plus facile à réaliser que les autres estimations.

La conformation d'une protéine donnée peut changer extrêmement lentement par infime modification. Il n'est donc pas rare qu'une protéine parfaitement définie (structure / propriétés) donne naissance à des populations moléculaires ne présentant pas les mêmes propriétés en particulier de solubilité. Il apparaît donc nécessaire de définir parfaitement les conditions expérimentales de mesure (température, temps, système d'agitation, rapport soluté/solvant, pH, force ionique, conditions de centrifugation, etc.) pour obtenir une reproductibilité et une précision suffisantes. Enfin, la méthode de mesure choisie peut conditionner la valeur absolue du résultat (Biuret, Lowry, Kjeldahl, UV etc).

XI.7.1. Mesure de la solubilité

La vitesse de solubilisation (et de précipitation) d'une protéine n'est jamais instantanée et suit une cinétique d'ordre apparent égal à 1: il est donc impossible de déterminer une solubilité maximale.

La mesure proprement dite est réalisable selon la séquence suivante : une quantité connue de protéine est mise en suspension dans un volume donné de solvant (par exemple 0,01 à 1 g dans 100 ml d'eau ou d'une solution tampon quelconque), à une température choisie et avec un système d'agitation bien caractérisé (par exemple erlenmeyer de 250 ml à col large, barreau aimanté de 25 mm, 100 tours minutes). Après un temps de solubilisation précis (10 min par exemple), la suspension/solution est centrifugée (préciser le volume et la forme des tubes, la nature du rotor et son rayon , la vitesse et donc le nombre de g, la température et le temps). La quantité de protéines est alors mesurée dans le surnageant par une méthode appropriée (cf dosage des protéines). La quantité initiale de protéine peut être estimée sur la suspension de départ après une bonne homogénéisation suivie d'un dosage.

Les résultats peuvent être exprimés en :

- **indices de solubilité de l'azote ou des protéines** : il s'agit respectivement des rapports azote soluble / azote total ou protéines solubles / protéines totales.
- **Azote ou protéines solubles** : il s'agit respectivement des quantités exprimées en g d'azote ou de protéines solubles pour 100 g de solution.
- **Index de dispersibilité de la protéine** (IDP) : il ne s'agit pas d'une mesure de solubilité stricte mais d'une mesure des protéines effectivement solubles mais aussi de celles mises en suspension; l'IDP est exprimé en g de protéines dispersibles pour 100 g de protéine.

La solubilité d'une protéine donnée peut également être présentée en fonction du pH, de la force ionique, de la température etc. Il n'existe pas actuellement de méthode de référence ou officielle de mesure de la digestibilité et les résultats peuvent donc varier en fonction des conditions de mesure. Pour s'assurer de la reproductibilité de la méthode de mesure choisie, il est souvent très utile de disposer d'une protéine de référence.

L'expression des résultats en **"relatif"** comme l'indice de solubilité peut conduire à des appréciations erronées de la solubilité. Par exemple si la solubilité de deux protéines Pr1 et Pr2, exprimée en protéines solubles atteint, pour des pH supérieurs aux pH_i , des valeurs très différentes et respectivement égales à 5 g et 1 g pour 100 g de solution (figure 54), les indices de solubilité mesurés sur des suspensions à 0,5 g pour 100 g sont relativement proches.

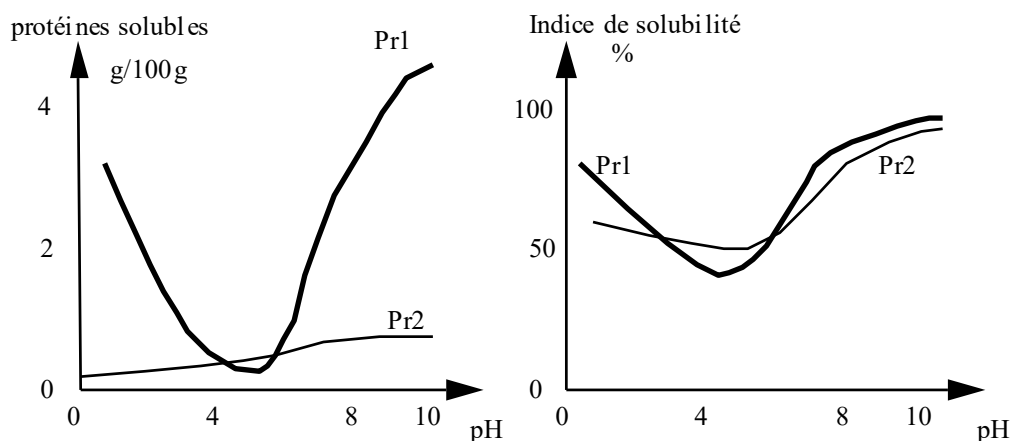


figure 54. Variations de la solubilité et de l'indice de solubilité de deux protéines (mesuré sur une suspension à 0,5 g/100g) en fonction du pH.

XI.7.2. Applications des mesures de la solubilité

La solubilité est une des *propriétés fonctionnelles* les plus importantes des protéines alimentaires (cf chapitre Propriétés Fonctionnelles). Une bonne solubilité des protéines est souvent nécessaire à l'expression d'autres propriétés comme les propriétés gélifiantes, moussantes ou encore émulsifiantes. En effet, elle permet une bonne dispersion des molécules protéiques et facilite ainsi la diffusion vers des interfaces eau / air ou eau / huile et la formation d'un film interfacial homogène : pour posséder un pouvoir moussant ou émulsifiant la protéine se doit donc d'abord d'être soluble dans la phase aqueuse. Pour que les propriétés de rétention d'eau ou de gélification apparaissent, il est très souvent nécessaire de procéder, après la mise en solution, à une modification de conformation qui permet des échanges intermoléculaires (dénaturation) et avec l'eau.

La solubilité d'une protéine donnée constitue également un *bon critère de pureté*.

La mesure de la solubilité permet au cours de l'extraction ou de la purification, un suivi des rendements et permet donc la mise en place d'une technologie dans laquelle ces rendements sont optimisés.

XII. ULTRAFILTRATION, ELECTRO-ULTRAFILTRATION (cf cours STIA1)

L'intérêt de l'ultrafiltration est double car cette technologie permet à la fois une concentration par rétention des protéines et leur purification par élimination dans le filtrat de petites molécules.

La récupération des protéines solubilisées peut être obtenue par ultrafiltration tangentielle en utilisant des membranes minérales multitubulaires en alumine par exemple. La rétention de la protéine, qui dépend de la porosité, peut atteindre d'excellentes valeurs. Le problème majeur posé par cette technologie est la formation d'une couche de polarisation qui limite le débit de perméation et augmente la pression.

Pour éviter cette couche de polarisation de nombreux systèmes ont été imaginés, le plus prometteur étant l'électro-ultrafiltration, système dans lequel la membrane rendue conductrice est chargée identiquement à la protéine pour la repousser, une électrode centrale étant alors chargée de façon opposée à cette même protéine.

XIII. PURIFICATION PAR CHROMATOGRAPHIE (cf cours Protéines STIA1)

La chromatographie d'exclusion est utilisable pour purifier des protéines, mais c'est surtout la chromatographie d'échange d'ions qui a trouvé des applications industrielles.

Le procédé *Sphérosil* repose sur l'emploi d'une phase stationnaire mise au point par la Société Rhône Poulenc. L'élution est obtenue par de l'ammoniaque qui doit être éliminée par traitement thermique.

XIV. SECHAGE DES PROTEINES

Les protéines purifiées à partir des graines sont en général associées à de grandes quantités d'eau qu'il faut éliminer pour stabiliser le produit final, réduire son volume et augmenter sa facilité d'emploi. Toutefois, les concentrés ou isolats protéiques sont "extrêmement fragiles" et la technique de séchage adoptée doit permettre de conserver au produit fini sa valeur nutritionnelle

mais surtout ses propriétés fonctionnelles. Cette nécessité exclut l'emploi de sécheurs "agressifs" du type Hatmaker et ne laisse place qu'à la lyophilisation et à l'atomisation. Le coût d'une lyophilisation est trop élevé pour permettre son utilisation dans le séchage de produits en principe très peu coûteux comme devraient l'être les protéines végétales.

Il ne faut pas perdre de vue que l'atomisation particulièrement coûteuse et vorace en énergie sera la principale raison de la différence de prix entre une farine séchée avec un appareillage relativement simple et un isolat protéique séché par atomisation et destiné à l'alimentation humaine.

Généralement, lorsque l'extrait protéique purifié se trouve en solution, il est d'abord concentré avant d'être atomisé, l'évaporation consommant une dizaine de fois moins d'énergie que l'atomisation.

Si on estime à 5,5 kJ par kg d'eau éliminée la consommation énergétique spécifique d'un atomiseur la fabrication d'un produit sec à 4% d'eau et dont la pureté protéique est de 90 % à partir d'une solution à 12% de matière sèche nécessite 43,9 kJ par kg de protéine. Si on estime à 0,55 kJ par kg d'eau éliminée la consommation énergétique spécifique d'un concentrateur, la concentration de l'extrait à 12% de matière sèche initiale jusqu'à 50 % puis son séchage par atomisation jusqu'à 4 % de matière sèche ne nécessitera que 9,6 kJ par kg de protéines séchées. Actuellement la vaporisation dans la tour d'atomisation est obtenue par un système de buses délivrant leur microgouttelles à contre courant du flux d'air chaud. Les températures entrée / sortie sont voisines de 180 / 80°C.

XV. DOSAGES DES PROTEINES

Le dosage des protéines dans les produits alimentaires est souvent utile ou nécessaire pour les principales raisons suivantes : la première est de satisfaire à une législation (la teneur et la nature des protéines de nombreux produits sont réglementées), la deuxième est d'ordre économique (les protéines représentent 13 % du poids frais d'une viande et 90 % de sa valeur marchande), la troisième d'ordre économique et nutritionnel et la dernière est de disposer de méthodes d'évaluation des rendements d'extraction de ces macromolécules ou encore de pouvoir mesurer leur solubilité.

Sur un plan analytique (tableau 37), il est possible de doser des polymères d'une façon globale quelque soit leur nombre et leur nature soit :

- par une mesure gravimétrique directe quand leur isolement est possible (*gluten*)
- par l'évaluation d'un de leur composant élémentaire et "spécifique" comme l'azote
- directement en utilisant certaines de leurs propriétés chimiques (liaison peptidique, acides aminés aromatiques, fonctions aminées ou amidées etc.) ou physiques (méthodes spectroscopiques IR ou UV ou X, turbidimétriques, fluorimétriques, RMN)
- soit après hydrolyse et analyse des acides aminés.

Il est possible de procéder à une analyse plus fine et relativement rapide des différentes protéines (solubles) d'un produit après séparation électrophorétique ou chromatographique suivies d'un dosage.

Parmi toutes les méthodes existantes, aucune ne donne un résultat instantané puisque l'on ne connaît pas encore de capteurs spécifiques à protéines. Néanmoins, les améliorations de certaines techniques (IR) permettent d'abaisser le temps de réponse à moins d'une minute. En dehors de la rapidité, le choix de la méthode dépendra d'autres facteurs comme la capacité d'équipement, la qualité des résultats attendus ou encore des facteurs économiques.

Tableau 37. Principales méthodes de dosage des protéines et propriétés mises en jeu

<u>Méthode pondérale</u>							
<u>Dosage de l'azote</u>	+	+++	N liaison peptidique			+	
<u>Propriétés chimiques</u> Biuret Folin DBC Azote amidé Sørensen	+++	+++	liaison peptidique N terminal +++	+++	+	+/-	++
<u>Propriétés physiques</u> UV 280 nm fluorescence turbidimétrie réfractométrie spectroscopie X RMN IR			absorption de la lumière - diffusion mesure de l'émission d'électrons mobilité de Cu fixé dans un champ magnétique alternatif vibration des molécules et de leurs liaisons	+	+++ +++		

FPLC , Analyse des acides aminés , électrophorèse

XV.1. PRINCIPALES METHODES DE DOSAGE

Dans les produits alimentaires et en particulier dans les graines protéagineuses et les produits dérivés, les protéines peuvent être présentes :

- soit en solution (milieu d'extraction , boissons etc.)
- soit dans des états physiques très variés (gels, pâtes, poudres, cristaux etc.).

Il est donc évident que pour une protéine donnée, dans un milieu donné (il faut souvent tenir compte des composants associés à ces protéines et susceptibles de gêner leur dosage), toutes les méthodes existantes ne seront pas forcément applicables et que le choix de la méthode dépendra de nombreux facteurs parmi lesquels le rapport qualité/prix de l'analyse sera déterminant.

XV.1.1. Méthode gravimétrique

Il s'agit, dans cette méthode, d'extraire puis de peser les protéines. Malheureusement les applications sont peu nombreuses en raison de l'impossibilité d'extraire de façon quantitative les protéines de leur localisation.

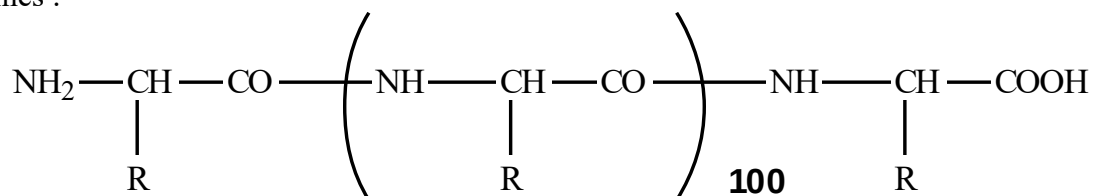
La seule analyse gravimétrique des protéines existante est celle du gluten au moyen de l'appareil GLUTOMATIC : la farine est malaxée dans de l'eau pour extraire les composants hydrosolubles et l'amidon. Le résidu est rapidement pesé et séché.

XV.1.2. Dosage de l'azote total

Il s'agit là d'une méthode indirecte qui est la plus utilisée pour doser les protéines. Des améliorations considérables lui ont été apportées au cours de ces 20 dernières années, ce qui s'est traduit par une diminution très importante du temps d'analyse.

L'azote est ici considéré comme l'élément chimique presque exclusivement apporté par les protéines, bien que la fraction azotée non protéique soit parfois non négligeable.

Le **rapport protéines / N total** est une constante pour une protéine déterminée ou pour un mélange constant de protéines (lait, soja, blé etc.). Ce rapport (*facteur de conversion*) est connu pour la plupart des produits alimentaires. Un exemple de calcul de ce coefficient montrant l'extrême variation possible d'un produit à un autre est donné ci-après pour une protéine de 102 résidus d'acide aminés :

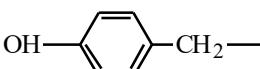


R = H (GLY)

poids moléculaire : 5832

masse d'azote : 1428

Coefficient : **4,08**

R = 
11,6

poids moléculaire : 16644

masse d'azote : 1428 Coefficient :

R = NH₂-C-NH-(CH₂)₃-
3,10
NH

poids moléculaire : 17330

masse d'azote : 5712 Coefficient :

DE RHAM O. (Lebensmm.-Wiss. u.-Technol., 15, 226-231, 1982) a déterminé ce facteur de conversion à partir de la composition en acides aminés pour un grand nombre de produits alimentaires. Une des principales causes de variation de ce facteur est le taux d'amidification des groupements carboxyliques des résidus d'acides glutamique et aspartique, résidus très largement représentés dans la plupart des protéines.

produit	coefficient (Protéine/azote)	
	amidification à 50 et 75%	
blé entier	5,83	6,15 - 5,79
lait de vache	6,38	6,38 - 6,01
viande de boeuf	6,25	5,72 - 5,50
oeuf de poule	6,25	6,01 - 5,80
soja	5,71	5,77 - 5,49
riz	5,95	5,74 - 5,47

Des travaux récents ont par ailleurs montré qu'il existe de bonnes corrélations entre ce coefficient (ou la teneur en azote) et la teneur en certains acides aminés (lysine et arginine par exemple).

L'azote non protéique soluble (NPN) peut être déterminé après précipitation des protéines (à l'acide trichloracétique, à l'acide sulfosalicylique etc.) suivie d'une centrifugation (ou après une dialyse ou encore une filtration sur gel).

a) Méthodes dérivées de la méthode de Kjeldahl

La méthode de Kjeldahl est une méthode de référence utilisable pour analyser les protéines de tous les produits, qu'il s'agisse d'échantillons hétérogènes ou non.

1) Principe

L'échantillon est d'abord minéralisé en milieu très fortement acide et à chaud. Dans ces conditions, les composants élémentaires des protéines (C, N, H, O) sont transformés en CO_2 , H_2O et NH_4 . Des molécules telles que nitrates, nitrites, dérivés cyanés, alcaloïdes ne donnent pas d'ammoniaque dans ces conditions. L'ammoniaque est ensuite dosé soit directement après neutralisation soit après entraînement à la vapeur d'eau.

2) Minéralisation

Elle est réalisée dans des matras généralement en présence d'acide sulfurique concentré (36N), de catalyseur et parfois d'autres composés chimiques (acides ou oxydants).



La *vitesse* de cette réaction peut être accélérée par :

- le choix du catalyseur Hg ou HgO sont chers , toxiques et donnent des dérivés stables avec NH_3 . Très bon recouvrement de l'azote
Se ou Se associé à CuSO_4
 ZrO_2 et Cu SO_4 : catalyseur bon marché et non toxique
- la nature de l'acide acide chromique / acide sulfurique
acide nitrique / acide sulfurique
- l'addition de peroxyde d'hydrogène.
- l'addition de sulfate de potassium. Cette addition permet l'augmentation de la température d'ébullition (la durée de minéralisation peut varier de 6 minutes à 3-4 heures).

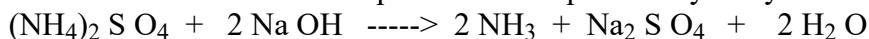
$\text{K}_2\text{S O}_4$ / $\text{H}_2\text{S O}_4$	catalyseur	température	durée
1 g/ml	Se, H_2O_2	410° C	6 min
0,05 g/ml	Se, CuSO_4	330° C	2h30

- le choix d'équipements performants. La minéralisation peut être effectuée en réacteur continu (Technicon), la réaction étant souvent incomplète. Il existe des blocs de minéralisation avec des tubes jaugés à la place des matras (Kjeltec, Buchi).

3) Dosage de l'ammoniac

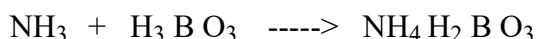
- a) *Alcalinisation et distillation de l'ammoniac*

Le minéralisat est neutralisé puis alcalinisé par de l'hydroxyde de sodium

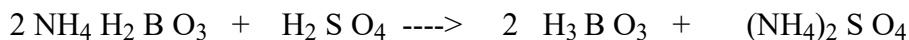


L'ammoniac est analysable par acidimétrie directement (acide borique) ou en retour (acide sulfurique).

1) Dans la titrimétrie **directe**, l'ammoniac est entraîné par de la vapeur d'eau et fixé dans de l'acide borique contenant un indicateur coloré (vert de bromocrésol - rouge de méthyle : indicateur de Conway)



Le borate d'ammonium est ensuite dosé par de l'acide sulfurique de titre connu :



Ce dosage est réalisé dans des appareils type Parnas et Wagner plus ou moins automatisés (BUCHI, KJELTEC etc). La distillation est directement effectuée dans les matras et l'introduction des réactifs ainsi que la vidange sont automatiques. Le dosage de l'ammoniac est obtenu par titrimétrie à point final soit colorimétrique, soit potentiométrique. Ainsi dans le système Kjelfoss macro-automatique une analyse demande 12 minutes et 20 analyses sont réalisables par heure.

2) Dans la titrimétrie **indirecte**, l'ammoniac est recueilli dans une solution de volume et de titre connus d'acide sulfurique, l'excès d'acide étant évalué par de l'hydroxyde de sodium.

-b) *Dosage des ions ammonium dans le minéralisat par colorimétrie*

Ce dosage est réalisable par le réactif de Nessler (donne avec les ions ammonium une coloration jaune-orangée, 440 nm), par le réactif au nitroprussiate de sodium. Il existe un système automatisé Technicon permettant 12 analyses par heure, un dosage demandant 30 minutes. Dans cette réaction, les ions ammonium réagissent avec le nitroprussiate en présence de salicylate de sodium et d'hypochlorite de sodium en formant un complexe coloré en vert absorbant à 660 nm par la réaction de Berthelot (en présence d'hypochlorite de sodium et de phénol alcalin, les ions ammonium forment un complexe bleu dont la quantité est évaluée par colorimétrie).

-c) *Dosage des ions ammonium par électrode spécifique*

Il s'agit d'une méthode rapide (5 min, système Orion) nécessitant une neutralisation préalable du minéralisat. Peu précise, cette méthode requiert des étalonnages fréquents et les colmatages de la membrane de l'électrode sont fréquents. La sensibilité est de l'ordre de 90 mg.

- d) *Dosage de l'ammoniac par coulométrie*

L'électrolyse d'une solution de bromure de potassium et borate de sodium conduit à la formation à l'anode de BrO^- et à la cathode de H_2 et OH^- . En présence de BrO^- , NH_3 donne Br^- , N_2 et H_2O . Le dosage est réalisé par titrage potentiométrique au moyen d'une électrode de verre. La sensibilité est voisine de 35 mg.

b) Dosage de l'azote gazeux après pyrolyse

A des températures élevées (entre 700 et 1100° C) et en présence de catalyseur, l'azote protéique est transformé en NH_3 ou N_2 respectivement en présence d' H_2 ou d' O_2 .

Dans la méthode de Dumas l'échantillon sec et homogène est chauffé à 700-900°C en présence d'oxygène et de catalyseur (CuO - Pt). Le carbone, l'hydrogène et l'azote des protéines sont transformés respectivement en CO_2 , H_2O et N_2 gazeux. L'azote est dosé soit par manométrie (Coleman), soit par conductimétrie (Ana, Leco), soit après activation neutronique et mesure de la radioactivité de ^{13}N ou de ^{15}N par spectrométrie de masse, soit après transformation par l'ozone en NO_2 qui est déterminé par chimiluminescence (Dohrmann DN 10, Antek). Il s'agit de la méthode la plus sensible puisque apte à doser 200 à 300 pg d'azote (figure 55).

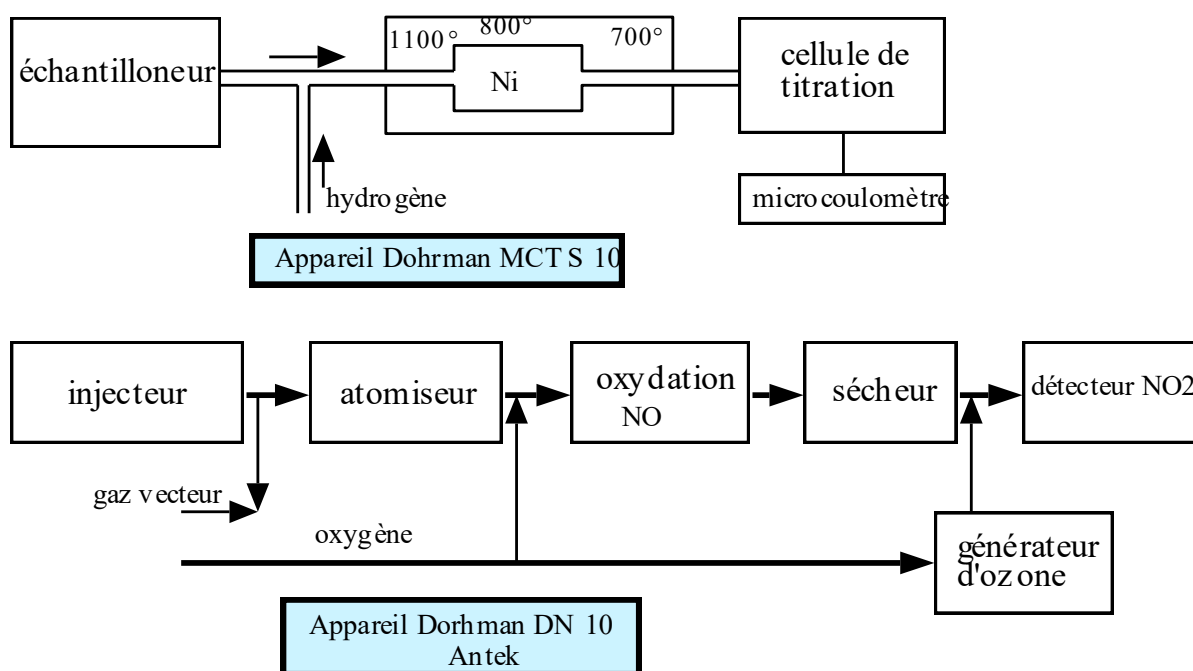


figure 55. Schéma des systèmes de dosage de l'azote protéique après pyrolyse

Dans la méthode de Ter Meulen, la pyrolyse est réalisée en présence d'hydrogène et de nickel comme catalyseur. L'azote protéique est transformé en NH_4 qui est retenu dans une solution acide puis dosé par potentiométrie ou par coulométrie (figure 42).

c) Dosage direct de l'azote protéique après activation neutronique

L'échantillon est soumis à un bombardement neutronique qui transforme l' ^{14}N en ^{13}N radioactif et la radioactivité induite est proportionnelle à la quantité de protéines dans l'échantillon.

XV.1.3. Dosages directs des protéines

Il existe de nombreuses méthodes directes (physiques ou chimiques) de dosage des protéines qui nécessitent un étalonnage préalable. Généralement c'est la méthode de Kjeldahl qui est employée comme méthode de référence. La plupart de ces méthodes donnent des résultats satisfaisants quand le rapport azote non protéique / azote protéique est constant et relativement faible.

a) méthodes physiques

1) Mesure de l'absorbance dans l'ultra-violet

Il s'agit d'une méthode simple à mettre en oeuvre et très rapide qui nécessite néanmoins une solubilisation préalable des protéines. Comme pour quelques méthodes décrites plus loin, cette solution doit être parfaitement limpide pour éviter les phénomènes de diffusion.

Trois acides aminés aromatiques (TRP, TYR et PHE) absorbent dans l'UV aux environs de 260 - 280 nm. La mesure de l'absorbance à 280 nm sera donc proportionnelle à la concentration en tryptophane (à un degré moindre en tyrosine et en phénylalanine qui ont des coefficients d'extinction molaire plus petits que celui du tryptophane) et donc, *pour une protéine donnée*, à la concentration en protéine.

Par contre, si des protéines possèdent des teneurs différentes en TRP, TYR ou PHE, cette méthode donnera des résultats relatifs. L'idéal consiste alors à réaliser la courbe d'étalonnage et le dosage avec la même protéine. La sensibilité est voisine de 100 µg et la spécificité faible. En effet, toutes les molécules possédant un noyau aromatique interfèrent (phénols, TRP, TYR et PHE libres, xanthine, acide urique, etc.).

La mesure de l'absorbance à 190-210 nm est proportionnelle au nombre de liaisons peptidiques et donc à la concentration en protéines. Cependant de très nombreux composés absorbent à cette longueur d'onde et interfèrent dans le dosage. La sensibilité de cette méthode est de l'ordre de 5 µg (mesure en cuve quartz).

Les propriétés spectrales des "protéines" sont indiquées ci-dessous :

Chromophore	$\lambda_{\max}$ (nm)	Coefficient d'extinction molaire (ϵ en l.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)
tryptophane	280	5600
tyrosine	275 (fonction pH)	1400
phénylalanine	257	200
liaison peptidique	190	4000 à 8000
pont disulfure	250	300

2) Mesure de la fluorescence

Il s'agit d'une méthode simple et rapide applicable à des protéines solubles. Parmi les acides aminés naturellement présents dans les protéines, seul le tryptophane émet une fluorescence importante à 348 nm après excitation à 278 nm. La mesure de l'intensité de fluorescence peut donc être corrélée à la teneur en tryptophane de la protéine et, pour une protéine donnée, à sa concentration. Pour une protéine donnée la réponse peut être fonction de la structure, la fluorescence du tryptophane étant liée à son environnement (quenching). La sensibilité de la méthode est d'environ 1 µg.

La tyrosine est beaucoup moins fluorescente à des longueurs d'onde d'excitation et d'émission respectivement égales à 275 et 300 nm.

3) Turbidimétrie ou néphélométrie

Il s'agit de la mesure de l'absorption ou de la diffusion de la lumière induite par une protéine en solution (ou en suspension). Les systèmes Laser puissants sont utilisables sur la plupart des produits liquides. Leur sensibilité est fonction de l'énergie émise par la source de lumière et par la

sensibilité du détecteur. Cette méthode est par exemple applicable aux laits animaux (de vache) ou végétaux (de soja). Par utilisation de néphélomètre LASER, il est possible de mesurer la concentration en protéine de solutions relativement concentrées (appareil BEHRING).

4) Spectroscopie X

L'irradiation par des rayons X de l'échantillon contenant la ou les protéines induit l'émission de rayonnements β dont l'énergie est fonction de la nature de l'atome excité et de sa concentration. La prise d'essai est voisine de 1 mg (appareil ESCA, Héraeus).

5) Réfractométrie

L'indice de réfraction d'une solution protéique (n) varie linéairement avec la concentration en protéine. Cette méthode n'est utilisable que si les protéines représentent l'essentiel de l'extrait sec (sérum, plasma, etc.).

6) Résonance magnétique nucléaire

Cette méthode consiste à mesurer la vitesse de déperdition d'énergie des noyaux d'hydrogène de l'eau soumis à l'action de deux champs magnétiques (1 constant, 1 alternatif). Cette vitesse dépend de la présence de composés comme Cu ou Fe (relaxation magnétique). Si des protéines sont présentes dans le milieu, elles complexent ces métaux, ce qui conduit à une variation de la vitesse de relaxation, paramètre qui est alors corrélé avec la concentration en protéines. Cette méthode rapide nécessite l'acquisition d'un matériel coûteux (Newport P100, etc.).

7) Spectroscopie dans le proche Infra Rouge

Cette méthode consiste à mesurer l'absorbance ou la réflectance d'un échantillon soumis à une illumination infra-rouge, en particulier pour des longueurs d'onde spécifiques aux protéines.

Le proche infra-rouge se situe entre 1000 et 2500 nm. Les énergies associées à ces longueurs d'onde permettent de mettre en évidence et de quantifier certaines liaisons chimiques qui se comportent comme des oscillateurs (figure 56). Les molécules absorbent quand la fréquence est identique à celle de la vibration (*fondamentale*). Les *harmoniques* correspondent à des bandes dont les fréquences sont des multiples de la fréquence fondamentale. Les spectres obtenus par transmission ou par réflectance sont généralement tracés en $\log(1/T)$ ou $\log(1/R)$.

Ces techniques de mesure dans le proche infra-rouge se sont développées à partir des années 1960 et des travaux d'analyses statistiques des spectres de SHENK et WESTERHANS. Les applications aux dosages de composants alimentaires datent de 1970 pour les techniques de mesure par réflectance et de 1980 pour les techniques de mesure par transmission, les appareils spécifiques pour les mesures en transmittance n'existant que depuis 1987 (Neotec, Infratec de Tecator).

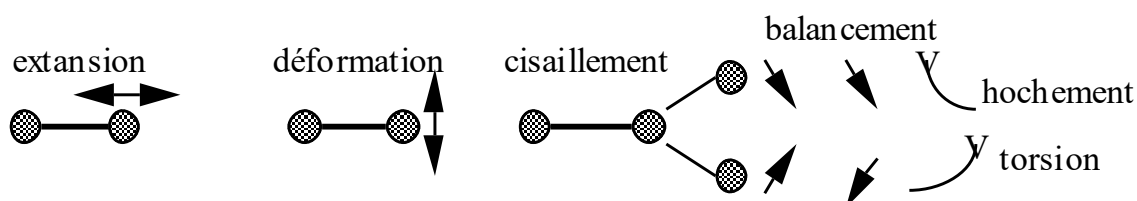


Figure 56. Quelques oscillations moléculaires en IR

- La technique IR par transmission (NIT : *near infrared transmission*) a des domaines d'applications variés. Elle permet la détermination des protéines, des lipides, de l'eau et même des fibres dans des produits comme les graines de blé, de coton, de soja, de colza ou encore des farines, isolats ou concentrats. La corrélation protéine-IR en fonction de protéine-Kjeldahl est en général excellente ($r > 0,99$).

-La technique par réflectance (NIR : *near infrared reflectance*) connaît actuellement de très nombreuses applications. Dans cette technique l'échantillon (poudre ou même liquide) est soumis à une illumination par des radiations infra-rouge à des longueurs d'onde continues (monochromateur à réseau : Infraalyzer de Technicon, Perkin-Ellmer, Neotec etc., prix 600 à 1000 kF) ou discontinues (systèmes de 5 à 20 filtres, prix 75 à 250 KF). Le détecteur placé dans la sphère d'intégration donne R (réflectance) puis $1/R$ et $\log(1/R)$ puis les dérivées premières ou secondes qui permettent d'éliminer les interférences. Le schéma du système de mesure et un exemple de spectre sont donnés sur la figure 57.

La teneur du composé à doser est donnée par :

$$Y = K_0 + K_1 \log(1/R)_{\lambda_1} + K_2 \log(1/R)_{\lambda_2} + \dots + K_n \log(1/R)_{\lambda_n}$$

K_0 est la constante de régression, et K_n la constante de Y à λ_n .

Dans cette méthodologie, il est nécessaire de sélectionner un trentaine d'échantillons de référence qui contiennent le composant à analyser à une teneur connue (par une autre méthode, Kjeldahl le plus souvent pour les protéines). K_0 et K_1 sont calculés ainsi que le coefficient de corrélation entre la réponse Y et la teneur connue en protéines. Puis on associe K_2 et on compare la réponse avec celle obtenue précédemment.

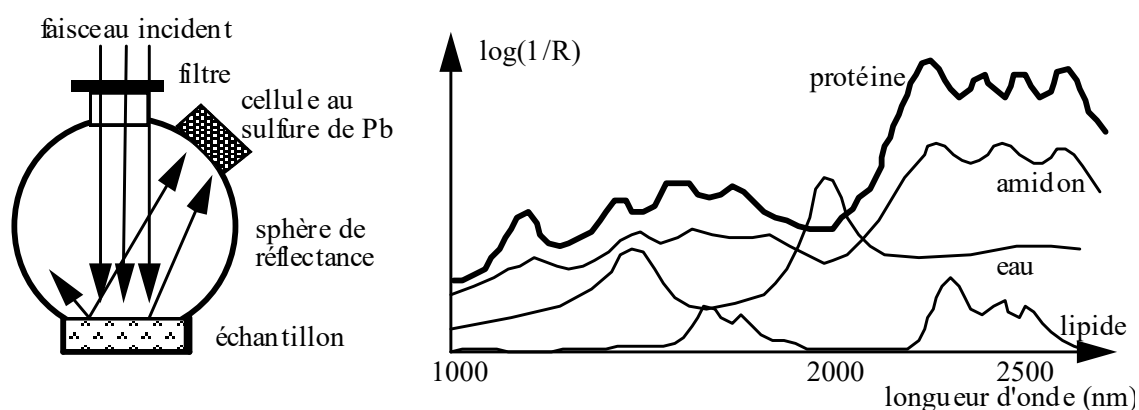


Figure 57. Schéma d'un analyseur IR par réflectance et spectre type

Si le coefficient de corrélation est meilleur, on adopte alors les mesures aux deux longueurs et ainsi de suite. Pour un composant donné il n'est pas rare de procéder au dosage en intégrant les réponses à 5 longueurs d'onde.

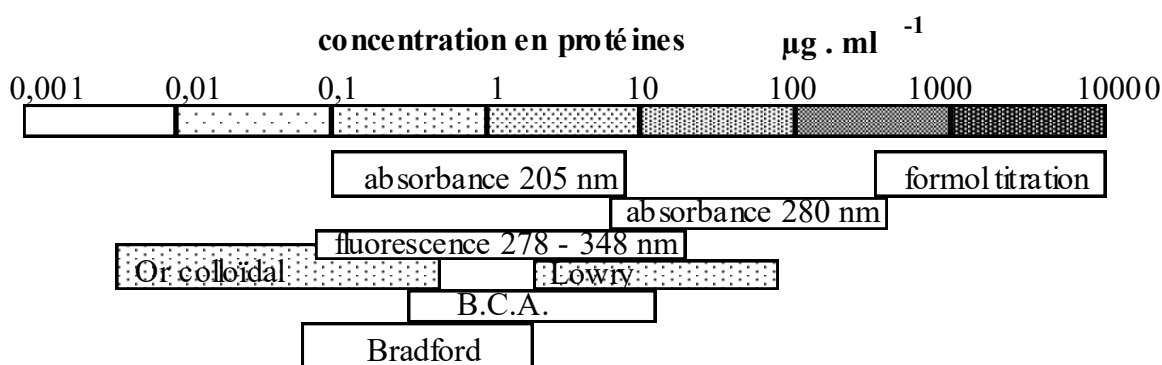
L'état de surface de l'échantillon (granulométrie, tassement, etc.) joue un rôle important dans ce type d'analyse et doit être parfaitement contrôlé.

En ce qui concerne le dosage des protéines, plusieurs longueurs d'onde maximales de réflectance sont utilisables (2310, 2180, 2230, 2100, 1940, 1680, les deux premières étant les plus spécifiques). Des groupements non spécifiques aux protéines (-OH, -CO-O-, etc) absorbent également dans l'IR ce qui peut engendrer des difficultés de dosage par interférence mais permet parfois l'analyse de ces autres composants (glucides, eau, lipides).

L'analyse par réflectance est applicable à tous les produits alimentaires de préférence homogènes (Infraalyser Technicon, Néotec, Dickey-John) tandis que l'analyse par absorption est aisément applicable aux solutions (Irma, Superscan, Milkoscan) et depuis peu aux produits solides.

b) Méthodes chimiques

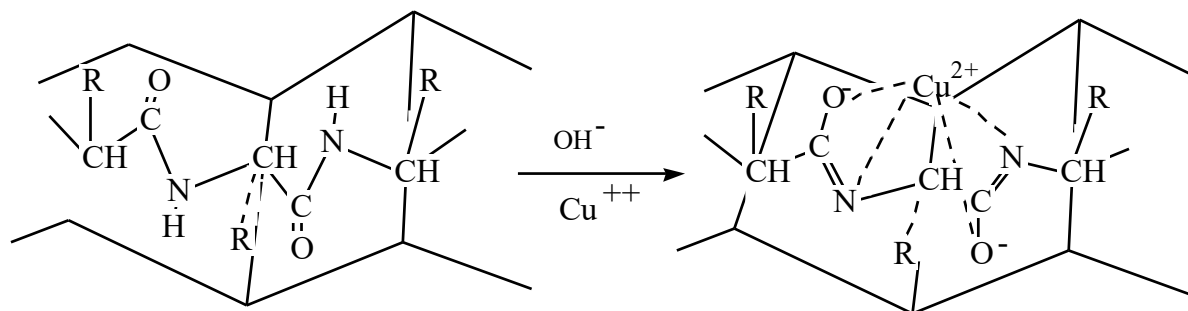
Ces méthodes sont basées sur la mise en évidence de la réactivité ou de la modification de réactivité de groupements chimiques des protéines en présence de réactifs variés. La réponse obtenue (colorimétrique, titrimétrique etc.) est alors corrélée avec la teneur en protéines. La plupart de ces méthodes nécessitent un étalonnage préalable et une bonne corrélation est généralement obtenue pour des rapports azote non protéique / azote protéique faibles et constants. Parmi ces méthodes, certaines sont basées sur la réactivité de la liaison peptidique (Biuret), d'autres sur la réactivité des acides aminés aromatiques (Folin), des groupements aminés (fixation de colorant, formol titration) ou encore des groupements amidés. Leur sensibilité varie de 1000 µg/ml à 0,01 µg/ml.



1) Méthode de Biuret

Cette méthode colorimétrique n'est applicable qu'aux protéines en solution. Son principe est le suivant: l'ion cuivrique forme un complexe coloré et stable avec les liaisons peptidiques en milieu très alcalin. L'absorbance mesurée à 540 nm est directement proportionnelle à la quantité de protéines.

Cette méthode est peu sensible (1 mg/ ml) et de nombreux composés peuvent interférer (PARVIN et Coll., Anal. Biochem., 1965, 12, 219). Les ions ammonium et les acides aminés libres n'interfèrent que très peu dans le dosage qui nécessite au moins deux liaisons peptidiques, tandis que les substances contenant deux groupes -CO - NH₂ ou -CH₂-NH₂ ou -CH₂-NH-NH₂ ou CH₂-S-NH₂ donnent la réaction.

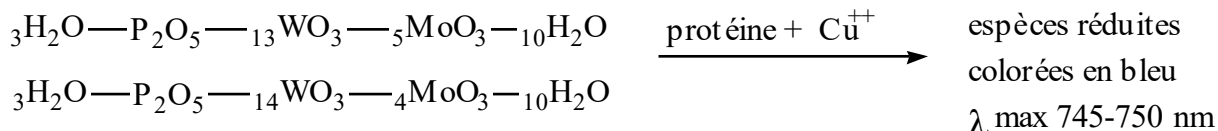


Il existe des tests semi-quantitatifs qui permettent, selon ce principe, des estimations rapides (Trousse Boehringer).

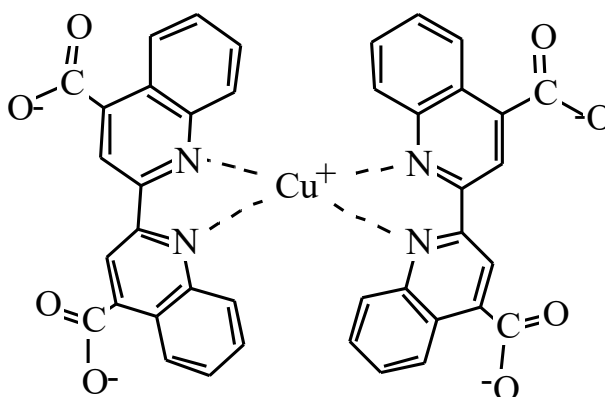
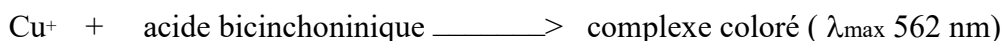
2) Méthode de Lowry (Folin)

Cette méthode n'est applicable qu'aux protéines en solution. Dans une première phase, un complexe protéine - cuivre est réalisé. Ce complexe, ainsi que certains résidus d'acides aminés (surtout TYR mais aussi TRP, CYS et HIS) réduisent le réactif de Folin (acide phosphomolybdotungstique) avec formation de composants colorés en bleu dont l'absorbance est corrélée à la teneur en protéines.

Cette méthode est relativement sensible (10 µg) mais de nombreuses substances peuvent interférer (phénols, tyrosine, EDTA, sulfate d'ammonium, K⁺, Mg²⁺, saccharose, etc.).

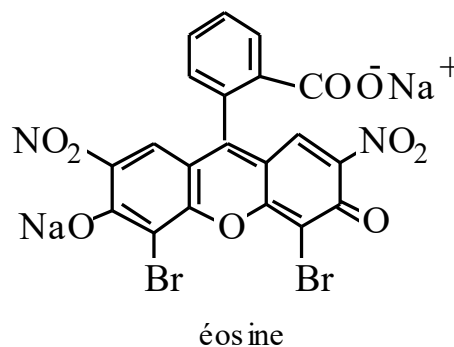
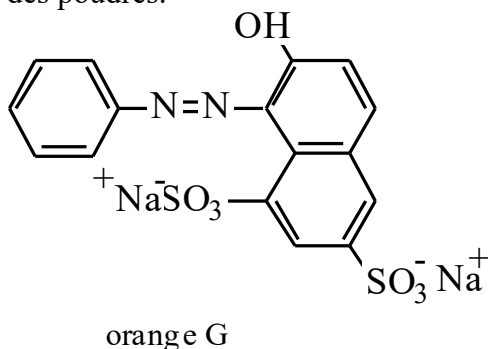


3) De nouvelles méthodes basées sur un principe sensiblement identique mais donnant moins d'interférences et plus sensibles, comme celle utilisant l'**acide bicinchoninique**, sont actuellement utilisables (SMITH et Coll., Anal.Biochem., 1985, 150, 76-85). Son principe est le suivant:



4) Fixation de colorants (DBC : dye binding capacity)

De nombreux composés colorés (orange G, noir amidé 10 B, bleu de Coomassie) ou fluorescents (éosine) anioniques peuvent se fixer sur les groupements chargés positivement des chaînes latérales d'acides aminés (pH < pKa). Les acides aminés impliqués dans cette réaction sont la lysine, l'arginine et l'histidine. Il est également possible de mesurer la fixation de réactifs colorés hydrophobes ou hydrophiles. Cette technique de dosage est applicable aussi bien aux produits liquides qu'à des poudres.

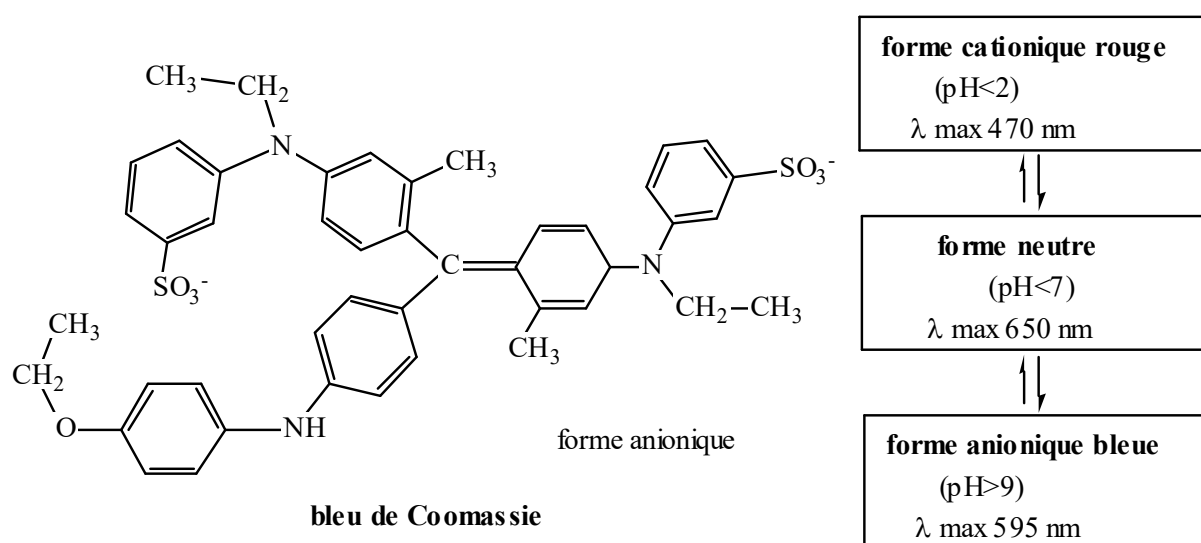


Ainsi, en milieu tamponné à pH acide (voisin de 2), les groupements -NH₂ sont tous sous forme -NH₃⁺ et fixent le colorant anionique dont l'excès dans la phase liquide est dosé par colorimétrie

(orange G) ou par mesure de la diminution de fluorescence (éosine moins fluorescente fixée que libre). La quantité fixée est proportionnelle au nombre de résidus de lysine, arginine et histidine (et NH_2 terminaux) et donc, pour une protéine donnée, à sa teneur.

Dans la méthode de **NAKAMURA** la fluorescamine est fixée par liaison covalente sur les fonctions amines de la chaîne latérale de la lysine ou N-terminales (fluorescamine : cf XV.4.2.f); après adsorption des protéines sur membrane Millipore, la fluorescamine “fixée” est éluée et sa fluorescence mesurée (sensibilité de 0,3 μg , assez simple, nombreuses interférences : urée, EDTA, amines, SDS etc.

Dans la méthode de **BRADFORD**, le Coomassie Brilliant blue G250 est fixé par liaison ionique aux protéines, son absorption se déplaçant alors de 465 à 595 nm en fonction du pH. La sensibilité est de 0,1 μg et la méthode est très rapide et très simple. Il existe des interférences avec des tampons alcalins et les détergents comme le triton ou le SDS.



Les interactions protéines - bleu de Coomassie sont , pour environ 60 % de l'énergie mise en jeu, du type hydrophobe. Ce colorant permet de détecter entre 0,5 et 1 μg de protéines immobilisées sur des matrices de type gel d'électrophorèse. Le noir amide (Amido black 10 B ou Amido Schwarz) ou le Rouge Ponceau -S ont la même capacité de détection.

Compte tenu de la nature de l'interaction protéine - colorant, la réponse “colorée” varie en fonction de la protéine. Par exemple pour une réponse relative de 100 pour la sérum albumine bovine (SAB) les réponses avec les différentes méthodes sont :

méthode	SAB	IgG	Insuline
Bradford	100	32	53
Lowry	100	68	105
Or colloïdal	100	54	22

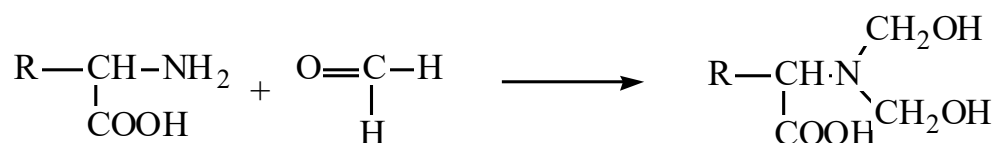
Les **substances interférantes** dans la méthode de Bradford sont nombreuses. Dans des conditions standards, les valeurs de ces interférences (exprimées en μg équivalent SAB) sont de 0,05 pour le KCL 1M de 2,4 pour le TRIS 2M, de 0,4 pour l'EDTA 0,1 M, de 1,7 pour le glycérol, de 0,37 pour le β mercaptoéthanol, de 1,2 pour le saccharose 1M, de 53 pour le Triton X100 à 1% et de 45 pour le SDS 1%.

La méthode de **GOLDBERG**, peu employée, passe par une réaction de biuret suivie d'un isolement des protéines par chromatographie de perméation de gel, puis dosage du cuivre fixé (sensibilité 0,02 µg, complexe, interférence avec des glucides et l'EDTA).

La **fixation d'argent ou d'or** colloïdal en présence de glutaraldéhyde (KRYSTAL et al., Anal. Biochem., 1985, 148, 451-460 ; STOSCHECK, Anal. Biochem., 1987, 160, 301-305) est obtenue après 10 min de contact et révélation par du thiosulfate. La lecture de l'absorbance est réalisée à 420 nm. Ces méthodes nécessitent un faible investissement, sont relativement rapides et leur sensibilité varie de 0,1 à 5000 µg. Il existe de nombreux systèmes, dont certains automatisés, parmi lesquels on peut signaler Prometer, Udytec, Biorad etc.

5) Formol titration

Les fonctions amines primaires (α , ϵ aminées) sont transformées en amines tertiaires en présence de formol.



Le pKa est ainsi augmenté de 1,5 et seuls les protons des groupements carboxyliques sont dosés dans les conditions du dosage, leur nombre étant corrélé avec la teneur en protéines.

6) Dosage de l'azote amidé

Dans cette technique, les fonctions amides de l'asparagine et de la glutamine contenues dans les protéines sont désamidées en milieu alcalin et à chaud en libérant de l'ammoniac qui est dosé après distillation par acidimétrie (appareil Kjeltec DD).

c) *Fast protein liquid chromatography (FPLC)*

Il s'agit d'une méthode relativement récente de séparation et de dosage des protéines solubles, la détection et la quantification se faisant par mesure de l'absorbance à 280 ou 206 nm. La séparation des protéines en phase liquide associe les phénomènes de perméation de gel (colonnes TSK par exemple) ou d'échange d'ions (colonne milli Q Séphadex par exemple; cf XIV.2.2 et XV.4). Les limites de cette méthode rapide sont liées au passage en phase soluble obligatoire et à la détection UV. Quand elle peut s'appliquer, elle donne des résultats à la fois qualitatifs et quantitatifs (figure 58).

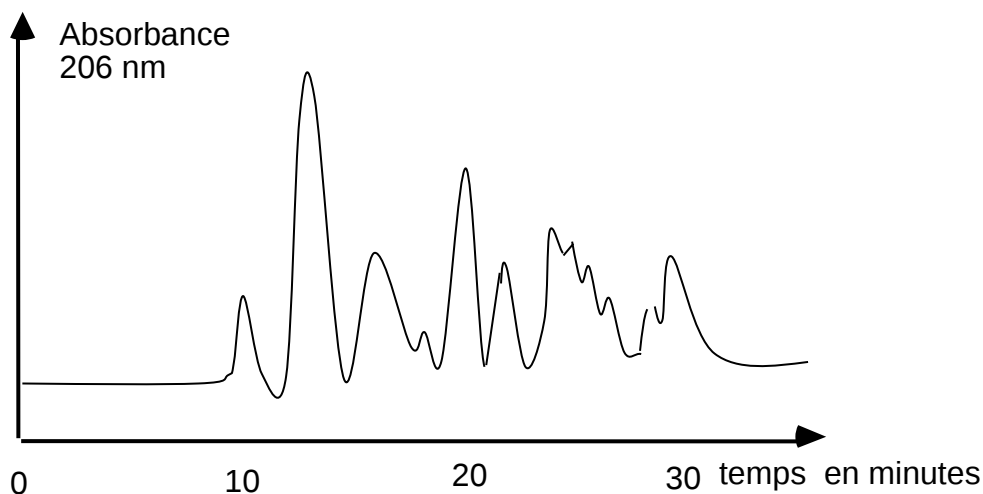


Figure 58. FPL chromatogramme des protéines solubles du haricot

d) *Electrophorèse en gel de polyacrylamide (cf Biochimie des Protéines STIA1)*

Cette méthode est plus ancienne que la précédente (SDS-PAGE). Son principe de base est le suivant: la protéine chargée (naturellement à des pH supérieurs ou inférieurs au pHi ou après fixation d'un composant anionique tel que le SDS) est soumise à l'effet d'un champ électrique dans un gel, le plus souvent de polyacrylamide. Sa vitesse de migration est alors fonction de sa charge (avec le SDS la charge de la protéine devient très grande et sa charge intrinsèque devient négligeable) et de son encombrement stérique ou encore de sa masse molaire. Après fixation et coloration (bleu de Coomassie) les bandes électrophorétiques peuvent être quantifiées par densitométrie.

Les gels peuvent être distribués en tubes ou en plaques et leur concentration en acrylamide (ou leur niveau de réticulation) peut être variable (gradient). Dans ces conditions les protéines vont migrer jusqu'à un réseau (concentration donnée) qui empêchera leur progression (le diamètre des pores devient inférieur à celui du complexe SDS-protéine) et les bandes protéiques sont très fines. Si on appelle T la concentration du gel (donc la taille des pores) avec :

$$T = (\text{acrylamide (g)} + \text{bisacrylamide (g)}) 100 / \text{volume (ml)}$$

FERGUSON a relié T au logarithme de la mobilité

$$\text{Log } U = \text{Log } U_0 - K_r.T$$

équation dans laquelle U est la mobilité pour une concentration donnée en acrylamide, U_0 est la mobilité pour une concentration nulle en acrylamide et K_r un coefficient de retard égal à la pente de la droite.

Actuellement on utilise des plaques dont le gradient de concentration varie de 4 à 30 % pour séparer des protéines dont les masses molaires varient entre 2.10^6 et 5.10^4 daltons et de 2 à 16 % pour des protéines de masses molaires comprises entre 5.10^6 et 10^5 .

acrylamide : $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{C O}-\text{NH}_2$

bisacrylamide (agent de pontage): $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{C O}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C O}-\text{CH}=\text{CH}_2$

Il existe des systèmes de microélectrophorèse (**électrophorèse capillaire**) en veine liquide (Beckman) rapides et ne nécessitant pas de coloration (lecture UV).

Le tableau 38 résume les avantages et inconvénients des diverses méthodes de dosage des protéines qui viennent d'être décrites.

*Tableau 38 . Comparaison des diverses méthodes de dosage des protéines
(amortissement avec une utilisation de 2000 h/an et 0,3 F de bénéfice par analyse)*

	rapidité (min)	capacité (analyse par h)	DOMAINE D'APPLICATION			Interfê- -rences	sensibi- -lité mg	amortis- -sement (an)	coût d'1 analyse
			farine	Echan- tillons hétéro- gènes	liquide				
GRAVIMETRIE	10	20	METHODE ABSOLUE			Protéine	faible		
			+	-	-				
N2 Kjeldahl	6 - 120	5 - 35	METHODES ABSOLUES INDIRECTES			amines	200 à 3000	1,2 - 7	1,25- 2,5
N2 Pyrolyse	2 - 10	10 - 30	+	-	+	S ,Cl ..	0,0003	1,7 -19	0,5 - 15
PHYSIQUES			METHODES DIRECTES APRES ETALONNAGE						
Absorption UV	0,5 - 2	20	solutions			oui	5-100		
Absorption IR	6 - 10	75-190	-	+/-	+	oui			
fluorescence	0,5-2	20	solutions			oui	1		
réflectance IR	0,25	20-150	+	+	+/-	oui	5000	0,6-4	0
spectroscopie X	10	6	+	-	+	M.G.		long	
néphélométrie	0,5-2	20	solutions			oui	1000		
réfractométrie	0,5-1	30	solutions			oui	1000		
RMN	0,3	15	+	+	-	oui		long	
Activ.neutronique	12	30	+	+	-	Si,P,K	60000	45	4
CHIMIQUES									
Biuret	20	20	solutions			amines	1000		
Folin	20	20	solutions			phénols	10		
Sörensén	10	20	solutions			oui	5000		
DBC	5 -10	15-50	+/-	+/-	+	oui	1-5000	0,5-1	0,25-1
azote amidé	6	10	solutions			peu			
FPLC	15-60	1 - 2	solutions			-	100		
ANALYSE DES ACIDES AMINES	12 - 60	1 - 2	+	+	+	-	100		

XVI. DETERMINATION DES MASSES MOLAIRES DES PROTEINES (Cours Biochimie des Protéines STIA 1)

L'évaluation de la masse molaire d'une protéine inconnue est une des premières étapes de son identification. Cependant, en technologie des protéines, l'analyste se trouve fréquemment en présence de mélanges protéiques, et la détermination de la masse molaire de chacun des composants du mélange permet un suivi des opérations technologiques et de la qualité des divers produits fabriqués.

XVI.1. METHODES UTILISABLES AVEC DES PROTEINES PURIFIEES

XVI.1.1 . Dosage d'un ou plusieurs composants de la molécule

Il est possible de déterminer la masse molaire minimale d'une protéine pure c'est à dire la masse qu'aurait la molécule si elle ne contenait qu'un atome d'un élément analysé (P, Cu, Fe etc.) ou encore si elle ne contenait qu'un résidu d'un acide aminé considéré acide aminé généralement choisi en raison de sa très faible contribution à l'édifice protéique.

La méthode de DELAAGE permet le calcul de la masse molaire à partir de la composition en acides aminés.

XVI.1.2. Méthodes physico-chimiques ou physiques

Parmi les nombreuses méthodes existantes on peut signaler la mesure de la pression osmotique et celle de la diffusion de la lumière.

XVI.2. METHODES APPLICABLES A DES MELANGES PROTEIQUES

XVI.2.1. Sédimentation

Les protéines ont une densité généralement supérieure à celle de l'eau (1,2 à 1,4) et ont naturellement tendance à sédimenter. Cette tendance est contrebalancée par l'agitation thermique. Placées dans un champ gravitationnel intense (100 000 fois ou même beaucoup plus la valeur du champ gravitationnel terrestre) les protéines se déplacent alors, la sédimentation étant fonction de nombreux paramètres parmi lesquels on peut citer : la force appliquée, la taille - forme -densité des molécules protéiques, la densité et la viscosité du solvant.

La vitesse de sédimentation est mesurée par un coefficient S (en unités Svedberg, 1 unité = 10^{-13} cm/sec/dyne/g) et pour un solvant donné, la constante de sédimentation est une caractéristique d'une protéine. Le calcul de la masse molaire M requiert la détermination préalable de la constante de diffusion D. On peut écrire :

$$M = (R.T.S) / D.(1 - \varpi.\delta)$$

avec R constante des gaz parfaits, T température absolue, S vitesse de sédimentation en unité Sverdberg, ϖ volume spécifique partiel du soluté et δ densité du solvant.

L'équilibre de sédimentation s'effectue à vitesse moins élevée et ne nécessite pas la mesure de la constante de diffusion D . On peut écrire :

$$M = 2 RT \ln (C_1 / C_2) / (\omega^2 (1 - \varpi \cdot \delta) (X_2^2 - X_1^2))$$

dans laquelle C_1 et C_2 sont les concentrations aux distances X_1 et X_2 et ω la vitesse de rotation en radian par seconde. Dans ces conditions, le transport du soluté dû à la sédimentation par centrifugation est équilibré par la force de diffusion en retour. La durée de cette méthode longue, l'équilibre étant difficile à atteindre, est améliorable si on effectue des calculs pendant la période où l'équilibre commence à se faire. L'utilisation largement répandue de solutions de densités élevées et proches de celles des protéines (chlorure de césium, saccharose) distribuées en gradient de concentration dans les tubes à centrifuger permet des déterminations relativement rapides des masses molaires.

XVI.2.2. La chromatographie d'exclusion

La chromatographie d'exclusion, ou gel filtration ou gel perméation est fondée sur la "rétention" des molécules de soluté en fonction de leur taille en raison de leur pénétration dans les pores, remplis de solvant, d'une phase stationnaire appropriée. Si on suppose que les molécules de soluté ne présentent aucune affinité pour les parois de la phase stationnaire particulière, les grosses molécules ne pourront pas pénétrer dans les pores ; elles migreront plus rapidement que les petites molécules qui peuvent, quant à elles, pénétrer dans un plus grand nombre de pores. Le calcul de K_{av} (fraction du volume du gel stationnaire où diffuse une molécule donnée) permet d'accéder au poids moléculaire.

$$K_{av} = \frac{V_R - V_0}{V_t - V_0}$$

et

$$K_{av} = A \log (\eta \cdot M) + B \quad \text{avec } A \text{ et } B \text{ sont des constantes } \eta \text{ viscosité intrinsèque (ml.g}^{-1}\text{)}$$

XVI.2.3. L'électrophorèse en milieu dénaturant

Cette méthode (**SDS-PAGE**) passe d'abord par un traitement de l'échantillon à chaud en présence de β -mercaptoéthanol et de SDS. Au cours de ce traitement, les ponts disulfure sont réduits et les protéines dénaturées chargées négativement par le SDS. Leur séparation sous l'effet d'un champ électrique (tube ou plaque) est suivie d'une fixation-coloration (au noir amide ou au bleu de coomassie par exemple en milieu méthanol/acide acétique/eau) puis d'une décoloration. La mesure densitométrique des bandes colorées permet de déterminer leur R_m qui est une fonction du log de la masse molaire.

Par comparaison avec une courbe d'étalonnage obtenue avec des protéines de masses molaires connues, il est alors possible de déterminer la masse molaire des protéines analysées .

XVII. DOSAGE DES ACIDES AMINES

Le dosage des acides aminés protéiques permet d'**apprécier** :

- la valeur nutritionnelle potentielle des protéines alimentaires (indice chimique)
- la masse molaire d'une protéine purifiée
- la valeur gustative potentielle des hydrolysats de la protéine étudiée
- l'intensité de certains traitements technologiques défavorables
- des "incides nutritionnels" comme la digestibilité après hydrolyse enzymatique.

L'analyse comporte des **étapes successives** qui sont :

- **le dosage de la protéine** ou de l'azote ou de la matière sèche du produit
- une **hydrolyse** par voie acide, alcaline ou enzymatique. Quand l'échantillon contient des acides aminés libres, il est possible de les doser après précipitation ou élimination des protéines (acide trichloracétique, ultrafiltration, gel filtration). L'analyse après hydrolyse conduira dans ce cas précis au dosage des acides aminés totaux (protéiques et libres).
- le **fractionnement** des acides aminés de l'hydrolysat soit directement (chromatographie d'échange ionique) soit après formation d'un complexe (avec un réactif hydrophobe et facile à détecter par absorption ou fluorescence : *dérivatisation pré-colonne*) qui permet leur séparation par chromatographie liquide haute performance avec des phases stationnaires hydrophobes.
- **le dosage** des acides aminés élués. Cette opération nécessite un réacteur post-colonne dans lequel les acides aminés élués individuellement sont soumis à une réaction (colorée en présence de ninhydrine, condensation avec une molécule fluorescente comme l'OPA) qui permet leur quantification.

Le dosage des acides aminés peut aussi être réalisé, à partir d'hydrolysats, par chromatographie en phase vapeur après formation d'esters volatiles (méthanol) ; la détection est réalisée par ionisation de flamme.

XVII.1. PREPARATION DES PROTEINES

Si des lipides sont associés aux protéines dans le produit ils doivent être éliminés par extraction avec des solvants (appareil de Soxhlet, hexane, sous reflux, 2 à 3 heures ou extraction à froid par un mélange chloroforme - méthanol). Cette opération est à effectuer chaque fois que la teneur en lipides dépasse 2 à 4 % de la matière sèche.

Dans la mesure du possible, la ou les protéines doivent ensuite être séparées des molécules de faibles masses molaires (oses, diholosides, sels minéraux etc.).

La préparation protéique est ensuite soumise à l'*analyse de la matière sèche* (étuvage à 105-108°C jusqu'à poids constant, soit environ pendant 24 heures en milieu ventilé et en présence d'un dessiccant du type P₂O₅ ou silicagel), à l' *analyse des protéines* par une méthode appropriée ou à l'*analyse de l'azote* par la méthode de Kjeldahl le plus souvent.

XVII.2. HYDROLYSE DES PROTEINES

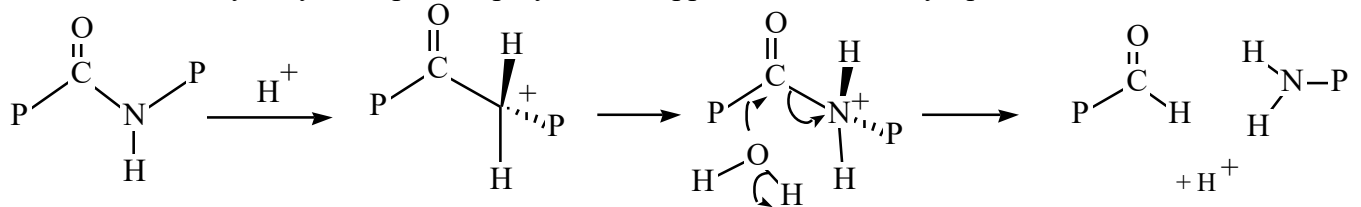
Une hydrolyse satisfaisante des protéines doit permettre :

- une **libération complète** des acides aminés par hydrolyse de la liaison peptidique

- une **destruction la moins grande possible** des acides aminés libérés, le niveau de l'éventuelle destruction devant toujours être connu.

XVII.2.1. Hydrolyse acide

Les méthodes d'hydrolyse les plus employées font appel à l'action catalytique des acides.



a) Hydrolyse en présence d'acide chlorhydrique

1) Méthodologie

Cette méthode est la plus employée et en absence d'indication concernant la méthode d'hydrolyse utilisée, il est admis que c'est cette voie qui a été adoptée.

Il existe schématiquement deux techniques qui seront choisies en fonction de la composition de l'échantillon à analyser. Les montages nécessaires à leur réalisation sont indiqués sur la figure 59.

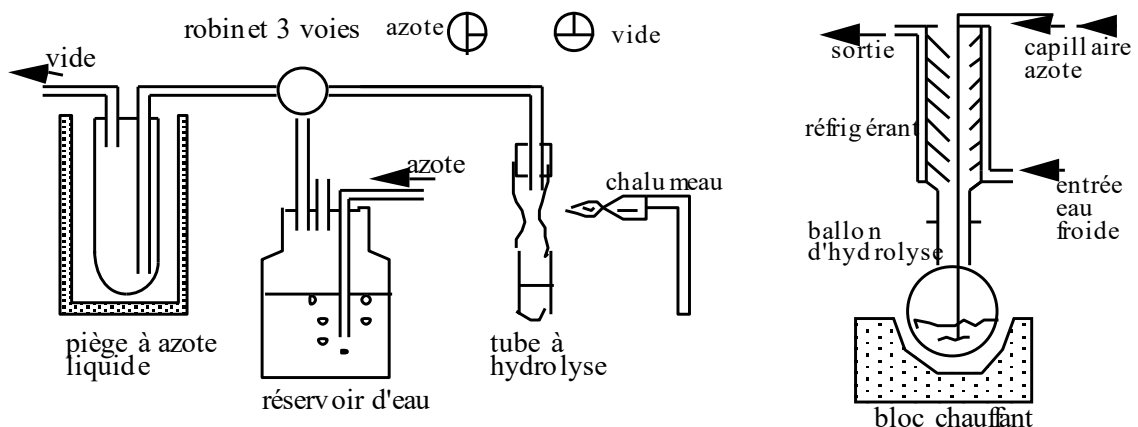


Figure 59. Schéma des systèmes d'hydrolyse des protéines en tube et sous reflux

Dans la méthode **d'hydrolyse en tube scellé**, 1 à 5 mg de protéines sont introduits dans un tube préalablement lavé à l'acide chlorhydrique (par pesée avec une balance au 1/10ème de mg pour des masses de produit supérieures à 5 mg ou mieux par introduction d'un volume précis de solution protéique).

Un étalon interne est alors ajouté (1 à 2 μ moles de norleucine) puis de l'acide chlorhydrique et de l'eau (éventuellement) pour que la molarité finale soit égale à 6 M en HCl. Le tube est alors préétié au chalumeau puis congelé dans l'azote liquide (-192°C) ou mieux dans un mélange neige carbonique / acétone (-80°C).

Le vide est réalisé au dessus de l'échantillon congelé et le tube est scellé sous vide (difficile) ou sous azote à pression atmosphérique. L'hydrolyse est réalisée par incubation à 110°C (parfois plus) pendant des temps compris entre 24 et 72 h. En absence d'information, c'est au temps de 24 heures qu'il faut se référer.

Après hydrolyse, le tube est ouvert par choc thermique et l'hydrolysate évaporé à sec sous vide partiel à 40°C (rotavapor).

Dans la technique **d'hydrolyse en ballon sous reflux**, l'échantillon représente jusqu'à 50 voire 100 mg (dont environ 5 à 10 mg de protéines) et le volume d'acide 6 N (dont la température

d'ébullition est de 110°C) peut atteindre 150 à 250 ml. Cette méthode permet, par dilution des composés de l'hydrolysate, de minimiser des réactions défavorables à l'analyse (amidon donnant du glucose qui se condense par réaction de Maillard avec les groupements aminés et fausse l'analyse). Après 24 ou 48 heures d'incubation, l'hydrolysate est évaporé à sec sous vide partiel. Cette méthode est recommandée pour les échantillons contenant de l'amidon ou des fibres associés aux protéines en quantités importantes.

2) Vitesse de libération et de destruction des acides aminés

La vitesse relative d'hydrolyse (V_{rh}) a été mesurée en milieu HCl 6 M à 110°C pour des dipeptides

peptide	V_{rh}	peptide	V_{rh}
GLY-GLY	1 (référence)	GLY-VAL	0,31
GLY-ALA	0,62	LEU-GLY	0,23
ALA-GLY	0,62	LEU-LEU	0,048
GLY-LEU	0,40	LEU-TRP	0,041
GLY-TRP	0,35	VAL-GLY	0,015

La vitesse d'hydrolyse varie en fonction des acides aminés impliqués dans la liaison peptidique, mais aussi de leur position dans cette liaison. Les acides aminés "aliphatiques" tels que ILE, LEU, VAL sont libérés avec une vitesse très lente.

Les liaisons peptidiques contenant des acides aminés aminés dicarboxyliques (surtout ASP) et des acides aminés hydroxylés (SER, THR) s'hydrolysent rapidement.

Pour les peptides à faible vitesse d'hydrolyse, la teneur finale à adopter correspond à la valeur maximale trouvée après plusieurs temps d'hydrolyse (figure 60).

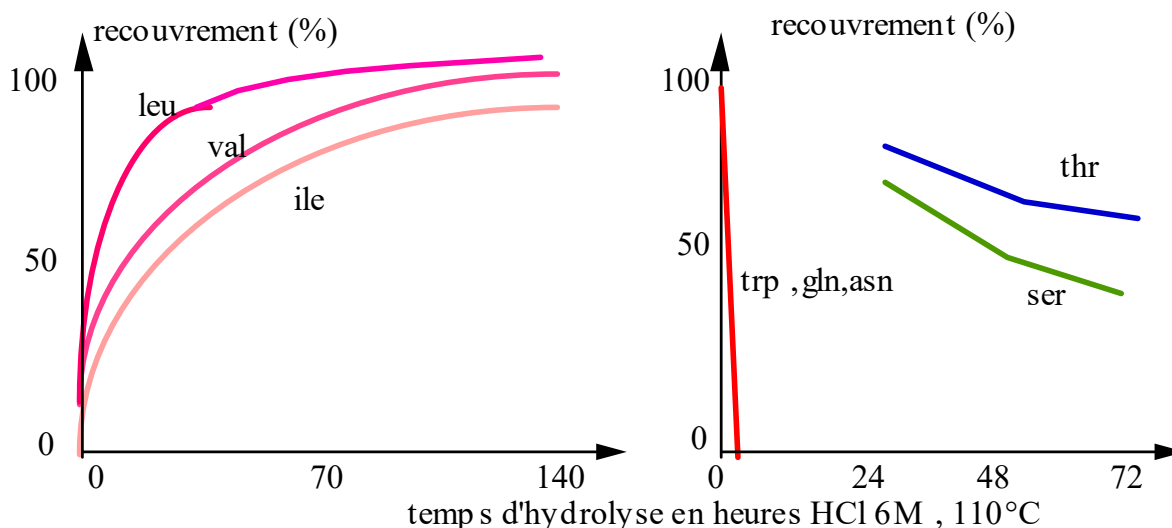


Figure 60. Recouvrement des acides aminés protéiques au cours d'une hydrolyse acide

Certains acides aminés sont détruits très rapidement par hydrolyse de certaines de leurs fonctions (GLN et ASN) et d'autres par oxydation avec l' O_2 résiduel ou avec des formes oxydantes du chlore comme Cl^+ (tryptophane - donnant en début d'hydrolyse donc de destruction des dérivés roses facilement visibles -, SER, THR, CYS et TYR). Si le milieu contient des traces d'oxygène, la méthionine sera oxydée en sulfoxyde ou en sulfone.

La dégradation d'un acide aminé peut se produire en 2 temps. D'abord au moment où il est libéré de la liaison peptidique; ensuite il peut être soumis à une réaction de dégradation sous sa forme libre avec un mécanisme et une cinétique différents.

Généralement la mesure du nombre de résidus d'acides aminés sensibles à l'hydrolyse est réalisée par extrapolation au temps 0.

b) Hydrolyse en présence d'acide méthane sulfonique

L'acide méthane sulfonique et l'acide p-toluène sulfonique (SIMPSON et al., J.Biol.Chem. , 1976 , 251 , 1936-1940) permettent d'obtenir des hydrolyses totales sans destruction de tryptophane (dont la destruction en cours de l'hydrolyse chlorhydrique peut être minimisée par addition de mercaptans dans le milieu).



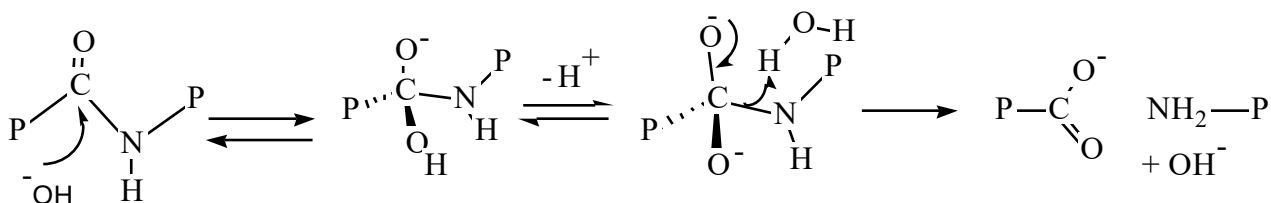
La méthode donnant les meilleurs résultats utilise l'acide méthane sulfonique en présence de 3-(2-aminoéthyl)indole (ou tryptamine). Les conditions d'hydrolyse sont les suivantes : acide méthane sulfonique 4 N, 105°C, 24 heures, sous azote ou sous vide (5 mg de protéine pour 2 ml de milieu d'hydrolyse en tube). Certains sucres aminés (glucosamine, mannosamine peuvent interférer dans le dosage avec le tryptophane.

A la fin de l'hydrolyse, le milieu est neutralisé par de l'hydroxyde de sodium 4 N.

c) L'hydrolyse avec l'acide sulfurique comme catalyseur n'est que très peu employée.

XVII.2.2. Hydrolyse alcaline

Ce type d'hydrolyse permet le dosage du tryptophane et du méthionine sulfoxyde



Parmi les bases, **l'hydroxyde de sodium** et **l'hydroxyde de baryum** sont les plus employés. L'échantillon est hydrolysé dans un tube en polypropylène placé à l'intérieur d'un tube en pyrex pour éviter l'attaque du pyrex par les bases. L'hydrolyse dure en général 16 heures à 110°C sous azote, l'addition de 25 mg d'amidon par mg de protéine à hydrolyser permettant d'améliorer le recouvrement du tryptophane.

Dans le cas de l'hydrolyse par l'hydroxyde de sodium, l'hydrolysats est neutralisé par HCl ce qui conduit à une solution de force ionique élevée.

Dans le cas de l'hydrolyse par l'hydroxyde de baryum, on fait barboter de l'anhydride carbonique dans l'hydrolysats pendant une quinzaine de minutes ; il se forme du carbonate de baryum insoluble. Après centrifugation, le surnageant est amené au pH compatible avec l'analyse.

Les inconvénients de ce type d'hydrolyse sont nombreux :

- destruction de très nombreux acides aminés (ARG, THR, SER, CYS, PHE, ILE).
- isomérisation des L amino acides en dérivés D.

XVII.2.3. Hydrolyse enzymatique

Les acides aminés présents dans les protéines et dosés après hydrolyse acide constituent un bon *indice chimique* et représentent la valeur nutritionnelle potentielle de la protéine (ne pas oublier que des toxines protéiques ont un bon indice chimique..). Cette notion est insuffisante pour estimer la valeur nutritionnelle *in vivo* en particulier pour les aliments soumis à des traitements technologiques ou pour les protéines de graines de légumineuses consommées crues. Cette indisponibilité peut être due soit à la modification de la chaîne latérale d'un résidu d'acide aminé donné, soit à un changement de conformation, soit à la formation de dérivés nouveaux. Tous ces changements peuvent se traduire par une diminution de la vitesse et du niveau d'hydrolyse *in vivo*.

Quand des protéines sont soumises à une hydrolyse enzymatique *in vitro*, la vitesse et la libération des acides aminés peut être comparable à celle qui se produirait *in vivo*. Cette approche, beaucoup plus simple que l'expérimentation animale est à l'origine d'un certain nombre d'estimation *in vitro* de la valeur nutritionnelle, approches qui permettent d'accéder à des digestibilité, CEP, UPN ou encore VB "apparents".

Plusieurs méthodes d'hydrolyse enzymatique *in vitro* ont été décrites :

- la méthode d'**hydrolyse totale**, qui est excessivement longue et fait appel à de nombreuses protéases (pepsine, chymotrypsine, trypsine, carboxypeptidase, amino peptidase etc.)
- la méthode **Pepsine Pancréatine** (MAURON) dans laquelle 1 g de protéine est d'abord hydrolysé par 25 mg de pepsine dans 30 ml d'acide sulfurique 0,1 N pendant 24 heures à 37°C puis, après neutralisation, le pH est ajusté à 8 et 75 mg de pancréatine sont ajoutés. Le mélange est incubé encore 24 heures à 37°C. Des témoins autolyse sont réalisés.
- la méthode à la **Pronase** (protéases produites par *Streptomyces griseus*). Dans cette méthode 1 de protéine est incubé en présence de 10 mg de Pronase dans 30 ml de milieu ajusté à pH 8; le pH est maintenu constant au moyen d'un pHstat et la température réglée à 50°C (figure 61).

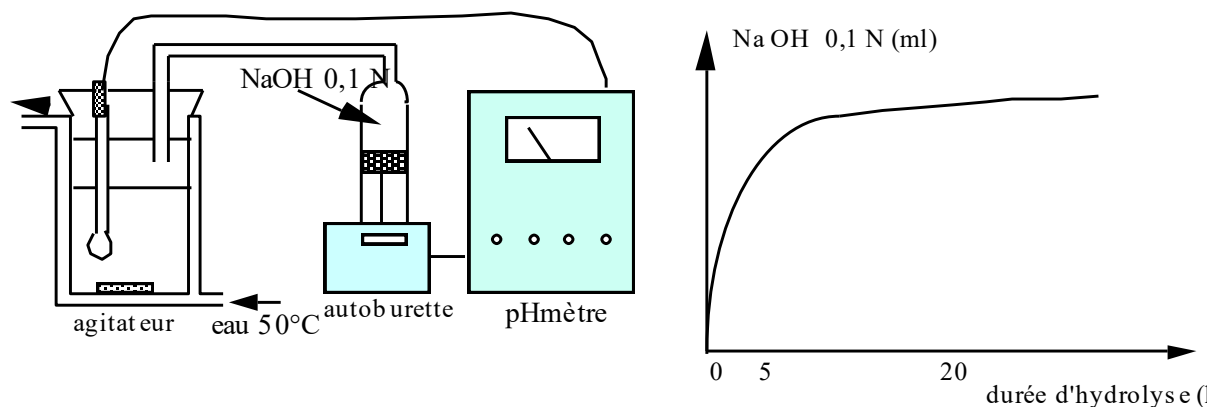


Figure 61. Hydrolyse enzymatique *in vitro*. Schéma du montage et "cinétique"

L'hydrolyse peut être suivie par mesure du volume d'hydroxyde de sodium nécessaire à maintenir constant le pH à 8 (quand une liaison peptidique est rompue il y a libération d'un proton).

On peut suivre l'hydrolyse par d'autres méthodes, par exemple en mesurant les NH_2 par réaction à la ninhydrine, après déprotéinisation (acide sulfosalicylique à 4 %, p/v ou acide picrique à 1 %, p/v ou encore acide trichloroacétique à 10 %, p/v dont l'excès peut être éliminé par de l'éther éthylique) et après centrifugation.

Si on soumet une protéine de soja native ou chauffée avec du saccharose à deux hydrolyses, acide et enzymatique, le dosage des acides aminés libérés donne les résultats indiqués dans le tableau 39.

Tableau 39 . Résultats comparés de deux hydrolyses d'une protéine de soja

	HYDROLYSE ACIDE (pourcent de perte)		HYDROLYSE ENZYMATIQUE (pourcent de perte)	
	native	native+sucre	native	native + sucre
arginine	3	42	8	55
cystine	9	22	14	86
histidine	8	10	16	42
isoleucine	0	0	8	8
leucine	2	0	8	13
lysine	3	47	30	84
méthionine	3	2	6	41
phénylalanine	0	0	9	14
thréonine	4	1	8	15
valine	2	0	8	8

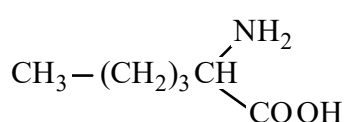
XVII.3. ETALONS INTERNES

La présence d'un étalon interne dans le milieu d'hydrolyse permet de corriger les pertes éventuelles qui peuvent se produire. Généralement on associe à 1 mg de protéines à 0,5 ou 1 mmole de l'étalon interne. L'association initiale 1 mg de protéine / 0,5 mmole d'étalon interne est parfaitement maîtrisable (pesée, volumes précis) et constitue une constante pendant toute la durée de l'analyse.

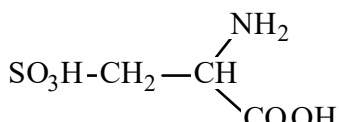
Cette constante doit être indépendante des traitements ou pertes subies en cours d'analyse.

Le choix d'un bon étalon interne doit répondre à certaines exigences :

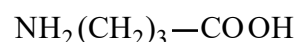
- il faut que sa structure soit aussi proche que possible des composés analysés. Dans notre cas il doit donc correspondre à un acide aminé non naturel ou inhabituel
- il doit être stable au cours de l'hydrolyse
- il doit être élué bien isolément et avec un temps d'élution voisin de celui des acides aminés à doser. Parmi les nombreux étalons internes qui répondent à ces exigences on peut indiquer :



norleucine



acide cystéique



acide γ amino butyrique

- la norleucine pour l'analyse complète des acides aminés protéiques. Elle est éluée après la leucine et l'isoleucine
- l'acide cystéique, utilisable comme étalon interne dans le dosage des acides aminés acides
- l'acide γ amino butyrique utilisable dans le dosage des acides aminés basiques

XVII.4. SEPARATION ET DOSAGE DES ACIDES AMINES

(cf Biochimie des Protéines STIA1)

La séparation des acides aminés est généralement obtenue par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC). Les phases stationnaires utilisées donnent des interactions variables en intensité avec les différents acides aminés ou leurs dérivés ce qui permet leur séparation. Cette séparation est réalisée le plus souvent par chromatographie d'échange de cations (figure 62) ou par chromatographie en phase inverse (figure 63). Dans le premier cas la détection se fait après réaction à la ninhydrine, dans le second, les acides aminés subissent une « dérivation » préalable (OPA par exemple).

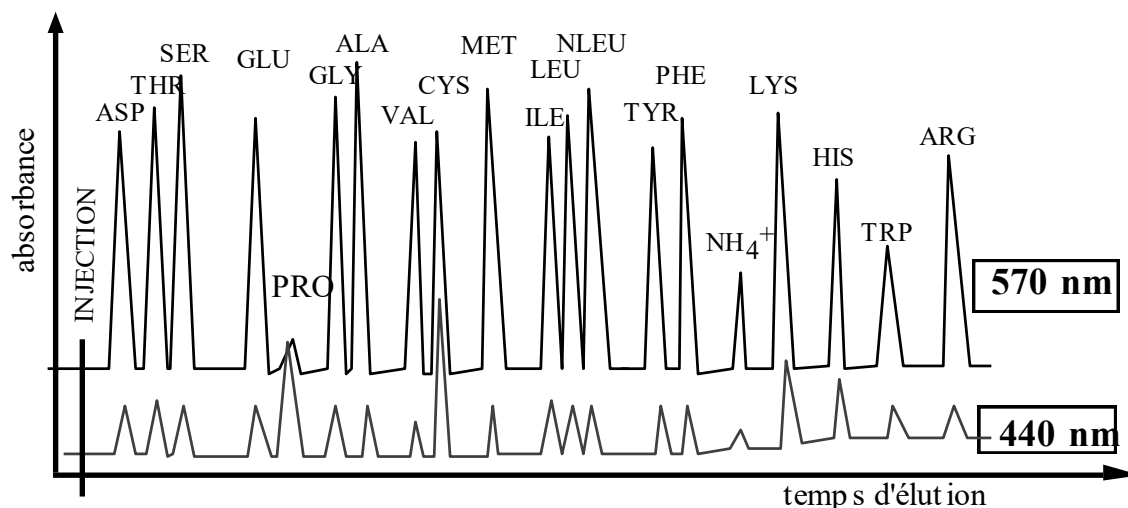


Figure 62. Chromatogramme d'acides aminés (échange de cations, réaction post colonne ninhydrine)

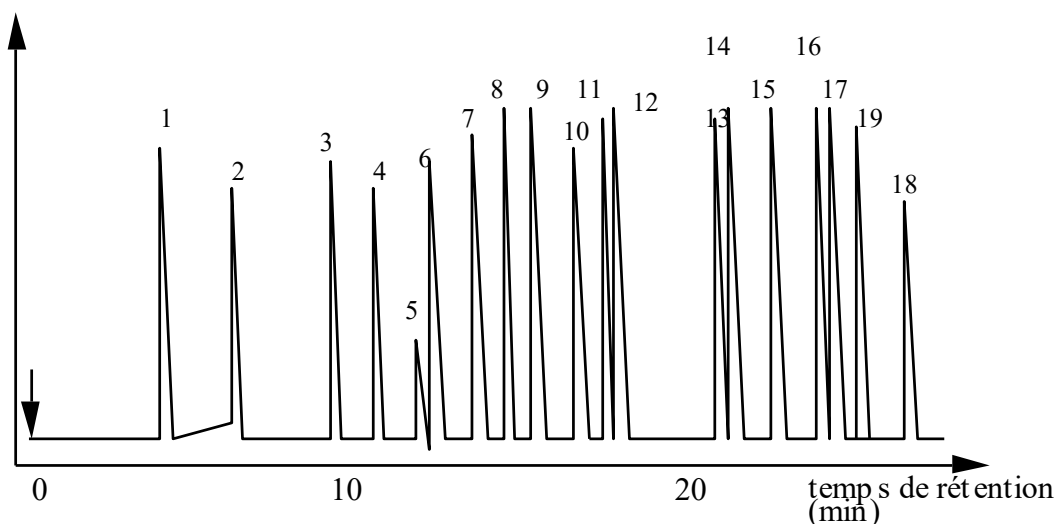


Figure 63. Chromatogramme en phase inverse (C18) des dérivés d'acides aminés.

Réactif OPA - dérivés isoindoliques ; détecteur fluorimétrique.

1.ASP, 2.GLU, 3.ASN, 4.SER, 5.GLN, 6.HIS, 7.GLY, 8.THR, 9.ARG, 10.ALA, 11.acide γ-butyrique, 12.TYR, 13.MET, 14.VAL, 15.PHE, 16.ILE, 17.LEU, 18.LYS, 19. NorLEU

Les résultats sont généralement exprimés soit

- en g d'acide aminé pour 100 g de protéine
- en g d'acide aminé pour 100 g de produit (MS)
- en g d'acide aminé pour 16 g d'azote.

Plus rarement, les résultats sont exprimés en mmole d'acide aminé pour 100 g de protéine ou 16 g d'azote ou 100 g de MS.

Pour une protéine pure et quand on connaît sa masse molaire les résultats sont exprimés en moles d'acide aminés par mole de protéine.

XVII.5. DOSAGE DE LA **DISPONIBILITE D'ACIDES AMINES OU DE DERIVES D'ACIDES AMINES.**

L'analyse des acides aminés après hydrolyse acide ne permet pas d'évaluer leur disponibilité nutritionnelle et en particulier quand des dérivés instables à l'hydrolyse sont formés. Il est donc intéressant de disposer de méthodes d'analyse *in vitro* qui sont plus rapides et plus simples à mettre en oeuvre que les méthodes biologiques. Quant aux dérivés d'acides aminés, il s'agit le plus souvent de dérivés qui se forment au cours des divers traitements technologiques auxquels sont soumises les protéines.

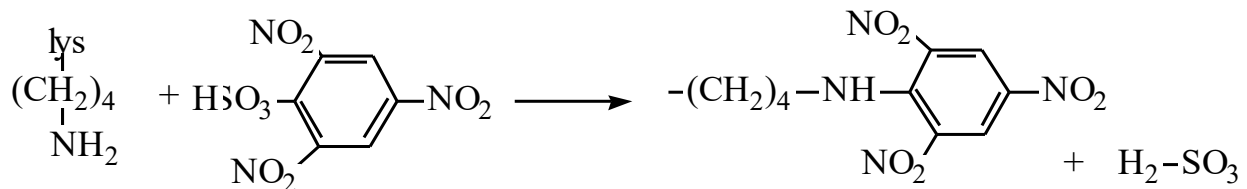
XVII.5.1. Dosage de la lysine "disponible" ou réactive.

La lysine est un acide aminé essentiel particulièrement réactif au niveau de la fonction aminée de sa chaîne latérale. Ainsi le doublet électronique présent sur son azote ϵ lui permet de réagir avec les glucides réducteurs ou les composés carbonylés (réaction de Maillard) ou encore des dérivés comme la déhydroalanine etc. Très schématiquement, les nombreux dérivés possibles des résidus de lysine présentent des structures qui correspondent soit à des liaisons isopeptidiques généralement hydrolysables *in vivo*, soit à d'autres liaisons covalentes généralement non hydrolysables *in vivo*, les deux étant situées au niveau de la fonction ϵ aminée. Par ailleurs, les modifications importantes de conformation des protéines qui accompagnent un traitement donné peuvent diminuer l'accessibilité de la lysine (mais aussi des autres résidus d'acides aminés) et donc diminuer la digestibilité (le résidu de lysine est un site d'hydrolyse par la trypsine). Les méthodes chimiques (*in vitro*) d'évaluation de l'**accessibilité** ou de la **réactivité** de la lysine sont soit **directes** soit **indirectes**. Il existe aussi des méthodes physiques rapides mais qui restent encore à améliorer (figure 64).

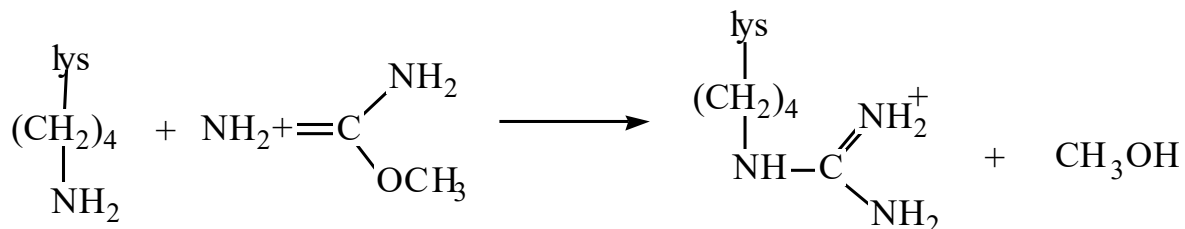
a) Méthodes chimiques directes

- la méthode proposée par CARPENTER K.J. au 1-fluoro-2,4-dinitrobenzène ou FDNB (Biochem. J., 1960, 77, 604-610 et Nutr. Abst., 1973, 43, 423-451) est la plus ancienne et encore très utilisée (figure 64). Dans cette méthode, les groupements ϵ mais aussi α NH_2 terminaux non substitués ou accessibles sont mis au contact du FDNB avec lequel ils réagissent en 2 à 3 heures à pH alcalin (tampon hydrogénocarbonate). Après hydrolyse acide, les dérivés ϵ DNP-lysine sont dosés par colorimétrie. Les dérivés DNP histidine et DNP arginine interférant dans le dosage, la mesure directe de l'absorbance permet l'estimation des dérivés DNP de LYS, HIS et ARG. Après traitement au méthylchloroformiate et extraction des DNP lysine par l'éther diéthylique, la mesure de l'absorbance correspond aux dérivés DNP de HIS et ARG.

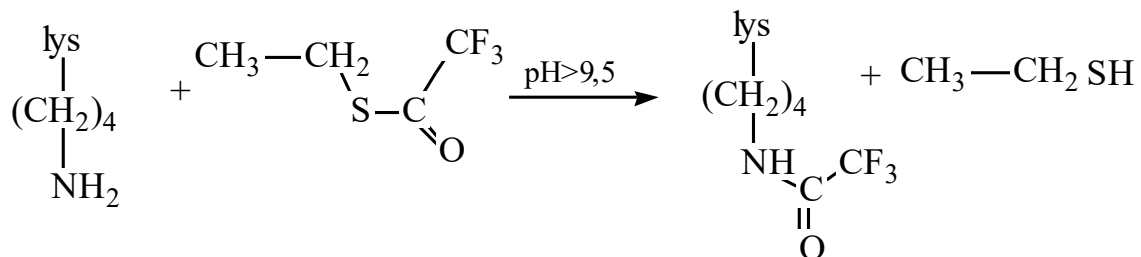
- soit par l'analyse de la lysine résiduelle après réaction en présence de FNDB et hydrolyse en milieu acide chlorhydrique. La lysine non réactive est analysée au moyen d'un analyseur d'acides aminés (méthode de SILCOCK)
- La méthode à l'acide 2,4,6-trinitrobenzène sulfonique (TNBS) est une méthode directe dans laquelle ce sont les dérivés TNP-lysine (ϵ N-trinitrophényl-lysine) qui sont dosés par spectrophotométrie UV.



- La méthode à O-méthyl isourée est une méthode relativement longue mais donnant d'excellents résultats. Après réaction à la O-méthyl isourée et hydrolyse acide, le dérivé homoarginine formé est analysé (chromatographie d'échange ionique ou en phase inverse).



- la méthode ^{19}F éthyltrifluoroacétate - RMN permet le dosage des dérivés ϵ N trifluoracétyllysine.



- la méthode par fixation de colorant (dye binding capacity : **DBC**) est celle qui s'est le plus développée au cours de ces dernières années (**HURRELL**). Dans cette méthode un colorant anionique (du type orange G) réagit avec la protéine à un pH où les fonctions aminées de la lysine sont protonées (pH voisin de 3 à 5). La mesure de l'absorbance de la solution de colorant avant et après contact avec la protéine donne la quantité de colorant fixée et donc la quantité de groupements aminés réactifs et accessibles. L'interférence liée aux résidus d'histidine et d'arginine est éliminée par réalisation d'un témoin soumis à une propionylation sélective des résidus de lysine à l'anhydride propionique.

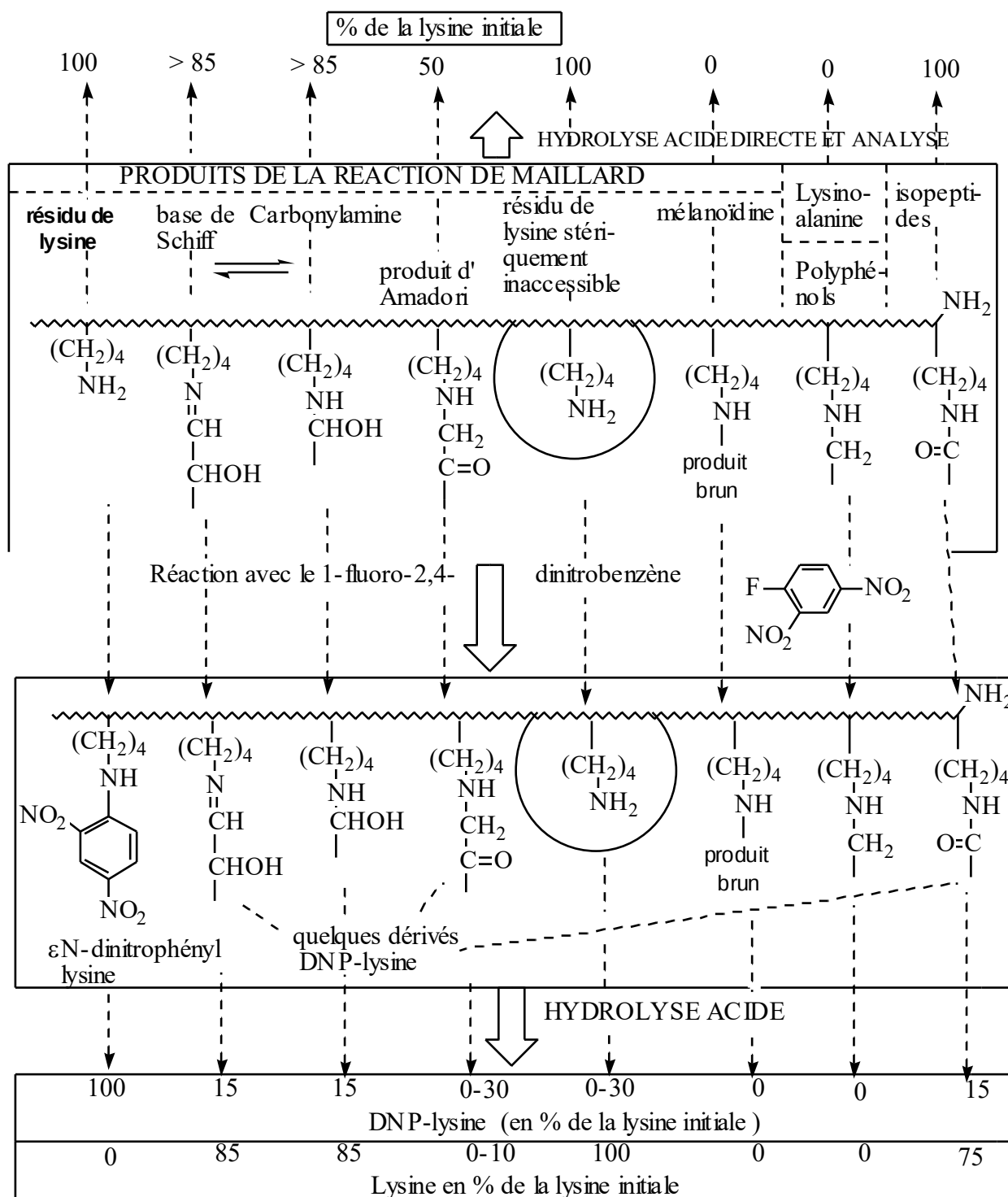


Figure 64. Evaluation de la réactivité de la lysine au 1-fluoro-2,4-dinitrobenzène (FDNB) d'une protéine ayant subi des traitements technologiques par la chaleur, en milieu alcalin ou mises en contact avec des polyphénols.

b) méthodes chimiques indirectes

Il s'agit essentiellement de méthodes dans lesquelles le groupement réactif de la lysine est mis au contact d'un réactif spécifique (FDNB, TNBS, méthylacrylate, éthylvinylsulfone). Après réaction, la protéine est hydrolysée et la lysine résiduelle dosée (lysine inaccessible). Parallèlement, la lysine totale est directement dosée après hydrolyse acide et chromatographie. La quantité de lysine réactive ou accessible est égale à la différence entre les deux valeurs précédemment obtenues.

c) méthodes physiques

Parmi ces méthodes, l'analyse infrarouge par réflectance donne de bons résultats avec les produits pulvérulents. Il existe une méthode par RMN qui semble prometteuse.

XVII.5.2. Dosage de **la méthionine et de ses dérivés d'oxydation**

La méthionine est, avec la cystéine, l'acide aminé le plus facilement oxydable. Elle peut être, à juste titre, considérée comme un excellent antioxydant protéique. Les dérivés d'oxydation sont la méthionine sulfoxyde et la méthionine sulfone (figure 65).

La méthionine sulfone est très stable à l'hydrolyse acide ou alcaline, propriété qui est à la base du dosage indirect. Par contre le dérivé sulfoxyde n'est pas stable en milieu HCl, et la méthionine s'oxyde très facilement en sulfoxyde si des traces d'oxygène sont présentes.

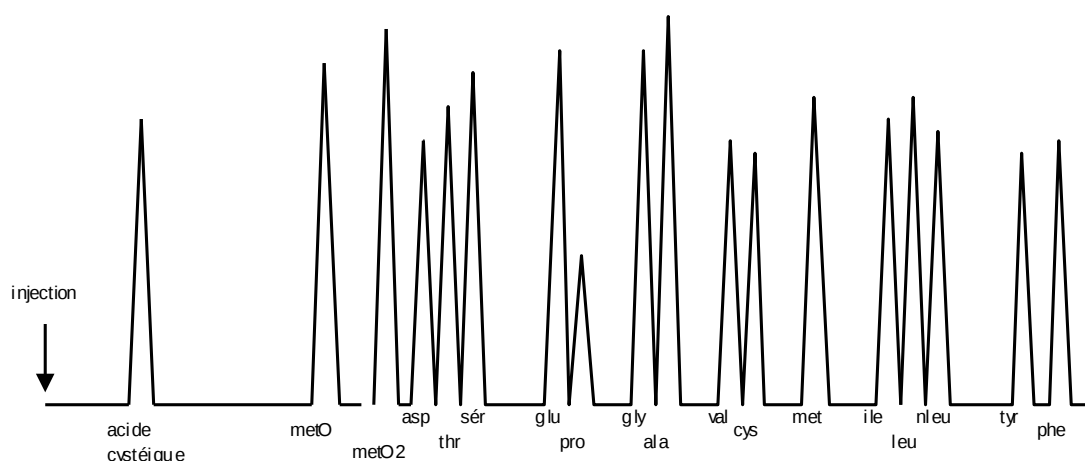
La méthionine sulfone est très stable à l'hydrolyse acide ou alcaline, propriété qui est à la base du dosage indirect. Par contre le dérivé sulfoxyde n'est pas stable en milieu HCl, et la méthionine s'oxyde très facilement en sulfoxyde si des traces d'oxygène sont présentes.

a) méthodes directes de dosage

Des méthodes physiques comme la RMN, IR par réflectance, l'ESR etc permettent, pour des protéines purifiées, de doser ou au moins de mettre en évidence la formation de ces dérivés d'oxydation. Néanmoins, ce sont des méthodes chimiques qui font appel à une hydrolyse préalable suivie d'une analyse des acides aminés qui sont actuellement les plus utilisées.

Deux méthodes d'hydrolyse des protéines ne modifient pas les proportions relatives des quantités de méthionine et de ses dérivés d'oxydation, à condition que la quantité d'oxygène résiduelle dans le milieu d'hydrolyse soit très faible. Il s'agit des méthodes d'hydrolyse à l'acide méthane sulfonique (4N, 110°C, 16 h) et à l'hydroxyde de sodium (4 M, 110°C, 16 h) (cf XV.21.b et XV.2.2).

Par chromatographie d'échange, l'ordre d'élution de ces dérivés est le suivant :



Les deux dérivés isomères du sulfoxyde (l, d) qui existent peuvent être séparés par ce type de chromatographie, ce qui conduit à un dédoublement du pic.

Dans l'analyse classique (hydrolyse acide chlorhydrique) il arrive souvent que les conditions d'élution ne permettent pas la séparation des dérivés sulfoxyde mais surtout sulfone de l'acide aspartique. Ce dernier est alors sur-évalué tandis que le dosage de la méthionine donne un résultat très largement sous-évalué.

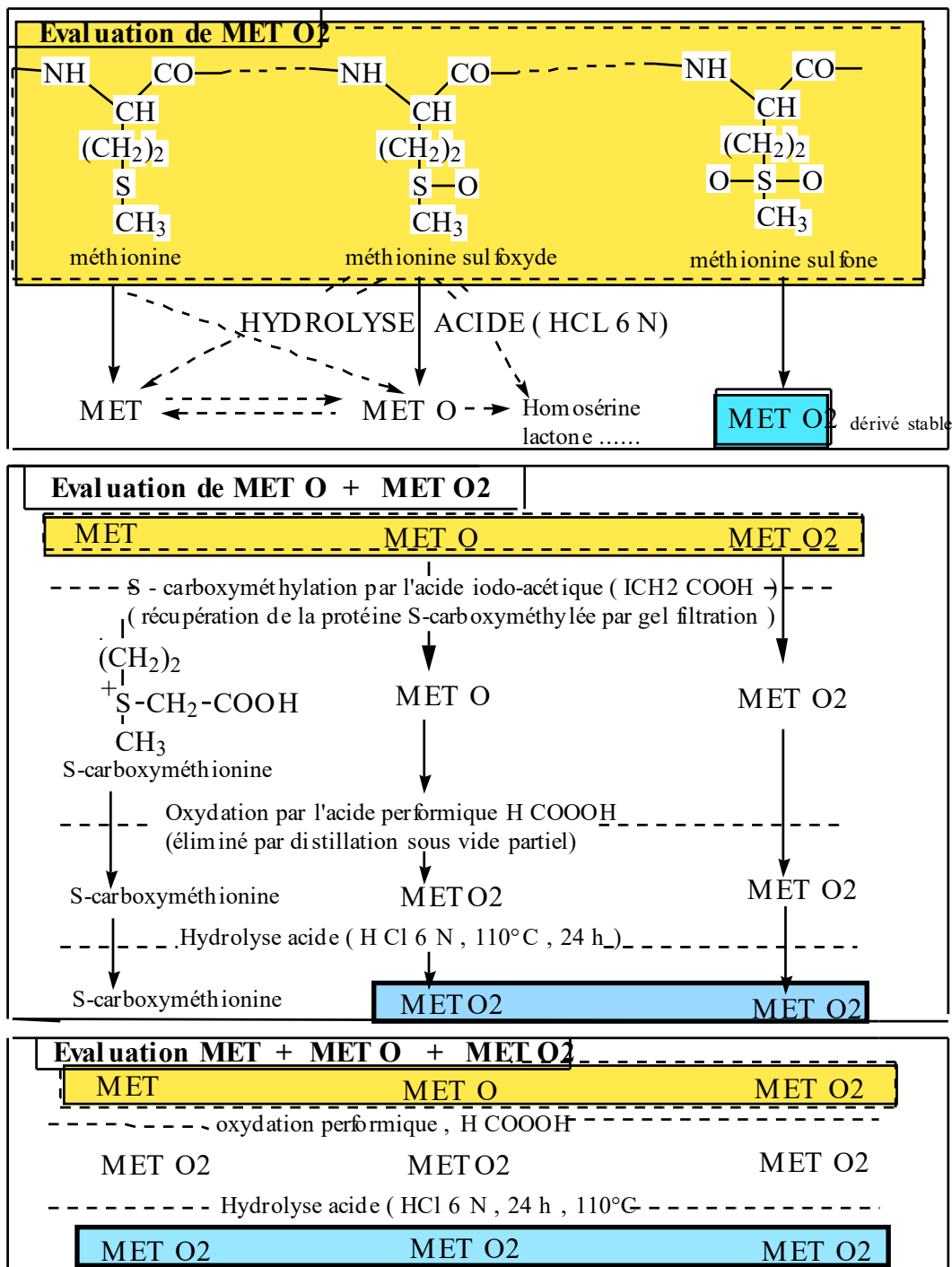


Figure 65. Les dérivés d'oxydation de la méthionine et leur dosage indirect

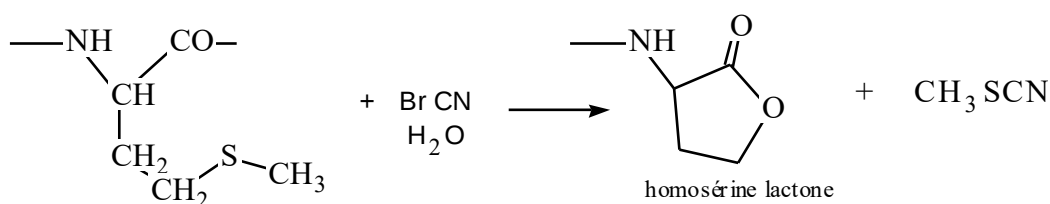
b) Méthode indirecte de dosage

Cette méthode repose sur le fait que seul le dérivé sulfone est stable à l'hydrolyse acide.

- Une première analyse réalisée après hydrolyse acide permet de doser la méthionine sulfone éventuellement présente dans la protéine (figure 52).
- Une deuxième analyse passe par une protection préalable des résidus de méthionine par S-carboxyméthylation (méthionine sulfoxyde et sulfone ne réagissent pas dans ces conditions) suivie d'une oxydation performique (mélange d'acide formique et de peroxyde d'hydrogène) puis d'une hydrolyse acide et d'une analyse de metO₂. Dans ce cas la quantité de metO₂ mesurée correspond à la somme de méthionine sulfoxyde et méthionine sulfone initialement présentes dans la protéine.

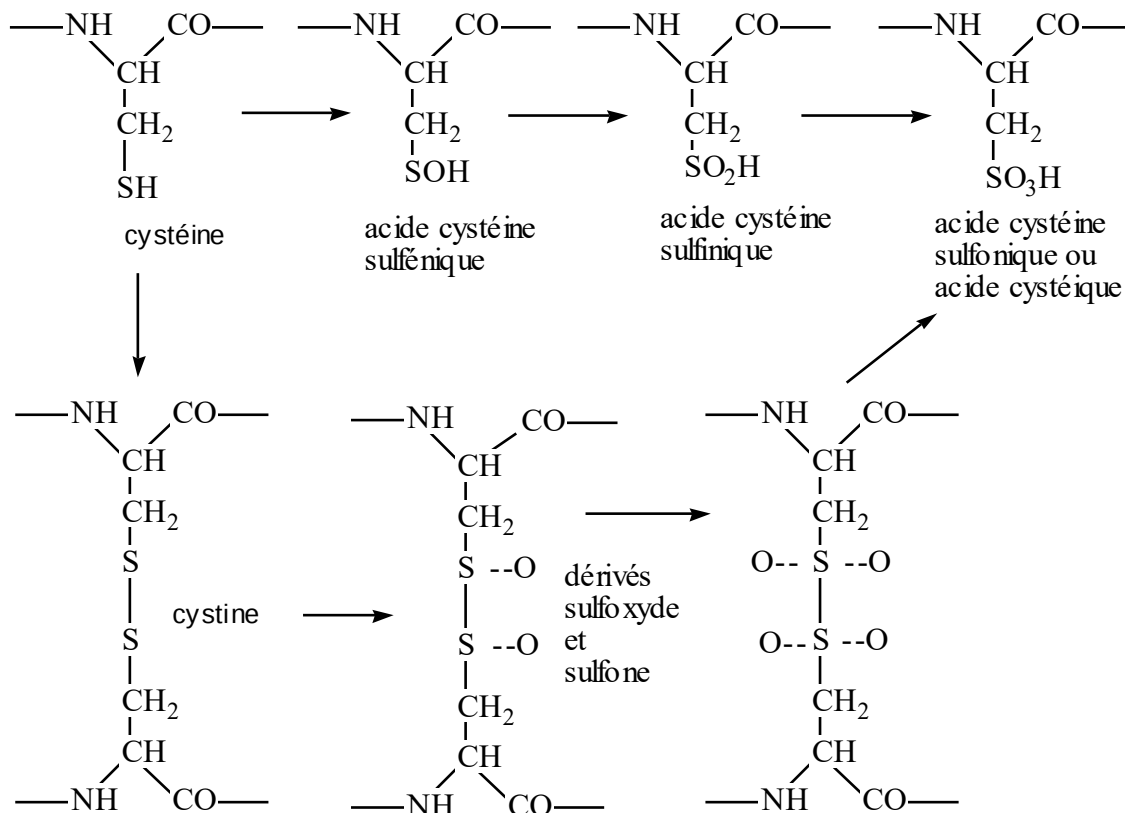
• Une troisième analyse est enfin réalisée après oxydation performique et hydrolyse acide. Dans ces conditions la quantité de méthionine sulfone mesurée correspond à la somme des quantités de méthionine, méthionine sulfoxyde et méthionine sulfone initialement présentes dans la protéine. Par ces trois analyses il est alors possible de déterminer avec précision la teneur en méthionine et en ses deux dérivés d'oxydation. Cependant cette méthode est très longue et ne peut être que rarement envisagée. Signalons que les incidences nutritionnelles de ces oxydations seront discutées chapitre XX.

L'évaluation de la **disponibilité de la méthionine** par des méthode chimiques n'est pas encore parfaitement maîtrisée essentiellement en raison du fait que cet acide aminé est surtout sensible aux réactions d'oxydation et que des méthodes de dosage satisfaisantes des dérivés d'oxydation sont à disposition des analystes. L'évaluation de la disponibilité pourrait se faire à partir de réactions telles que celle colorimétrique au nitroprussiate de sodium ou encore celle au bromure de cyanogène suivie d'un dosage du méthyl isothiocyanate par chromatographie en phase vapeur.



XVII.5.3. Dosage de la **cystéine et de ces dérivés**

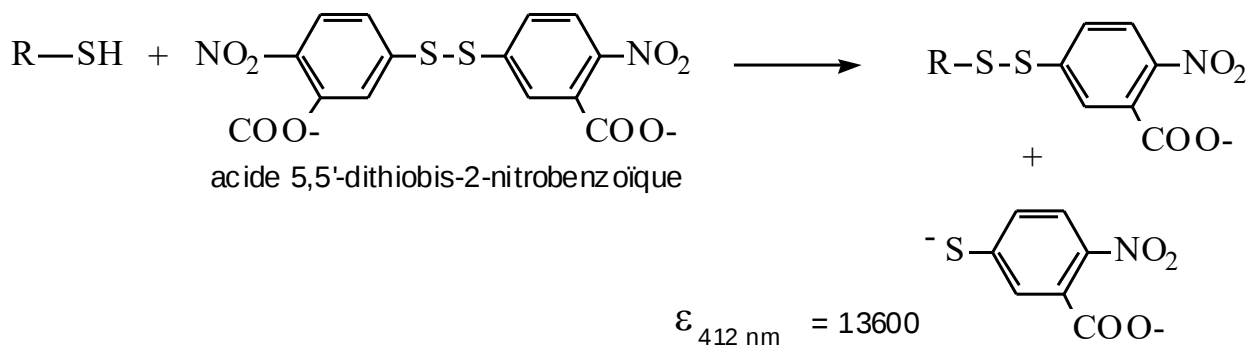
La cystéine est comme la méthionine, très sensible aux réactions d'oxydation. Les réactions mises en jeu sont complexes et très nombreuses.



Le dosage de ces dérivés dans les protéines est très complexe et seules les formes acide cystéique (obtenue par exemple après oxydation performique cet acide est stable à l'hydrolyse acide et

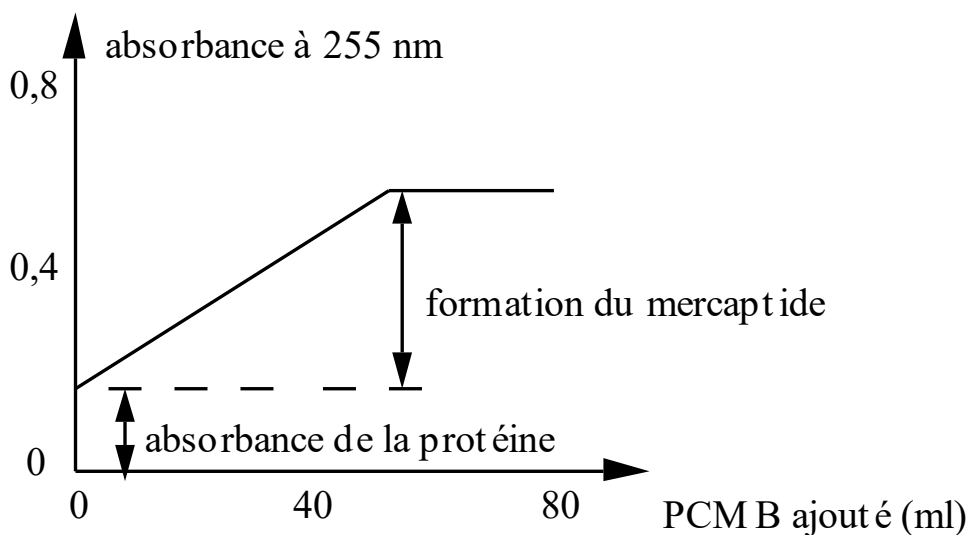
analysable par chromatographie liquide ; dans ce cas la quantité d'acide cystéique analysée correspond à l'ensemble des éventuelles "formes" de cet acide aminé), cystéine et cystine sont accessibles, parfois avec réserve, à l'analyse. La mise en évidence de certains de ces dérivés est possible par RMN.

Il existe de nombreuses méthodes colorimétriques d'analyse des thiols parmi lesquelles la méthode d'ELLMAN est la plus connue .



Dans ce dosage simple, la protéine est traitée en milieu tamponné à pH 8 (tampon tris 0,1 M, EDTA 10 mM, 8M urée) par le DTNB en solution dans un tampon phosphate 0,05 M et l'absorbance mesurée à 412 nm.

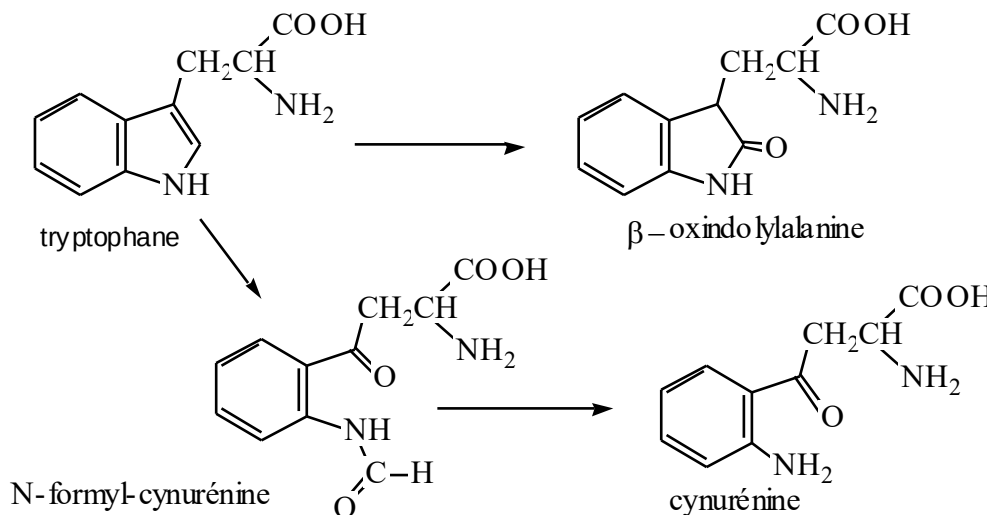
Parmi les autres méthodes de dosage on peut signaler celle au p-chloromercuribenzoate. Dans cette méthode, le PCMB forme avec les thiols un dérivé p-mercuribenzoate dont le coefficient d'extinction molaire est de 6000 à 255 nm et à pH 4,6.



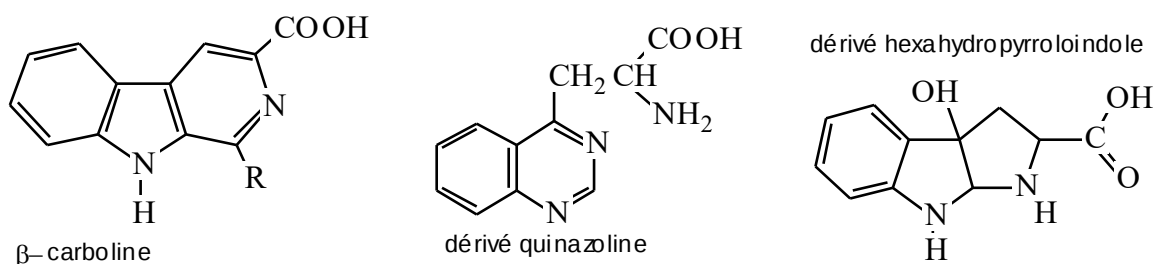
Enfin il faut signaler que la N-éthyl maléimide réagit spécifiquement avec les thiols et permet une estimation des résidus de cystéine dans les protéines.

XVII.5.4. Dosage du tryptophane

Cet acide aminé aromatique est sensible aux réactions d'oxydation et de très nombreux dérivés peuvent apparaître. Des radicaux libres sont souvent impliqués, ce qui se traduit par des propagations de réactions très complexes. Parmi les principaux dérivés formés, on peut signaler la N-formyl-cynurénine, la cynurénine ou encore la β -oxindolylalanine.



Des dérivés très complexes comme les carbolines ou les dérivés quinazolines peuvent apparaître au cours de l'oxydation de cet acide aminé (le plus souvent à chaud et en présence d'oxygène).



Le dosage du tryptophane peut être réalisé par de très nombreuses méthodes. Parmi les méthodes spectrophotométriques on peut signaler la mesure de l'absorbance à 280 nm, la méthode de SPIES et CHAMBERS au p-diméthylamino benzaldéhyde ou la réaction de SALKOWSKI après nitrosation.

Le tryptophane peut être dosé par spectrofluorimétrie ($\lambda_{\max}$ d'excitation et d'émission à 278 et 348 nm) avec une très grande sensibilité.

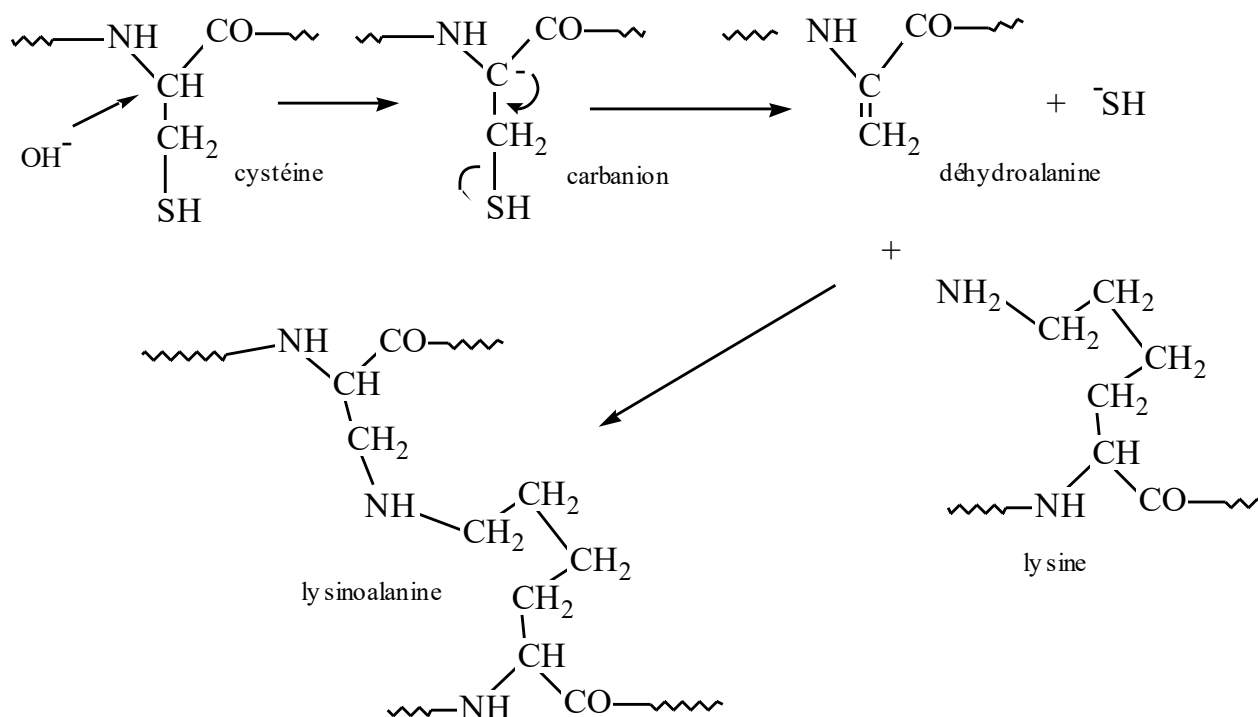
Ce sont cependant les méthodes d'analyse par chromatographie en phase liquide (échange de cations ou en phase inverse) après hydrolyse (alcaline ou en présence d'acide méthane sulfonique) qui sont les méthodes permettant le dosage le plus spécifique (cf XV.2.2 et XV.2.3).

L'hydrolyse par l'acide méthane sulfonique n'est pas applicable aux produits dans lesquels les protéines sont associées à de grandes quantités de glucides.

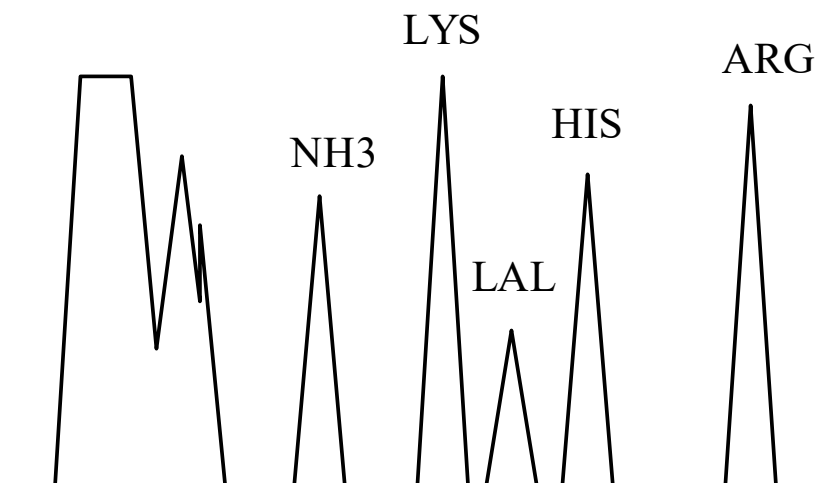
L'hydrolyse par l'hydroxyde de sodium donne d'excellents résultats. Le tryptophane peut facilement être analysé par chromatographie en phase inverse en raison de son hydrophobicité élevée et de sa facilité de détection par mesure de l'absorbance à 280 nm (colonne C 18, 25 cm, 7 mm, éluant méthanol/ eau, pH 4).

XVII.5.5. Dosage de la lysinoalanine

La lysinoalanine est un dérivé qui se forme au cours de traitements thermiques et en milieu alcalin à partir de lysine et de déhydroalanine. Ce dernier dérivé résulte d'une réaction de β -élimination avec formation d'un carbanion.

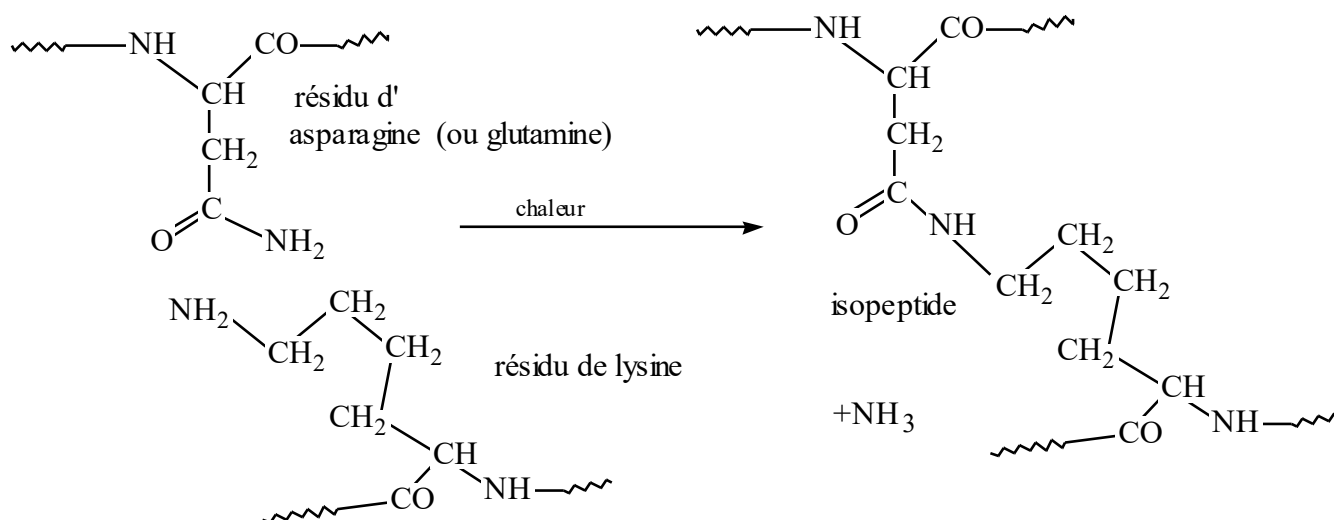


Le dosage de la lysinoalanine est réalisable après hydrolyse en présence d'acide chlorhydrique et chromatographie d'échange ionique ou en phase inverse. Par chromatographie d'échange ionique (résine polystyrène sulfoné) et réaction post-colonne à la ninhydrine, l'élution est réalisable en mode isochratique par un tampon citrate de sodium à pH 5 (0,8 M en Na^+) après équilibre de la colonne à pH 3,8 (tampon citrate 0,2 M en Na^+).



XVII.5.6. Dosage des isopeptides

Des isopeptides du type β -aspartyl-lysine ou γ -glutamyl-lysine peuvent apparaître au cours du traitement de protéines par réaction entre résidus d'asparagine ou de glutamine et résidus de lysine.

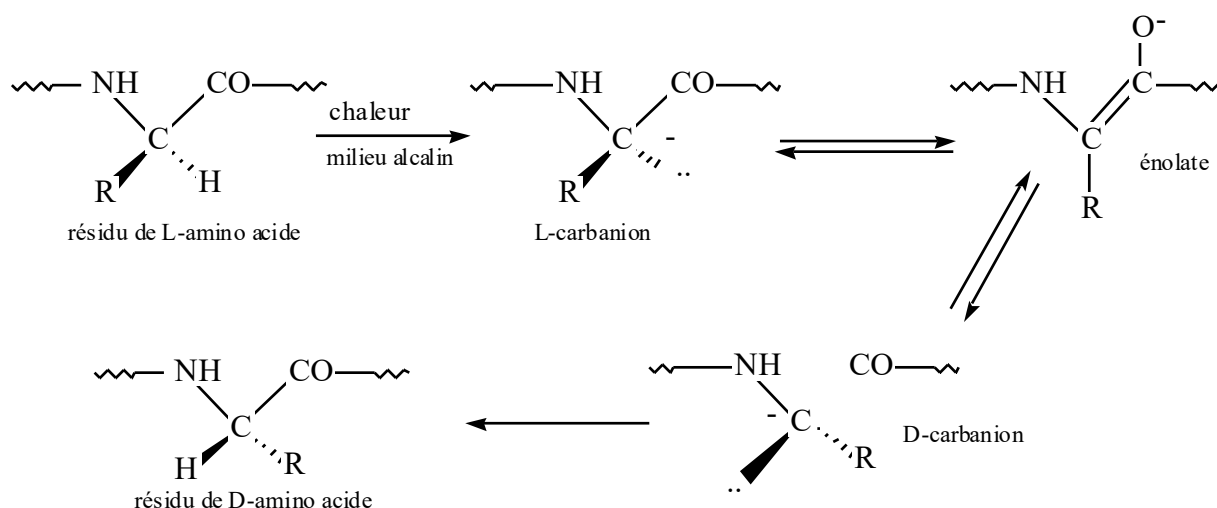


Les isopeptides, qui peuvent diminuer la digestibilité de la protéine, sont analysables après hydrolyse enzymatique de la protéine et chromatographie d'échange ionique.

XVII.5.7. Dosage des D-amino acides

De tels dérivés apparaissent au cours du traitement thermique des protéines et plus particulièrement en milieu alcalin. Le carbanion résultant de la réaction de β -élimination donne une forme tautomère de type énolate au niveau de laquelle le carbone α de l'acide aminé passe de l'état sp^3 tétraédrique asymétrique à l'état sp^2 plan sans dissymétrie.

Le retour à la forme sp^3 peut se faire de façon aléatoire, ce qui conduit à un résidu L ou D.



Le dosage de ces dérivés n'est réalisable que sur des hydrolysats obtenus par voie enzymatique ou acide.

Le dosage par voie microbiologique (*Tetrahymena pyryformis*, *Leuconostoc mesenteroides* P 60) est réalisé par mesure de la croissance (absorbance à 540 nm) avec des microorganismes (bactéries, etc.) pour lesquels l'acide L-aminé est un métabolite essentiel.

Le dosage biologique avec un animal en croissance (le plus souvent le rat) permet l'évaluation de la quantité de L amino-acide à condition que seul le L soit utilisable (L-LYS).

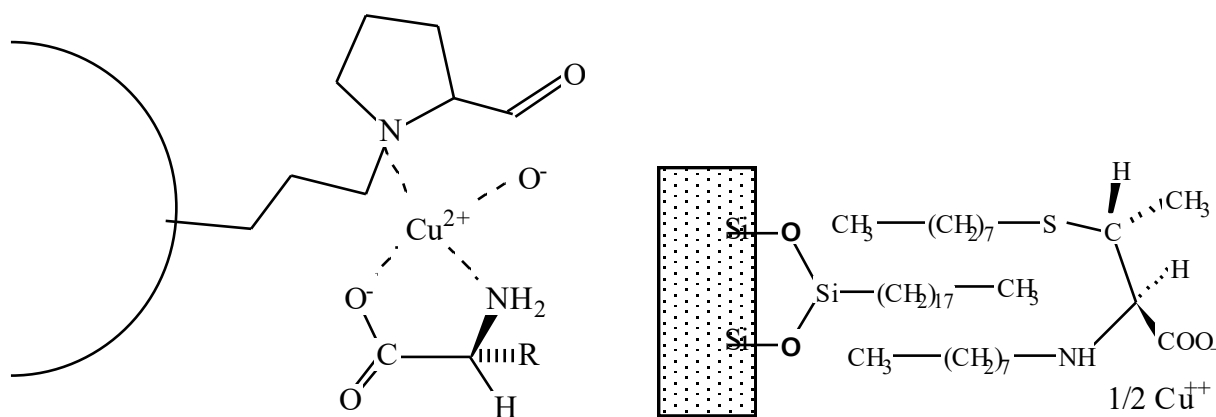
L'analyse d'hydrolysats préalablement traités ou non par des enzymes stéréospécifiques (D-amino-acide oxydase ou L-décarboxylase) puis soumis à une analyse chromatographique est une méthode indirecte relativement longue.

Actuellement c'est surtout par l'utilisation de phases chirales que ces analyses sont possibles par chromatographie en phase vapeur ou en phase liquide. (ARMSTRONG D.W., Current issues in HPLC Technology, LC.GC International, avril 1998, 22-31).

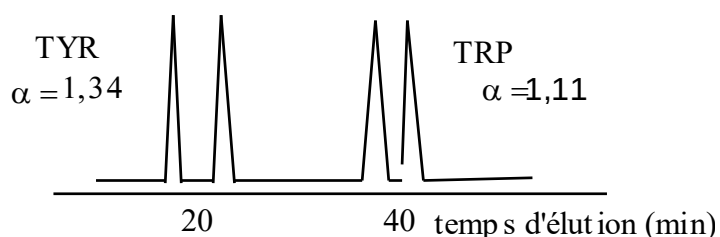
C'est W. PIRKLE (PIRKLE W.H. and HYUN M.H., J. Chromatography, 1985, **322**, 309) qui est un des principaux initiateurs des ces méthodes analytiques.

Traditionnellement c'est la séparation des énantiomères qui est considérée comme le problème le plus difficile à résoudre en chromatographie. Avant 1980 aucune solution n'était disponible. Entre 1980 et 1990 de nombreuses méthodes ont été mises au point pour atteindre de tels objectifs.

Ce sont surtout les séparations des acides aminés D et L qui ont suscité le plus de travaux. DAVANKOV et al. (Advances in Chromatography, Giddings et al. Eds, M. Dekker, New York, 1983, vol 22, p 71) ont ainsi proposé une phase stationnaire avec de la L-proline greffée. En présence de Cu^{2+} dans la phase mobile, les interactions qui s'établissent varient en fonction de l'énantiomère. Il en est de même avec des phases stationnaires silice greffée C8 en présence de composé amphipolaire à C asymétrique.

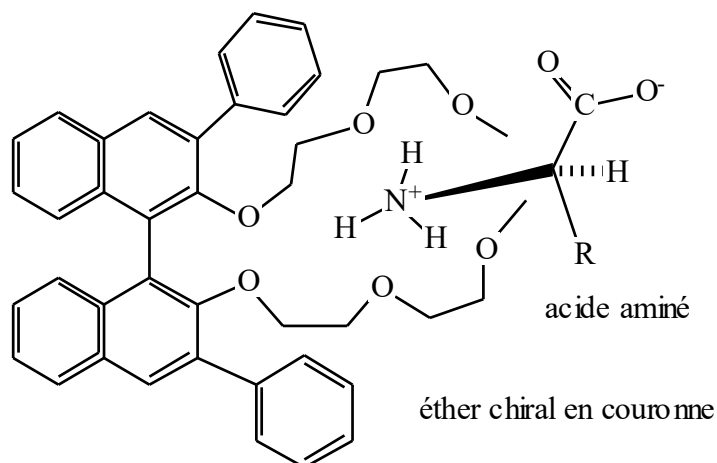


Un exemple de séparation de D et L tyrosine et de D et L tryptophane est présenté ci-dessous.



La phase mobile est constituée d'un mélange eau/méthanol (85/15) contenant 2 mM de Cu SO_4 . Le débit est de 1 ml/ min. La colonne de 15 x 0,4 cm est remplie de particules de 5 μm de diamètre. La détection

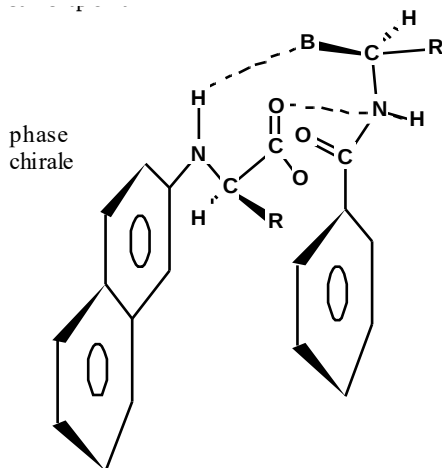
En dehors de cette méthode de séparation par échange de ligand, des phases stationnaires chirales ont été développées comme par exemple les phases polyéthers (formule indiquée ci-dessous) ou encore les phases qui contiennent des molécules complexes comme certains antibiotiques glycopeptidiques (técoplanine par exemple). Elles permettent entre autre la séparation des D et L acides aminés.



LIPKOWITZ K.B. (Intern. Lab., 1993, **15**, 8-12) a proposé une modélisation moléculaire en chromatographie chirale qui aboutit à :

$k' = A + \sum_i b_i \cdot k'$ avec A = constante, b_i moindre carré des coefficients de régression multiple.

Dans cette équation tous les échanges phase stationnaire - analyte sont pris en considération. Selon les conformation relatives des deux structures, la somme de ces échanges sera variable en fonction des possibilités stériques d'établissement de liaisons et k' sera différent selon la structure spatiale des analytes. Avec des phases comportant des carbones asymétriques, il sera alors possible de séparer des analytes qui sont des diastéréoisomères.

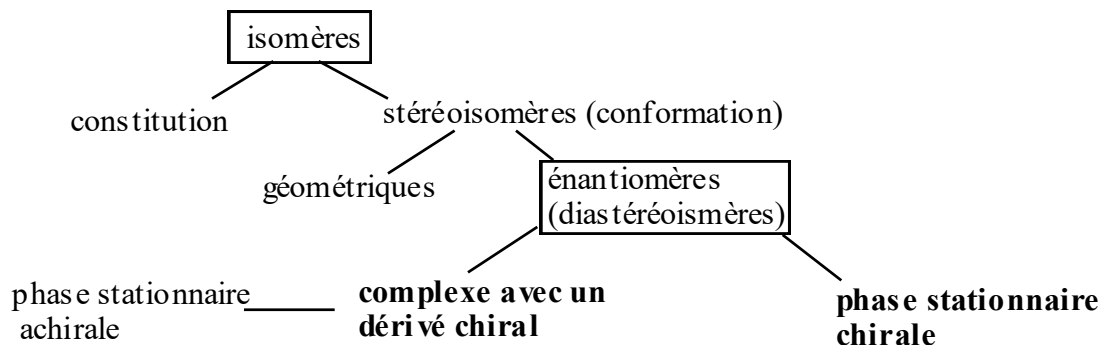


Les échanges sont qualifiés par PIRKLE de :

π donneur d'électron : analyse de sulfoxydes, lactames etc

π accepteur d'électron : analyse d'amines, alcools, acides aminés thiols etc.

Le schéma d'analyse des composés isomères est le suivant :



Il existe une classification des phases chirales basée sur les mécanismes impliqués dans la séparation des énantiomères qui est la suivante :

type	description	chimie	mécanisme
1	Pirkle	sélecteurs chiraux variés liaisons ioniques	liaisons H interactions π - π dipôle - dipôle
2	polymères hélicoïdaux	celluloses et dérivés	liaisons H complexes d'inclusion
3	cavité	cyclodextrines polyméthacrylates polyacrylamides	complexes d'inclusion
4	échange de ligand		
5	protéines	SAH, SAB glycoprotéine	interactions multiples hydrophobes

XVIII. PROPRIETES FONCTIONNELLES

XVIII.1. INTRODUCTION

Chronologiquement, la notion de propriété fonctionnelle des protéines a d'abord été liée aux rôles que ces macromolécules jouent *in vivo* (enzymes, protéines de transport, hormones, etc). Comme ces macromolécules apportent *in vitro* à nos aliments des propriétés remarquables, la notion de propriété fonctionnelle attribuée aux protéines alimentaires a pris au cours de ces dernières années une très grande importance. Un des premiers concepteurs de cette notion est **J. KINSELLA**.

XVIII.1.1. Définition(s):

Il s'agit de l'“**ensemble des propriétés non nutritionnelles apportées par les protéines à un produit alimentaire**”.

Ces propriétés conditionnent le comportement et donc l'utilisation des protéines dans les aliments au cours des technologies de production et de l'entreposage. Elles affectent entre autre **la qualité** et **l'acceptabilité**.

Ces propriétés concernent ou sont la résultante d'interactions entre les propriétés physico-chimiques et la conformation des protéines et leur environnement. Par la présence de groupements chimiques variés, les molécules protéiques sont les composants alimentaires les plus réactifs vis-à-vis des autres substances alimentaires. Elles peuvent donner des interactions avec l'eau, les glucides réducteurs ou polymères, les lipides oxydés ou non, les polyphénols, les minéraux et aussi entre elles. Ces réactions aux incidences variables sur la qualité nutritionnelle sont essentielles à l'expression de leur fonctionnalité dans nos aliments.

L'aptitude des protéines à lier d'autres composants alimentaires (composants d'arômes, eau, lipides, minéraux) joue un rôle fondamental dans la formulation de nombreux produits. Cette capacité à interagir avec d'autres substances ou avec elle même affecte les propriétés organoleptiques, d'adhésion, de formation de films et de fibres, la viscosité etc.

La capacité d'interagir, liée à des propriétés de surface, est influencée par la nature des ligands et par de nombreux paramètres tels que le pH et la force ionique. Généralement, les protéines hydrophobes diminuent la tension interfaciale et fixent des substances lipophiles telles que lipides, émulsifiants.

La capacité des protéines à fixer des lipides est très importante dans la fabrication d'analogues de viande car cette fixation confère au produit une capacité importante de fixation d'arômes et une texture agréable.

Les **propriétés fonctionnelles intrinsèques** des protéines sont fonction de:

- 1) leur composition en acides aminés
- 2) leurs structures primaire, secondaire, tertiaire et quaternaire
- 3) leur forme et de leur taille
- 4) la distribution superficielle ou interne de leurs charges et groupements polaires ou hydrophobes
- 5) la présence de liens intra et intermoléculaires.

Par exemple une proportion élevée de groupements polaires affecte les interactions interpeptidiques, l'hydratation, la solubilité et l'activité de surface. La relation entre hydrophobicité, tension interfaciale et fréquence de charge est schématisée sur la figure 66.

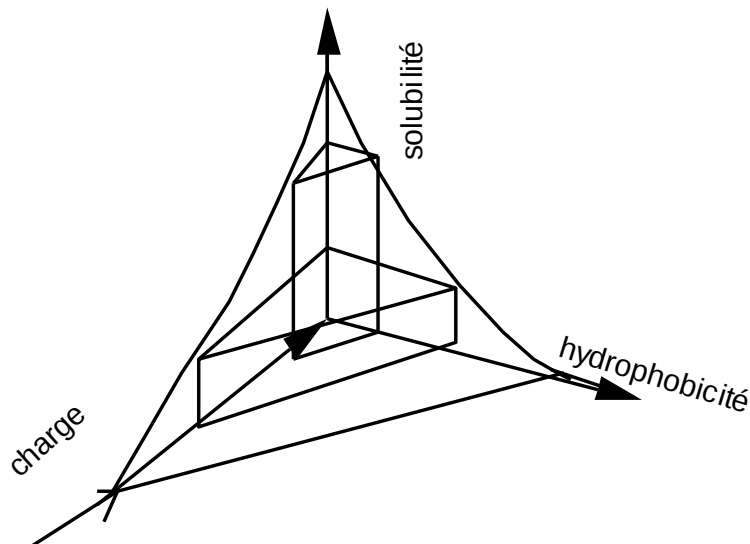


Figure 66. Relation entre solubilité, hydrophobicité et fréquence de charge (selon NAKAI et POWRIE, 1981)

Les structures tertiaires qui sont souvent stabilisées par des interactions hydrophobes jouent un rôle fondamental dans des propriétés telles qu'émulsification, fixation de saveurs et formation de mousse. Les acides aminés à chaîne latérale polaire ionisée contribuent aux interactions électrostatiques, stabilisent les protéines globulaires et jouent un rôle primordial dans les phénomènes d'hydratation, de solubilité, de gélification, et de surfactance.

Les groupements polaires non ionisables donnent des liaisons hydrogène et influencent la formation ou la destruction des hélices α et des feuillets β . Les groupements sulfhydryles sont oxydables en ponts disulfure dont les inter-échanges affectent les propriétés rhéologiques.

XVIII.1.2. Modes d'études

Actuellement les nombreuses méthodes d'étude des propriétés fonctionnelles des protéines alimentaires restent très empiriques et des méthodes de références unanimement acceptées restent encore à définir. Néanmoins, les démarches fondamentales à réaliser pour étudier la contribution des protéines aux propriétés générales de l'aliment reposent sur la réalisation soit:

- d'un modèle simple : protéine + eau protéine + lipide etc.
- d'un aliment simple : protéine + eau + lipides + sels + glucides
- ou d'un aliment réel

Ces systèmes sont soumis à des traitements correspondants à ceux que le produit alimentaire est amené à subir (stabilisation, cuisson etc.) et la contribution des protéines aux propriétés organoleptiques ou physico-chimiques de produit déterminée. Cependant il n'existe pas toujours de bonnes corrélations entre un modèle simple et un aliment et choisir un aliment modèle pour y étudier la contribution des protéines qu'il contient à une propriété donnée s'avère généralement complexe.

XVIII.1.3. Principales propriétés fonctionnelles

Les propriétés fonctionnelles des protéines alimentaires peuvent être classées de diverses manières . Nous choisissons ici de décrire successivement les :

a) propriétés organoleptiques ou sensorielles

Elles conditionnent l'acceptabilité et l'appétence de l'aliment. Leur corrélation avec la valeur nutritionnelle est importante. Elles comprennent essentiellement la *forme*, l'*aspect*, la *couleur*, l'*odeur*, la *texture*, la *saveur* et le *goût*..

b) interactions protéines - substance non protéique

Dans une première approche, ces interactions peuvent être étudiées simplement entre les protéines et un seul autre composant alimentaire. Ainsi, il est fondamental d'étudier interactions protéines - eau (dispersibilité, adsorption et gonflement, solubilité avec modification de la viscosité de la solution) qui sont communes à la plupart des produits alimentaires, exception faite des produits deshydratés. Dans ce dernier cas il est néanmoins évident que l'eau et les protéines que ces produits contenaient en l'état humide aient contribué par leurs interactions aux propriétés finales du produit sec.

Les lipides constituent, pour de nombreux produits alimentaires, un ensemble de composants abondants et les interactions protéines - lipides (dispersibilité, adsorption d'huile) sont alors très importantes à déterminer.

Les interactions *protéines - eau* et *protéines - lipides* contribuent à des propriétés dans l'aliment qui sont généralement qualifiées de **propriétés liantes**.

Les interactions protéines - glucides ou protéines - sels minéraux ou protéines - air sont rarement "binaires" et passent le plus souvent par un système intermédiaire protéine - eau , l'eau étant ensuite plus ou moins éliminée.

Les interactions *protéine - eau - huile* (émulsion) ou *protéine - eau - air* (mousse) sont étroitement liées aux **propriétés de surface des protéines**.

c) interactions protéines-protéines

Ces interactions ne se déroulent, au moins initialement, qu'en présence d'eau et sont à l'origine de la plupart des propriétés de texture. Elles conditionnent en grande partie les propriétés rhéologiques, viscoélastiques etc.

Selon les concentrations finales en eau et/ou en protéine, les produits pourront être qualifiés de solutions plus ou moins visqueuses, de **gel**, de **pâte**, de **film**, de **fibres** etc.

Ces interactions protéines-protéines sont, en association avec certaines des interactions protéines-substances non protéiques, à l'origine des **propriétés d'adhésion et de cohésion**.

Diagramme de phase (TOLSTOGUSOV)

Quand deux biopolymères A et B en solution aqueuse sont mélangés, ils peuvent, en fonction de leurs concentrations respectives, donner un système monophasique ou un système biphasique (figure 67). Le diagramme de phase permet de déterminer les concentrations respectives des deux

biopolymères qui conduisent soit à un système monophasique (pour les valeurs situées au dessous de la binodale), soit à un système biphasique (pour des valeurs situées au dessus de la binodale) dans lequel il y a **incompatibilité thermodynamique**.

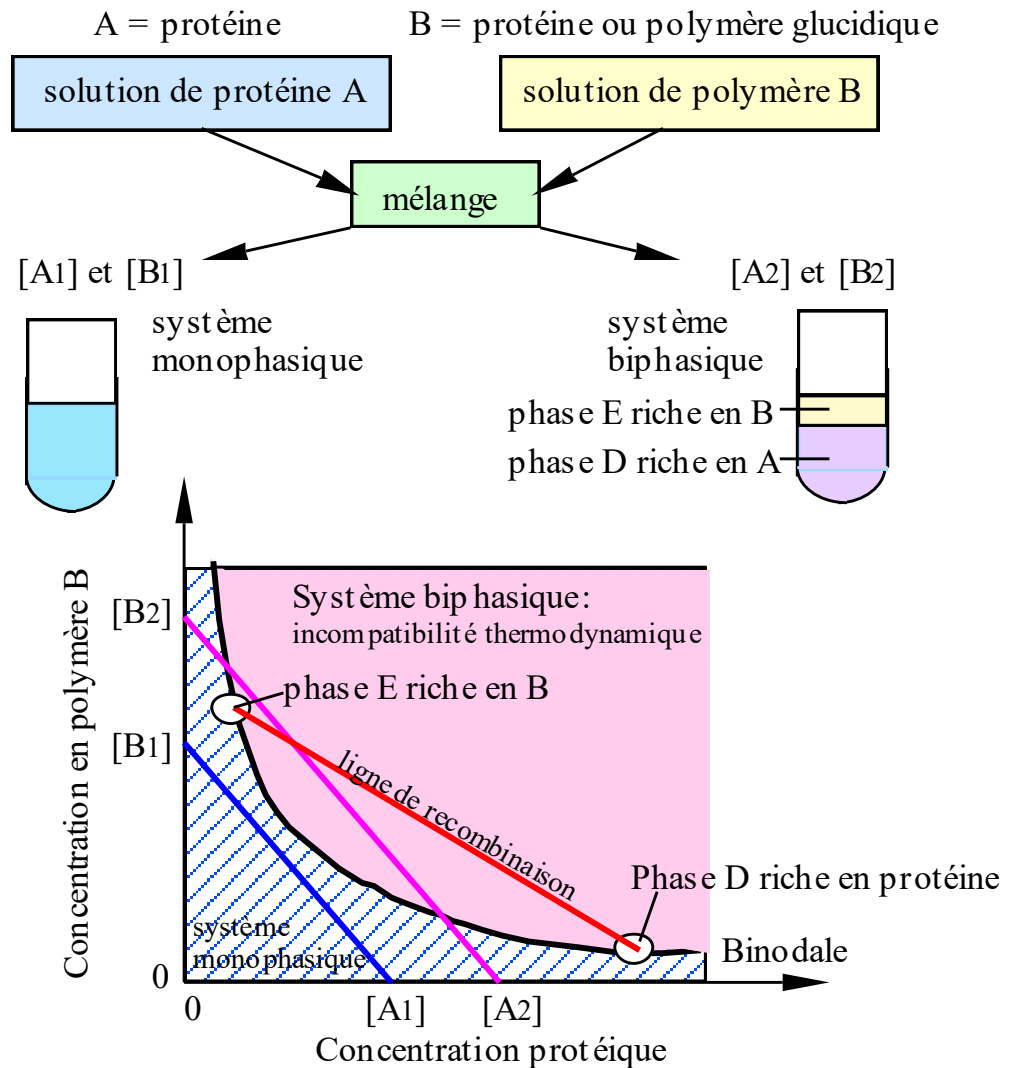


Figure 67. Diagramme de phase pour un système protéine-polymère-eau

Le diagramme de phase pour les systèmes caséine - alginate ou pectine estérifiée à 75 % - eau est présenté sur la figure 68.

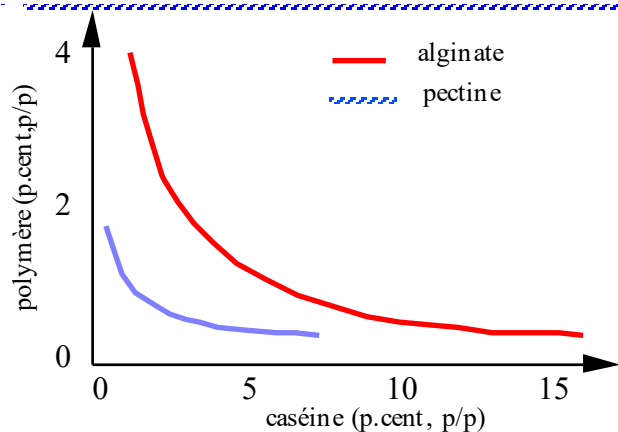


Figure 68. Diagramme de phase des systèmes caséine-alginate ou pectine-eau

Il est clair que les conditions de température, de pH, de force ionique du milieu conditionnent l'allure de ce type de diagramme. Les propriétés de tels systèmes sont exploitées pour les propriétés fonctionnelles qu'ils conditionnent.

Au-dessous de la courbe binodale il y a augmentation de l'activité thermodynamique des biopolymères au sein du système, accroissement de l'adsorption des protéines aux interfaces huile/eau, possibilité de formation de gels mixtes avec augmentation de la vitesse de gélification et du module d'élasticité. Au-dessus de la courbe binodale, il y a accroissement de l'activité thermodynamique des biopolymères dans le volume des phases coexistantes, possibilité de formation de films multimoléculaires de protéines aux interfaces huile/eau, possibilité de formation de gels mixtes et d'encapsulation de la phase la moins polaire et/ou formation de films interfaciaux de lipides.

La figure 69 schématise les principales propriétés fonctionnelles des protéines alimentaires et leurs inter-relations.

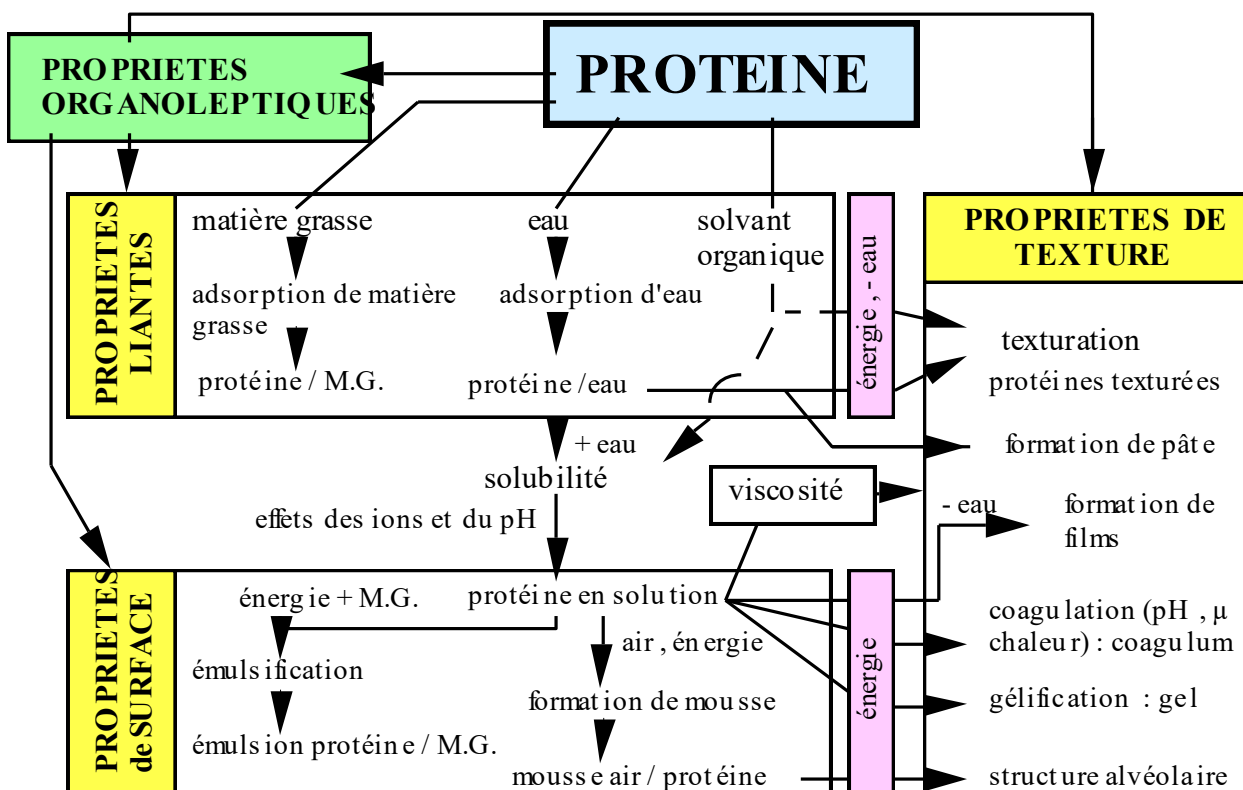


Figure 69. Principales propriétés fonctionnelles des protéines alimentaires

Il faut signaler ici que les “glycoprotéines et lipoprotéines” modifient les propriétés rhéologiques des solutions et sont utilisées pour leurs propriétés émulsifiantes ou d’abaissement du point de congélation et que le vieillissement des aliments étant lié à des modifications structurales ou chimiques des protéines, la connaissance des réactions impliquées dans ces phénomènes est nécessaire à leur maîtrise. Au cours des traitements thermiques, signalons enfin que des interactions protéines glucides fort complexes génèrent des composés d’arômes souvent jugés très agréables par les consommateurs.

XVIII.2. PROPRIETES ORGANOLEPTIQUES

Les protéines alimentaires possèdent généralement une saveur propre et entraînent souvent des modifications du goût par interaction avec d'autres composants alimentaires.

Rappelons que les principales sensations du goût sont peu nombreuses et que les récepteurs et ganglions concernés sont encore peu connus (tableau 42).

Les récepteurs du goût sont localisés sur la langue au niveau des papilles et au niveau du palais, de l'épiglotte, du larynx et du tiers supérieur de l'oesophage. Ces récepteurs sont innervés par des cellules du ganglion géniculaire du nerf facial, du ganglion pétreux du nerf glossopharyngien et du ganglion nodal du nerf vague. Les neurones sensitifs de ces ganglions innervent différentes parties de la cavité orale et répondent à différents types de composés chimiques (BOUDREAU, Naturwissenschaften, 1980, 67, 14-20).

L'activation ou l'inhibition différentielle d'un même récepteur par des composés divers induit des sensations de goûts variables comme l'aigre, le sucré et l'amer (tableau 42).

Tableau 42. Sensations du goût et leur localisation.

sensation	localisation	stimuli	récepteur	ganglion
salé	ant.langue, palais	NaCl, KCl	papilles	géniculé
aigre,acide	ant.langue, palais	acide malique	papilles	géniculé
sucré	ant.langue, palais	L-Ala, fructose	papilles	géniculé
post.langue	dihydrochalcone	papilles	pétreux	
amer	ant.langue, palais	L-Trp	papilles	géniculé
post.langue	MgSO ₄ ,phénols	papilles	pétreux	
astringent	cavité orale	théaflavine	nerf libre	trigéminal
métallique	post.langue	AgNO ₃	papilles	pétreux

La sensation **salée** est associée à des ions inorganiques présents concentration élevée en particulier avec les cations Na, K et Li.

La sensation **acide** est induite par des acides de Brönsted et des donneurs de protons à pH neutre (acides aminés ou peptides à noyau imidazole comme l'histidine).

La sensation **sucrée** ou **amère** est induite par des solutions peu concentrées de sels inorganiques, certains oses et des acides aminés comme la glycine, l'alanine et l'hydroxyproline.

L'**amertume** est liée à des acides aminés hydrophobes et à des composés comme les alcaloïdes. La sensation de goût agréable est liée à l'excitation des petites fibres des neurones des ganglions géniculés.

Thaumatine et **monelline** excitent les papilles fungiformes des bords latéraux de la langue tandis que le saccharose stimule celles de l'extrémité. Rappelons que l'amertume des acides aminés et des peptides est évaluable par l'hydrophobicité de leur chaîne latérale (NEY), sauf pour les peptides riches en glycine. ARIYOSHI a étudié la structure spatiale prédictive du goût sucré de certains peptides, tandis que BELITZ et Coll. ont déterminé les seuils de détection de plusieurs séries de composés chimiques en fonction de leur structure spatiale. Il ressort de ces travaux que le goût sucré nécessite une structure bipolaire (nucléophile et électrophile) avec un groupement hydrophobe

tandis qu'une structure hydrophobe est suffisante pour générer un goût amer. Une structure spatiale précise des composés bipolaires est cependant essentielle à l'expression du goût.

La sensation **umami** générée par certains acides aminés (glutamate de sodium, aspartate de sodium, L-amino adipate de sodium, acides L-tricholomique et L-iboténique) et par des 5'-nucléotides et leurs dérivés (IMP, GMP).

L'**astringence** est induite par des polyphénols.

L'excitation des récepteurs protéiques est liée à des interactions ioniques (sels, acides), hydrogène et hydrophobes avec le composé de goût. Les changements de conformation des protéines réceptrices liés à ces interactions engendrent l'excitation de certains neurones ganglionnaires puis cérébraux qui après intégration psychique donnent la sensation du goût (FAURION et al, Chem.Senses,1980,5, 107-121).

Le récepteur agit généralement de façon interactive au niveau d'un système intermédiaire **transmetteur de signal du type G - protéine** (protéines à nucléotide guanosidique), transmetteur dans lequel la guanosine di-phosphate est alors remplacée par la guanosine triphosphate dans la sous-unité α . Cette sous-unité se dissocie alors des autres sous-unités β et γ ce qui se traduit par une activation d'un effecteur comme l'adénylyl cyclase, phénomène suivi de la genèse d'un signal (Ennis, 1991).

XVIII.2.1. Protéines à goût propre

Il existe des protéines d'origine végétale dont le pouvoir sucrant est de plusieurs milliers de fois plus grand que celui du saccharose. La structure native de ces protéines est nécessaire à l'expression de leur propriété.

a) La **monelline** extraite des baies de *Dioscoreophyllum cumminsii* ou sérendip a un pouvoir sucrant, à poids égal, 2500 fois plus élevé que celui du saccharose (sur la base de leur masse molaire, ce pouvoir devient égal à environ 20 000 fois celui du saccharose). Cette protéine qui ne contient pas d'histidine est composée de deux chaînes polypeptidiques (de 43 et 50 résidus d'acides aminés) de séquences connues liées entre elles par des liaisons non covalentes. La masse moléculaire est égale à 11000 daltons, le pHi est voisin de 12 et la protéine perd son activité à froid et à partir de 70°C. La protéine garde son pouvoir sucrant entre pH 2 et 10.

b) La **thaumatine** est extraite du katemfe ou fruit miracle du Soudan (*Thaumatococcus danielli*). La substance mucilagineuse contenue dans la graine a un intense goût sucré qui est lié à la présence de deux protéines : les thaumatines I et II. Le pouvoir sucrant est égal à 2500 fois celui du saccharose. La thaumatine I contient 193 acides aminés, est stable entre pH 2,5 et 5,5. Tate and Lyle Limited commercialise cette protéine sous la dénomination de Talin. Cette molécule est par ailleurs un bon exhausteur d'arômes. Utilisée à 20 ppm dans des chewing gums des pet foods et des produits pharmaceutiques.

Avec ces deux protéines, la sensation sucrée persiste de 10 à 25 minutes après absorption.

XVIII.2.2. Protéines modifiant la capacité sensorielle

La protéine extraite du fruit miracle (*Synsepalum dulcificum*) rend sucrés des produits acides en modifiant les récepteurs. Cette propriété est connue depuis fort longtemps et reportée dans la littérature depuis 1852, la baie de ce fruit rendant délicieusement sucrés des fruits acides comme les citrons. La **miraculine** est une glycoprotéine basique de masse moléculaire voisine de 44 000

daltons. Sans goût propre marqué, son effet apparaît à partir d'une concentration égale à 5.10^{-8} M et diminue lentement deux heures après. Elle a été abandonnée en raison du danger de confusion acide / sucré qu'elle engendre.

XVIII.2.3. Protéines associées à des molécules diverses

C'est en raison d'une flaveur peu agréable que la consommation de la plupart des protéines d'origine végétale est actuellement limitée. Le plus souvent ce sont des composés chimiques divers formant des complexes relativement stables avec ces protéines qui sont responsables de ces mauvaises flaveurs. Pour le soja les principaux composés responsables de flaveurs peu agréables sont indiqués dans le tableau 41.

L'activité lipoxygénase de certaines graines conduit à la formation de lipo-hydroxyperoxydes dont la décomposition fournit des composés volatiles ou non, composés responsables des "mauvaises" odeurs. Ainsi le n-hexanal, le 3-cis-hexenal, le n-pentylfuran, le 2(1-pentényl)furan, et l'éthyl-vinylcétone sont les principaux contributeurs aux flaveurs d'herbe ou de fève. Les 2,4-alcadiénals ont des flaveurs de rance, tandis que la géosmine est à l'origine de la flaveur de moisi et terreuse des haricots et des isolats protéiques de soja ou autre oléagineux. Ce sont des dérivés de dégradation thermique d'acides phénoliques qui confèrent l'odeur caractéristique des produits du soja chauffés tandis que les dérivés oxydés de la phosphatidylcholine contribuent à leur goût amer.

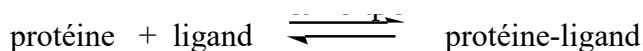
Tableau 41. Composés et mauvaises flaveurs dans les produits du soja

Mauvaise odeur	Composés responsables	précurseurs	élimination
goût amer	?	phosphatidylcholine	extraction éthanolique
goût sucré	saccharose		extraction aqueuse
goût d'herbe	composés carbonylés -turés et lipoxygénase	acides gras polyinsa- chauffage graine	extraction hexane
odeurs de cuit gaïacol p-vinylque	phénol p-vinylque acide férulique	acide p-coumarique extraction éthanolique	chauffage doux
odeur de brûlé furanes, comp. soufrés pyrazines	cétones, aldéhydes glucides réducteurs (Maillard)	acides aminés et extraction aqueuse	chauffage doux
odeur de chat	4-méthyl-4-mercapto- 2-pentanone	acétone et sulfure d'hydrogène	extraction par solvant

Les protéines de soja adsorbent environ 40 mg % d'hexanal (P/P avec une solution à 5 g de protéines pour 100 ml) ou 20 mg % d'heptanone. Les aldéhydes et cétones sont généralement moins fortement fixées que les alcools. Les protéines de soja fixent donc les dérivés d'oxydation des acides gras insaturés comme les alcanones, les alcanals et les alcools et prennent la flaveur désagréable d'herbe. Par dialyse à l'équilibre, O'NEILL et KINSELLA (J.Food Sci., 1987, 52, 98-101) ont montré que le nombre de sites de fixation pour la 2-nonanone était respectivement de 2 et de 3 pour 100 000 daltons de β -conglycinine et de glycinine avec des constantes d'association de 3050 et 540 M⁻¹. Les

mécanismes de ces interactions impliquent généralement des liaisons hydrogène ou hydrophobes. Certains des composés absorbés ne sont libérés qu'au cours de la mastication.

Rappelons que l'équilibre s'écrit :



La constante d'association K est égale à :

$$K = [PL] / [P].[L] \text{ et donc } [PL] = K.[P].[L]$$

Puisque $P_{\text{total}} = PL + P$ alors on a $[PL] = K.[L] ([P_{\text{total}}] - [PL])$

$$\text{soit } [PL] / [P_{\text{total}}] = K. [L] / 1 + K[L] = V$$

dans laquelle V est le nombre de moles de ligand liées par moles de protéines. S'il existe n sites indépendants, l'équation pour ces n sites est :

$$V = n.K.[L] / 1 + K [L] .$$

L'analyse selon SCATCHARD est effectuée en portant les variations de V/L en fonction de V tandis que la représentation de KLOTZ est liée à l'équation :

$$1 / V = 1 / n. K . [L] + 1/n$$

Il est possible d'évaluer à l'équilibre les isothermes de sorption d'un produit aromatique volatil sur une protéine par dosage au temps 0 et à l'équilibre du volatil dans l'espace de tête d'un système clos contenant le protéine et le volatil.

De nombreux facteurs contrôlant la fixation impliquent la :

- nature hydrophobe / hydrophile du composé aromatique et son éventuelle ionisation
- structure de la protéine (1aire, 2aire et 3aire) qui est fonction de très nombreux paramètres (température, pH, force ionique, activité de l'eau etc.).

Tout changement de conformation affectera les paramètres de l'interaction protéine - composé d'arôme.

Si une incorporation de protéines est réalisée dans un produit à l'arôme très caractéristique, comme un jus de fruit par exemple, il se produit une modification immédiate du goût généralement jugée comme très défavorable. Ceci résulte des phénomènes d'absorption plus ou moins importants de certains des composés responsables de la saveur.

Par contre si on supplémente une viande, la mastication libère les composés absorbés par la protéine dans la bouche; la saveur du produit est alors jugée excellente.

XVIII.2.4. Les hydrolysats et les peptides de synthèse

Les acides aminés possèdent, sous leur forme libre, des goûts qui leur sont propres, par exemple :

- glycine : sucrée
- acide glutamique : sucré, salé, acide, amer
- valine et phénylalanine : amères

- acides aminés soufrés : goût de viande rôtie

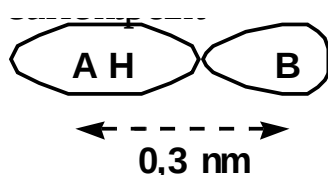
Certains dérivés d'acides aminés sont des releveurs ou exhausteurs de goût, le plus connu étant le **monoglutamate de sodium** (Food Technol., may 1987, 143-150).

Des hydrolysats partiels de protéines, généralement obtenus par traitement à l'acide chlorhydrique à des températures comprises entre 80 et 110°C puis neutralisation par de l'hydroxyde de sodium, présentent des goûts qui leur sont propres (De FEO, Properties and applications of hydrolysed proteins, Am. Biotechnol. Lab., 1986, 4, 44-47). Ces hydrolysats contiennent de grandes quantités de chlorure de sodium qui limitent quelquefois leur emploi. Les goûts obtenus par hydrolyse de certaines protéines végétales rappellent ceux des viandes et de tels produits sont proposés soit sous forme séchée soit en solution. Si l'hydrophobicité moyenne de la protéine (ou des protéines) est élevée, les hydrolysats sont généralement amers. La désamérisation peut être réalisée par élimination des peptides hydrophobes.

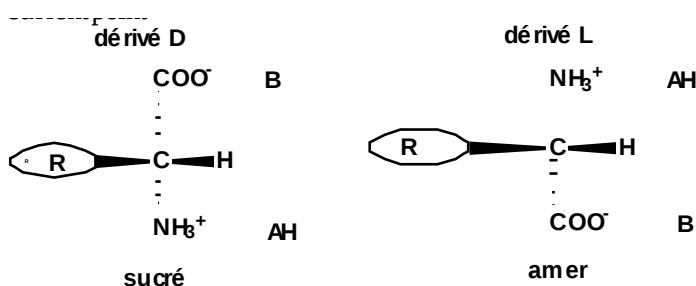
Des hydrolysats obtenus par voie enzymatique sont proposés pour des multiples applications technologiques ou nutritionnelles (ADLER-NISSEN, Enzymatic hydrolysis of soy protein for nutritional fortification of low pH food . Ann. Nutr. Alim., 1978 **32**, 205-216 ; JOST R. et MONTI J.C., Partial hydrolysis of whey protein by trypsin, J. Dairy Sci., 1977, **60**, 1387-1393). Les enzymes utilisées sont variées mais le plus souvent il est fait appel à des protéases d'origine végétale (papaïne, broméline, actinidine). La trypsine et la chymotrypsine ainsi que de nombreuses protéases microbiennes permettent également d'obtenir seules ou en association des protéolysats.

Il existe aussi des hydrolysats "traditionnels" obtenus par fermentation (ex : le shoyu est un produit traditionnel liquide extrême-oriental obtenu par fermentation de blé et de soja), ces produits étant surtout considérés comme des releveurs d'arômes de nombreux aliments.

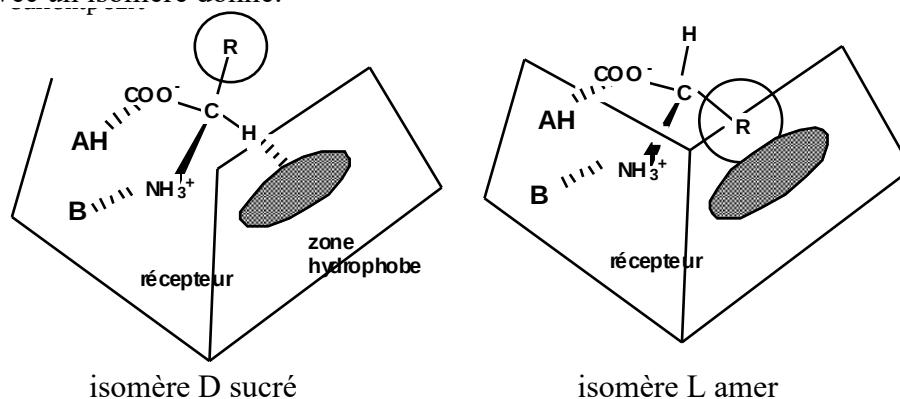
C'est **SHALLENBERGER et ACREE** (Nature, 1967, **216**, 480-482) qui ont les premiers proposé une relation entre structure moléculaire et pouvoir sucrant. En effet de nombreuses substances "sucrées" possèdent une structure du type :



Dans cette structure **AH**, donneur de liaison hydrogène, et **B** accepteur de liaison hydrogène sont distants de 0,3 nm. La présence de AH-B est seulement une condition nécessaire bien que non suffisante pour qu'existe un goût sucré. Il faut pour expliquer des différences de goût entre isomères prendre en considération d'une part l'existence d'une troisième zone hydrophobe peu directionnelle et d'autre part la flexibilité des molécules qui conditionnent leur "goût".



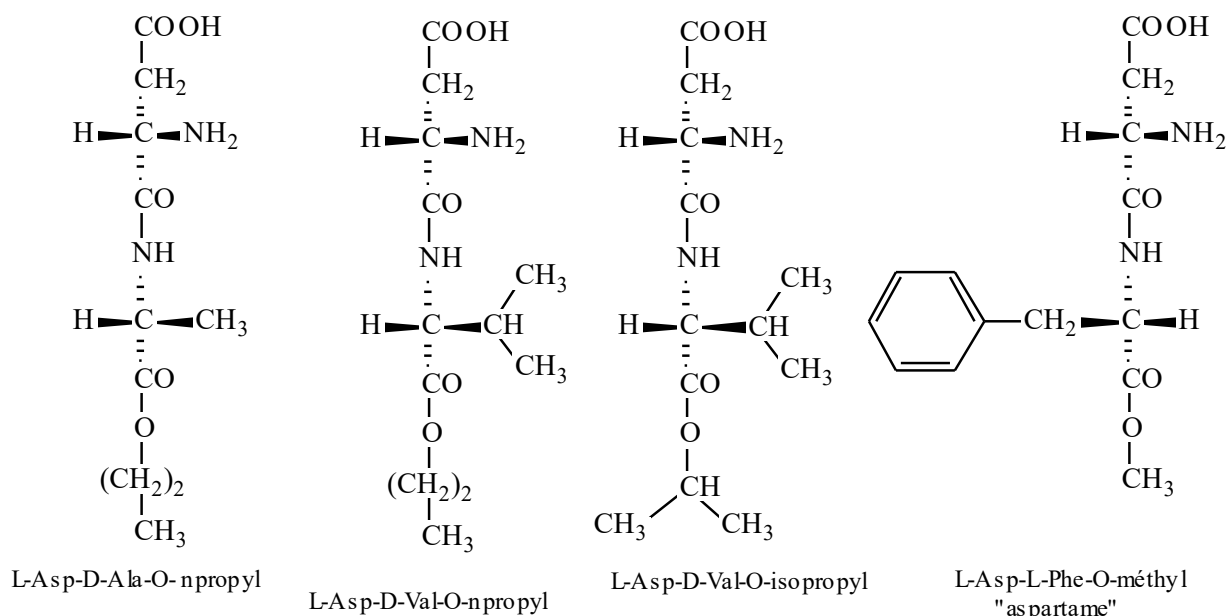
Avec les isomères d'acides aminés, il apparaît que les récepteurs protéiques du goût des AH et B sont situés dans des cavités, ce qui leur confère une asymétrie et une possibilité d'interaction très spécifique avec un isomère donné.



De nombreux peptides possèdent un goût caractéristique (GUIGOZ et SOLMS, Chem.Senses Flavor, 1976, **2**, 71-84). Ainsi l'ester méthylique de l' α -L-aspartyl-L-phénylalanine (**aspartame**) a un goût sucré égal en masse à 170 à 230 fois celui du saccharose. Ce dérivé de dipeptide n'est pas très stable en particulier à des températures supérieures à 60°C et en milieu acide (GRAVES et LUO, J.Agric.Food Chem., 1987, **35**, 439-442; VETSCH, Food Chem., 1985, **16**, 245-258; HOMLER, Food Technol., July 1984, 50-55).

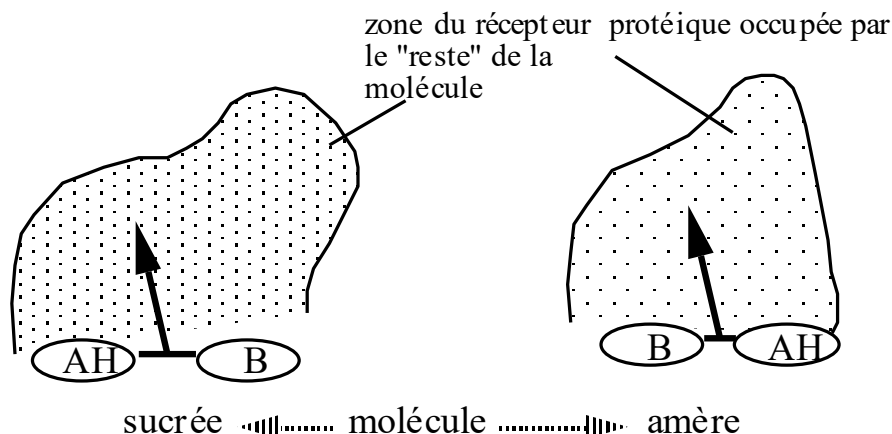
Ses propriétés biologiques ont fait l'objet de très nombreux travaux et revues (NUTTING et Coll., 5 articles dans J. Environm. Pathol. Toxicol., 1980, **3**, 341 à 395; BRUNET et Coll., Neurobehavioral Toxicol., 1979, **1**, 79-86 ; HOMLER et Coll., Food Technol., 1987, July, 41-44 ; STEGINK, Food Technol., January 1987, 119-121).

D'autres dérivés de dipeptides possèdent un goût sucré marqué comme le L-Asp-D-Val-O-nPropyl, le L-Asp-D-Val-O-isoPropyl ou encore le L-Asp-D-Ala-O-npropyl ont des pouvoirs sucrants respectivement égaux à 100, 170 et 125 fois celui du saccharose. L'ester méthylique de l' α -D-aspartyl-D-phénylalanine est amer.



Le L-Asp-D-Ala amide (Alitam) est relativement stable à chaud; son pouvoir sucrant est d'environ 2000 fois supérieur à celui du saccharose.

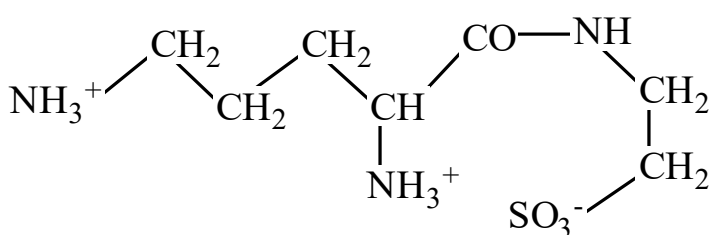
La structure spatiale des sites de reconnaissance de l'amer et du sucré décrits par de nombreux auteurs (SHINODA et OKAI, J. Agric.Food Chem., 1985, **33**, 792-795) sont schématisés ci dessous :



GARDNER (J.Sci.Food Agric., 1980, 31, 23-30) propose de calculer un indice moléculaire qui est bien corrélé avec le goût amer des acides aminés et des peptides et RIZZI (J.Agric. Food Chem., 1985, **33**, 19-24) propose un concept structural pour obtenir des peptides à goût sucré.

Certains peptides possèdent des **goûts qualifiés de délicieux** (Lys-Gly-Asp-Glu-Glu-Ser-Leu-Ala : isolé d'un hydrolysate de viande par YAMASAKI et MAEKIWA, Agric.Biol.Chem., 1978, **42**, 1761-1765), d'autres des goûts amers (Arg-Pro-Phe-Phe, NOSHO et Coll., Agric.Biol.Chem, 1985, 49, 1829-1837).

L'ornithyl taurine a peut être un goût salé (TADA et Coll., J.Agric. Food Chem., 1984, **32**, 992-996; HUYNH-BA et PHILIPPOSIAN, J. Agric. Food Chem, 1987, **35**, 165-168); il n'est pas exclu que des dipeptides et dérivés possèdent cette caractéristique organoleptique particulièrement recherchée en sciences des aliments pour des régimes hyposodés.



XVIII.2.5. Réactions de Maillard - Acides aminés précurseurs d'arômes

Il est possible de générer des composés d'arômes en réalisant une réaction de Maillard entre un (ou plusieurs) glucide réducteur et un (ou plusieurs) acide aminé. L'intérêt de cette réaction est qu'elle se produit à chaud, situation dans laquelle les composés aromatiques initialement présents dans un produit alimentaire donné sont soit modifiés soit "distillés". Il s'agit donc d'une réaction qu'il est possible de réaliser au cours du traitement thermique d'un aliment, les acides aminés et glucides se comportant comme des **précurseurs d'arômes**.

Les résultats présentés dans le tableau 43 montrent quelques possibilités parmi les multiples combinaisons possibles de "synthèse" de composés aromatiques par cette voie.

Tableau 43. Mélanges précurseurs d'arômes par réaction de Maillard

Acide aminé	glucide ou autre	arôme ou goût généré
cystéine	ribose	boeuf rôti
cystéine	acide ascorbique	poulet
isoleucine	acide ascorbique	cèleri
lysine	glucose	pain
sérine	glucose	chocolat
alanine	glucose	caramel
méthionine	glucose	pomme de terre
phénylalanine	glucose	fleuri
leucine	fructose	biscuit-fromage
leucine-phénylalanine	fructose	chocolat

XVIII.3. SOLUBILITE (Cf chapitre IX)

Il s'agit d'une propriété fonctionnelle très importante qui conditionne souvent d'autres propriétés. Elle est évidemment à considérer avec beaucoup d'attention pour l'incorporation de produits protéiques au cours de la préparation de boissons. Dans ce cas ce sont surtout le **pH** et le couple **temps - température** qui sont les paramètres fondamentaux. L'influence des paramètres **force ionique** et **nature des protéine** et **nature des sels** sont à prendre à considération. Les effets de ces paramètres non indépendants sont généralement déterminés par la mise en place de plans d'expérience.

Les expressions les plus courantes de la "solubilité" sont les suivantes :

- **Indice de Dispersibilité dans l'eau**..... $\frac{\text{g protéines dispersées}}{100 \text{ g protéines}}$
- **Indice de solubilité de l'azote**..... $\frac{\text{azote soluble}}{\text{azote total}}$
- **Indice de solubilité des protéines**..... $\frac{\text{Protéines solubles}}{\text{Protéines totales}}$
- **Protéines dispersibles dans l'eau**..... $\frac{\text{g protéines dispersées}}{100 \text{ g de solution}}$
- **N soluble**..... $\frac{\text{g d'azote}}{100 \text{ g de solution}}$
- **Protéines solubles**..... $\frac{\text{azote soluble}}{6,25}$

Il n'existe pas de méthode officielle parfaitement standardisée de la solubilité. Ainsi la mise en solution (concentration, volume, température, granulométrie des préparations, pH, température, temps, force ionique, nature et taille du récipient, moyen et mode d'agitation) et les paramètres de centrifugation (temps, nombre de g, température) doivent être parfaitement décrits.

XVIII.4. RETENTION D'EAU ou ADSORPTION D'EAU

Cette propriété d'hydratation est très importante. Elle correspond à la “prise d'eau” d'un produit protéique, cette prise accompagnée de gonflement étant comprise entre 1 et 4 ml par g de protéine. Le complexe hydraté au niveau des chaînes latérales des résidus d'acides aminés confère au produit une texture souvent recherchée. Pour les produits carnés cette propriété est corrélée à la **jutosité**, la **consistance** et la **compacité**. Cette propriété est corrélée aux transferts d'eau se produisant au cours de la cuisson ou de la décongélation.

Il existe de nombreuses méthodes d'évaluation de cette capacité de rétention d'eau. La mesure de la quantité d'eau adsorbée par l'appareil de BAUMANN est une des plus utilisées (figure 70).

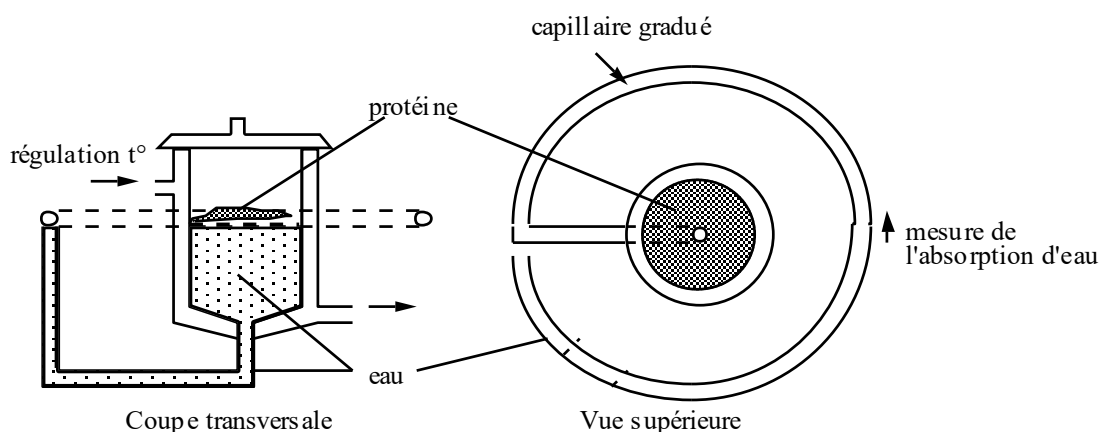


Figure 70. Schéma de l'appareil de BAUMANN

Avec cet appareil il n'existe pratiquement pas de variation de pression hydrostatique. L'eau absorbée par les protéines au travers d'un fritté est mesurée en fonction du temps au niveau d'un tube circulaire situé dans le même plan que la préparation protéique.

Pour une protéine donnée, les cinétiques d'absorption varient surtout avec la granulométrie, la température et la teneur initiale en eau de la préparation. Les types de courbes obtenues sont schématisées sur la figure 71. La vitesse initiale d'adsorption, mesurée par la pente à l'origine, reflète l'hydrophilicité de surface des particules protéiques testées. Plus celle-ci est importante (nombre de sites et présence de sites très fortement hydrophiles du type polaire ionisé par exemple) et plus cette vitesse est grande. Le niveau d'équilibre (plateau) reflète la capacité totale de la préparation protéique à adsorber de l'eau. Les protéines sont ainsi aptes à adsorber des quantités d'eau qui vont de 2 à 4 fois leur masse sèche, cette quantité dépendant de très nombreux paramètres (séquence, pH, μ , t° , granulométrie, etc.).

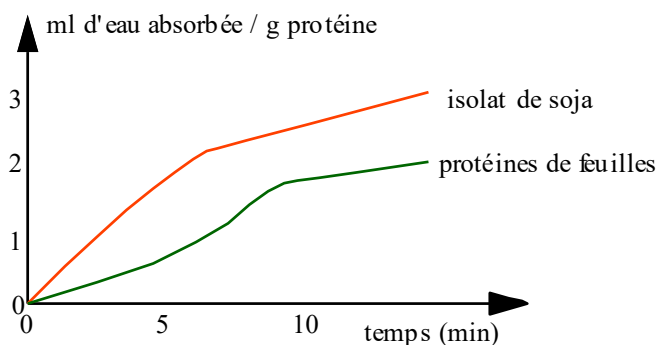


Figure 71. Variations de l'absorption d'eau de protéines végétale en fonction du temps (25°C ; particules de 70 μm ; teneur en eau initiale 7% ; appareil de Baumann)

Ainsi pour un isolat de soja l'absorption d'eau en fonction du pH et de la température peut être matérialisée par une "surface de réponse"(figure 72).

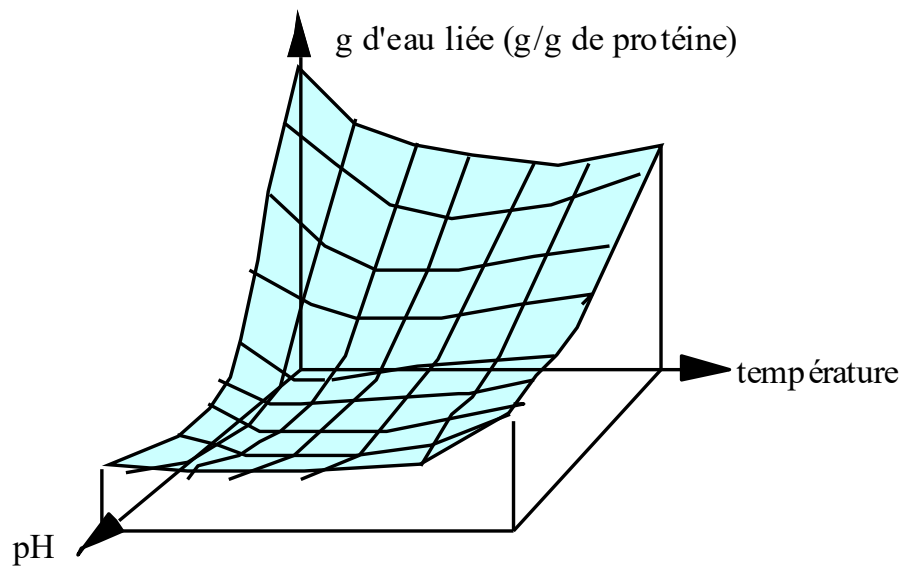


Figure 72. Surface de réponse de l'absorption d'eau en fonction du pH et de la température .

Il existe des relations étroites entre l'absorption d'eau et d'autres propriétés fonctionnelles. Cependant, il s'agit de relations qui diffèrent d'une protéine à une autre et ce, dans un même système.

XVIII.4.1. Effets des polymères protéiques sur les propriétés de l'eau

Les protéines ont un effet structurant (ou anti-structurant) sur l'eau. Le champ magnétique créé par ses régions chargées dans l'environnement solvant oriente les molécules d'eau ce qui contribue à l'augmentation de viscosité. Les techniques de RMN (résonance magnétique nucléaire) et de relaxation diélectrique permettent d'évaluer le niveau de mobilité des molécules d'eau dans une solution protéique. Avec l'eau pure les coefficients de diffusion translationnelle (D_{trans}) et rotationnelle (D_{rot}) sont égaux à :

- $D_{\text{trans}} = 2,5 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$ (diffusion selon un gradient de concentration)
- $D_{\text{rot}} = 10^{11} \text{ sec}^{-1}$ (fréquence de réorientation des molécules)

Les molécules d'eau interactives avec les protéines bougent avec ces dernières . Avec une protéine globulaire la mobilité de l'eau serait de :

- $D_{\text{trans}} = 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$
- $D_{\text{rot}} = 10^6 \text{ sec}^{-1}$

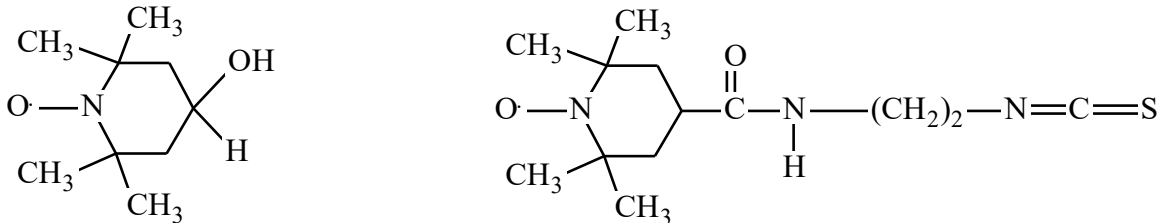
XVIII.4.2. Dynamique de la relation protéine - environnement

Par la méthode de sondage par spin en RPE (résonance paramagnétique électronique) il est possible de suivre la mobilité de **sondes** paramagnétiques (tempol à radicaux nitroxydes) dans des solutions protéiques ou encore celle de la protéine par des **sondes fixées** par liaison covalente sur des résidus

de lysine (nitroxylation). Les caractéristiques spectrales permettent de calculer le temps de corrélation rotationnelle τ_c de ces sondes et d'en déduire D_{rot} .

$\tau_c = 1 / 6.D_{rot}$ τ_c est lié à la forme de la molécule étudiée, à la viscosité du solvant, à la température et aux interactions soluté - solvant.

Les sondes utilisées ont des structures qui sont du type :



Il est possible de déterminer la proportion de chaînes mobiles et le D_{rot} en fonction du niveau d'hydratation (figure 73). Avec un isolat de soja, il apparaît que les chaînes latérales deviennent mobiles à partir d'une teneur en eau de 0,25 g par g de protéine sèche. La proportion de chaînes mobiles dépend de leur environnement stérique mais cette mesure est aussi fonction de la nature du marqueur. La fréquence de réorientation (D_{rot}) augmente de façon linéaire avec l'hydratation.

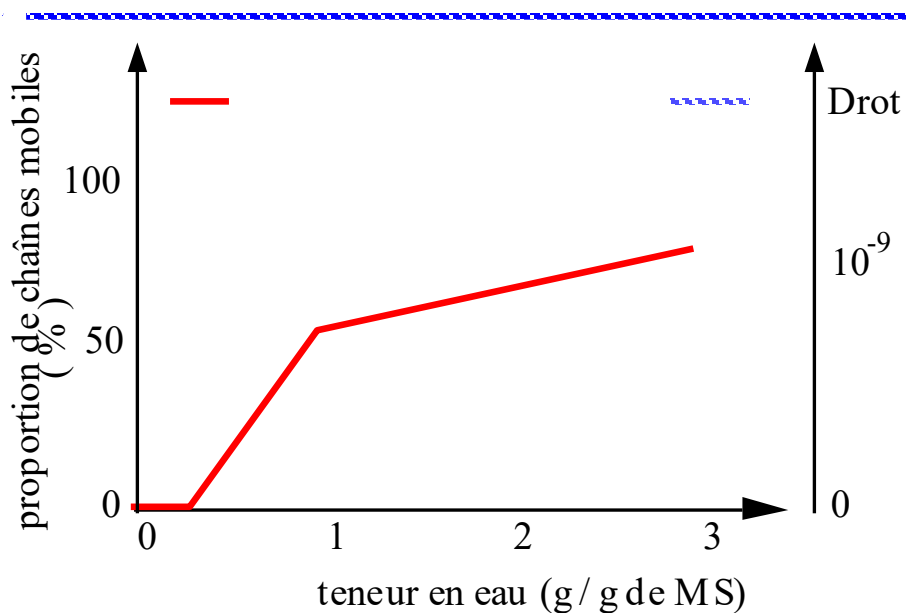


Figure 73. Mobilisation de chaînes protéiques et fréquence de réorientation en fonction de la teneur en eau

La mobilité d'une macromolécule peut être caractérisée par la **transition vitreuse** qui est une variation brutale de la viscosité du milieu (phénomène du second degré). Quel que soit le milieu elle se produit pour une viscosité de 10^{14} Pa.s. La température pour laquelle elle se produit T_g (température de transition vitreuse) dépend de la protéine et du solvant (figure 74).

Le **phénomène de transition vitreuse** est souvent mis à profit pour obtenir, à partir de biopolymères, une texturation donnée. L'exemple le plus classique est celui de l'extrusion qualifiée de thermoplastique. Cette démarche repose sur l'évolution de la structure spatiale des macromolécules qui présentent souvent, dans des conditions de température et de teneur en eau définies, un arrangement régulier sous forme de réseau cristallin ou partiellement cristallin. Sous l'effet de la température et pour une teneur en eau donnée; il se produit une fusion de ces zones cristallines qui peut être comparée à une transition liquide-solide (T_f).

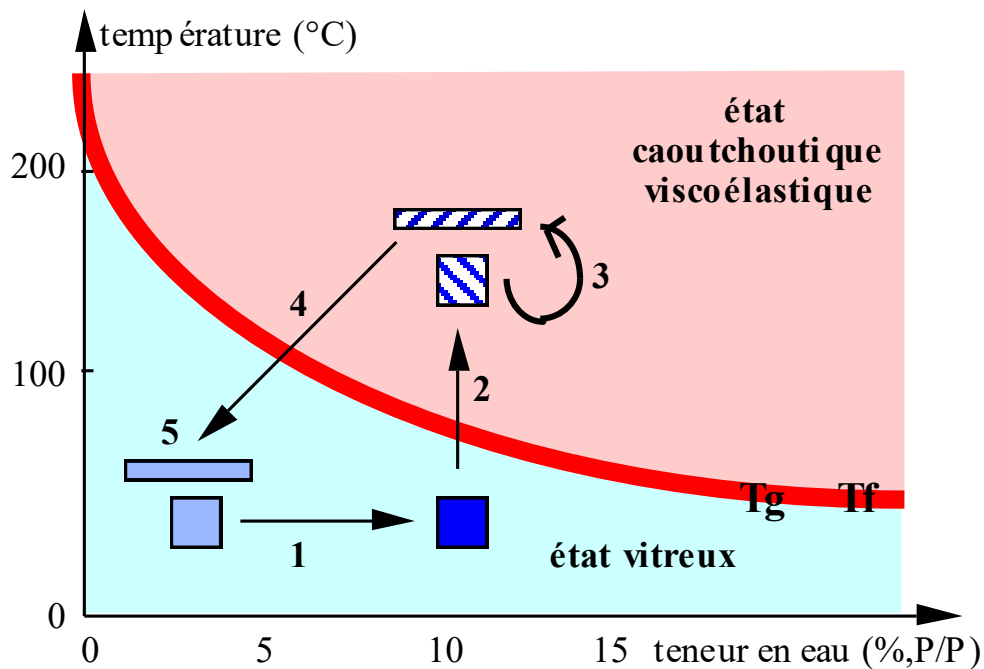


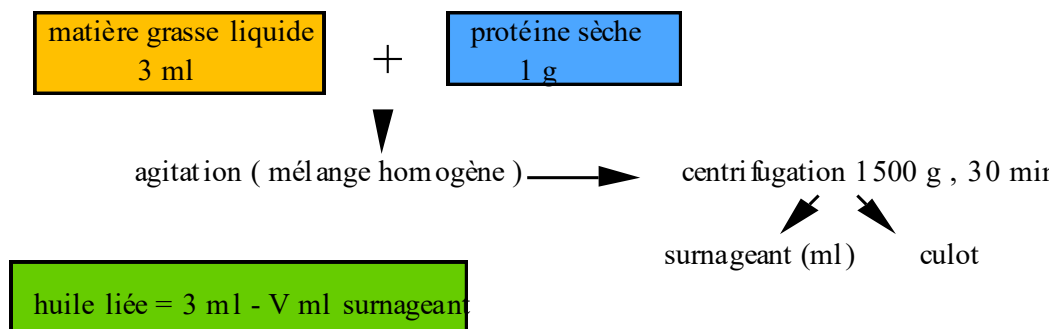
Figure 74. Variation de la température de transition vitreuse d'un biopolymère en fonction de sa teneur en eau (1: hydratation, 2: augmentation de température, 3: mise en forme, 4: refroidissement et séchage, 5: produit formé).

Le passage d'un état vitreux stable à un état caoutchoutique intervient à une température qui est qualifiée de température de transition vitreuse (T_g). T_g est déterminable par analyse thermomécanique dynamique (ATMD) ou par analyse enthalpique différentielle (ATD).

A la température de transition vitreuse le matériau change de propriétés (optiques, mécaniques, diélectriques, mécaniques, perméabilité aux solutés et aux gaz, etc.) car ses constituants moléculaires deviennent plus mobiles sous l'effet de la température et en présence d'une certaine quantité d'eau ; le système tend à se désorganiser par diminution du nombre et/ou de l'intensité des liaisons intermoléculaires. Le polymère est malléable au-dessus de T_g et visqueux au-delà de T_f . Au-dessus de T_g , il peut ainsi être soumis à des contraintes mécaniques qui permettront la mise en forme, cette dernière se stabilisant par retour en-dessous de T_g .

XVIII.5. RETENTION D'HUILE ou ADSORPTION D'HUILE

Texture et jutosité dépendent en partie de cette propriété. En charcuterie, l'emploi de protéine à forte capacité de rétention d'huile permet de minimiser les exsudations défavorables à l'aspect ou au toucher (sensation de gras). Pour évaluer cette propriété il est possible de procéder selon le schéma :



Les quantités d'huile adsorbée varient selon les protéines. Elles sont par exemple de 1,8 et 0,8 ml / g de protéine respectivement pour les protéines de luzerne et les protéines de soja. Cette propriété est très étroitement corrélée à l'hydrophobicité de la protéine.

XVIII.6. PROPRIETES VISCOELASTIQUES

Ces propriétés sont à l'origine de la “**structure**” de l'aliment. Par exemple une structure de type gel retient l'eau et la matière grasse. Les protéines, de par leur structure polymérique multifonctionnelle, permettent le contrôle des propriétés viscoélastiques de très nombreux systèmes alimentaires.

XVIII.6.1. Si la **concentration protéique est faible** (jusqu'à 10 g / l), la **viscosité** de la solution augmente avec la concentration et pour des valeurs éloignées du pHi. Plus la protéine est étirée et/ou plus la protéine est chargée (répulsion), plus la viscosité est grande (figure 75): **épaississants**.

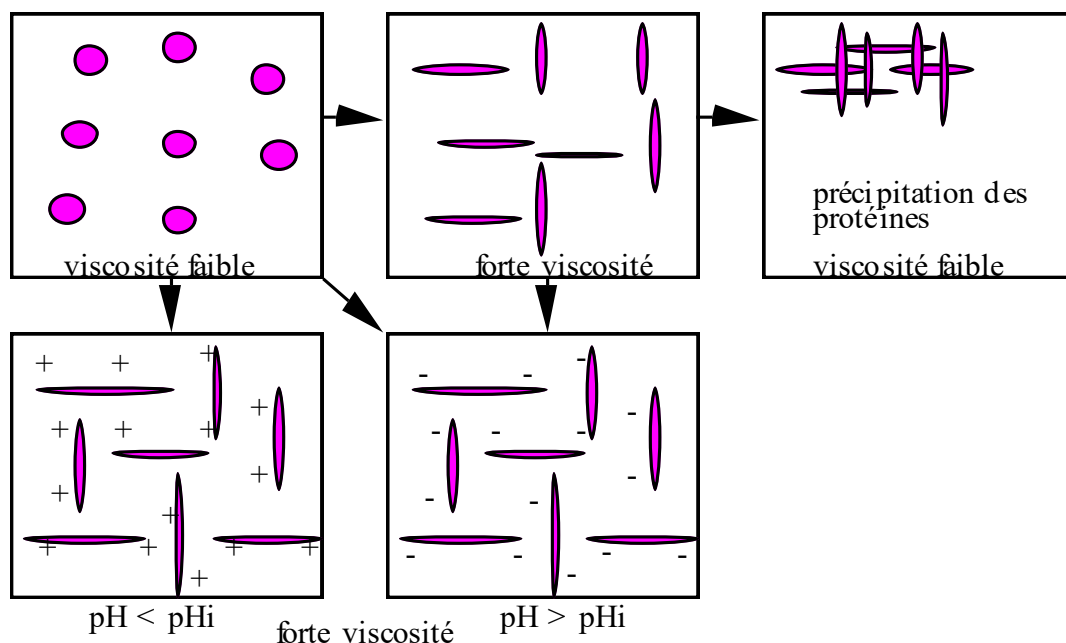


Figure 75. Schéma des variations de viscosité de solutions protéiques

Les mesures de viscosité en fonction de la concentration en protéines et à différentes températures sont schématisées, pour le soja, sur la figure 76.

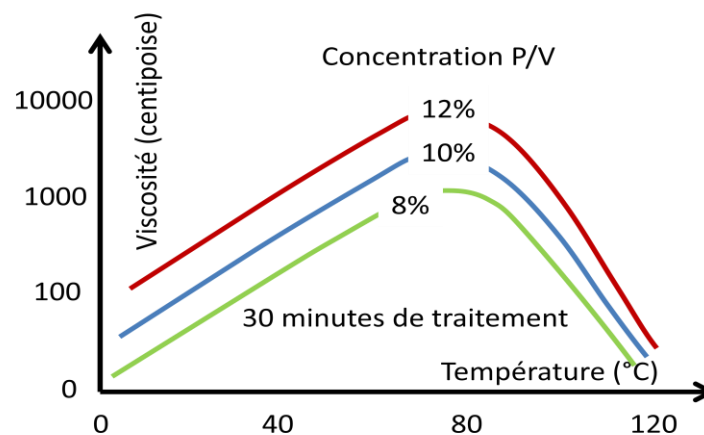


Figure 76. Variations de la viscosité de solutions de protéines de soja après 30 min de traitement

XVIII.6.2. Les gels protéiques.

Si la **concentration protéique est comprise entre 20 et 50 g/l** : un **gel** se forme s'il existe au moins trois zones interactives au niveau de la molécule protéique. Généralement ces zones interactives sont impliquées dans la stabilisation des monomères protéiques et il est donc nécessaire de rompre ces liaisons intramoléculaires pour les rendre disponible à des échanges intermoléculaires.

Plusieurs moyens sont utilisables pour “**dénaturer la protéine**”; ils diffèrent selon les protéines :

- la chaleur rompt les liens hydrogène en milieu aqueux
- le froid minimise l'intensité des liaisons hydrophobes
- le pH et la force ionique modifient et contrôlent l'ionisation de groupements polaires des chaînes latérales des résidus d'acides aminés.
- les solvants hydrophobes peuvent minimiser les interactions hydrophobes internes à certains macromolécules protéiques .
- une hydrolyse partielle peut démasquer des groupes interactifs (caséines)

Les propriétés des gels dépendront évidemment des conditions adoptées pour démasquer les régions réactives de leur milieu intramoléculaire et aussi de celles adoptées pour permettre l'établissement de liaisons intermoléculaires .

Pour **former le gel** il faut créer des liaisons interprotéiques. Parfois les distances entre deux groupements protéiques potentiellement réactifs sont trop grandes pour qu'une interactions s'installe; la présence de composés bifonctionnels dans le milieu peut rendre ces liaisons possibles (composés polyhydroxylés pour les gels de type hydrogène par exemple).

- Si les interactions interprotéiques qui se forment sont de type hydrophobe : le gel se forme à chaud.
- si les interactions interprotéiques susceptibles de s'établir sont de type hydrogène, le gel se forme au refroidissement.
- si les interactions interprotéiques susceptibles de se produire sont de type ionique, le gel se forme à un pH pour lequel les groupements ionisables de la protéines sont ionisés et en présence d'ions au moins bivalents de charge opposée.
- si ce sont des ponts disulfure qui se créent, le gel sera pratiquement irréversible.
- Enfin il faut signaler les gels qui se forment par diminution de répulsion électrostatique (par exemple à des pH qui tendent vers le pHi), cette diminution permettant alors à des interactions attractives (liaisons hydrogène ou interactions hydrophobes), d'intensité initiale inférieure à celle des forces répulsives, de s'installer.

Ces structures tridimensionnelles sont complexes et difficiles à étudier (figure 77) .La gélification résulte de la mise en place de structures à l'échelle moléculaire et macromoléculaire et affecte le comportement supramoléculaire du système.

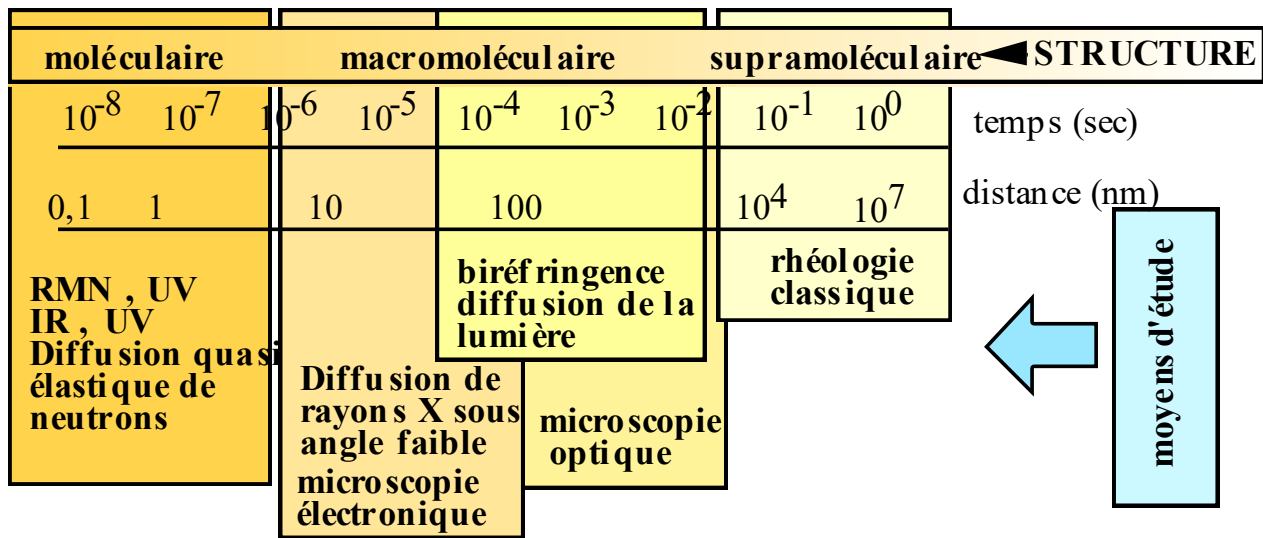


Figure 77. Propriétés des gels et méthodes d'investigation

Parmi les nombreux paramètres à considérer dans un phénomène de gélification, celui de la concentration en protéine est souvent déterminant (figure 78). Il est possible de définir une **concentration critique (Co)** au-dessous de laquelle le gel ne peut se former quelles que soient les conditions (1,2 % pour la gélatine).

Ce sont les variations de la viscosité spécifique η_{sp} en fonction de la concentration en protéine gélifiante qui permettent d'accéder à C_0 (figure 78).

Il est possible également de définir un **module d'élasticité** à ces structures, module qui est fonction de la nature de la protéine, de sa concentration, mais aussi de son environnement (pH, force ionique, température, présence de composés bifonctionnels etc.).

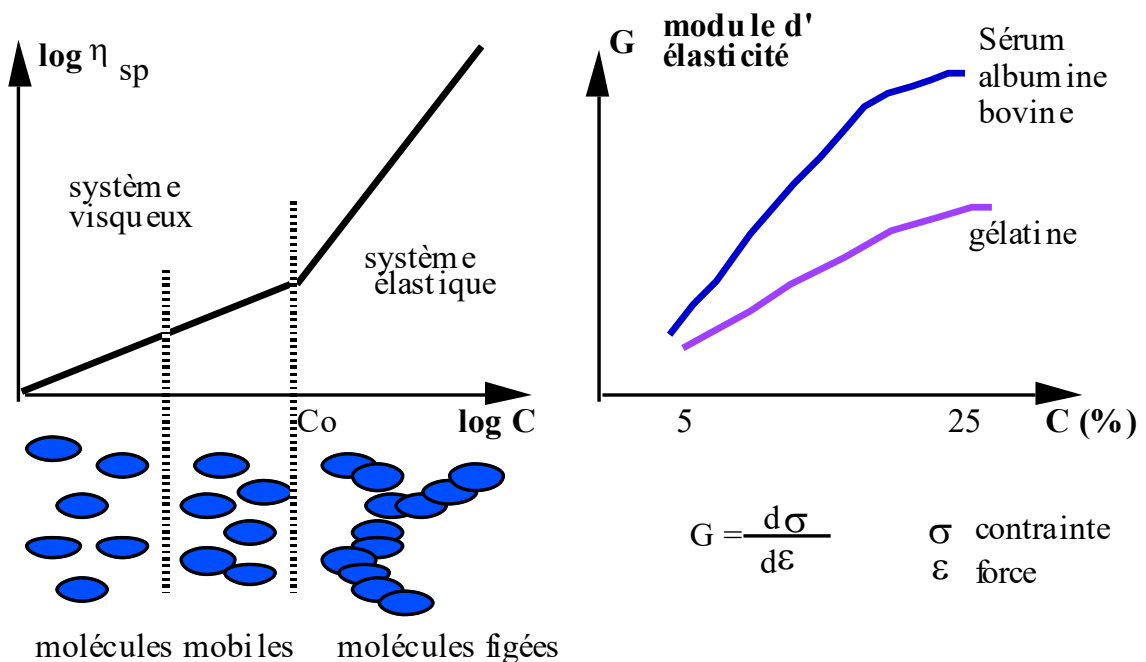


Figure 78. Propriétés viscoélastiques des gels

L'évaluation des propriétés rhéologiques de ces structures très fortement hydratées (**un gel peut être considéré comme une solution rigide**) est réalisable au moyen de texturomètre type Haake, Instron,

Brookfield, etc (figure 79). Le principe de ces appareils est de mesurer la force nécessaire au déplacement d'un mobile (sonde souvent de forme cylindrique) dans le gel, et ce dans des conditions standards (éviter les effets de bord en particulier).

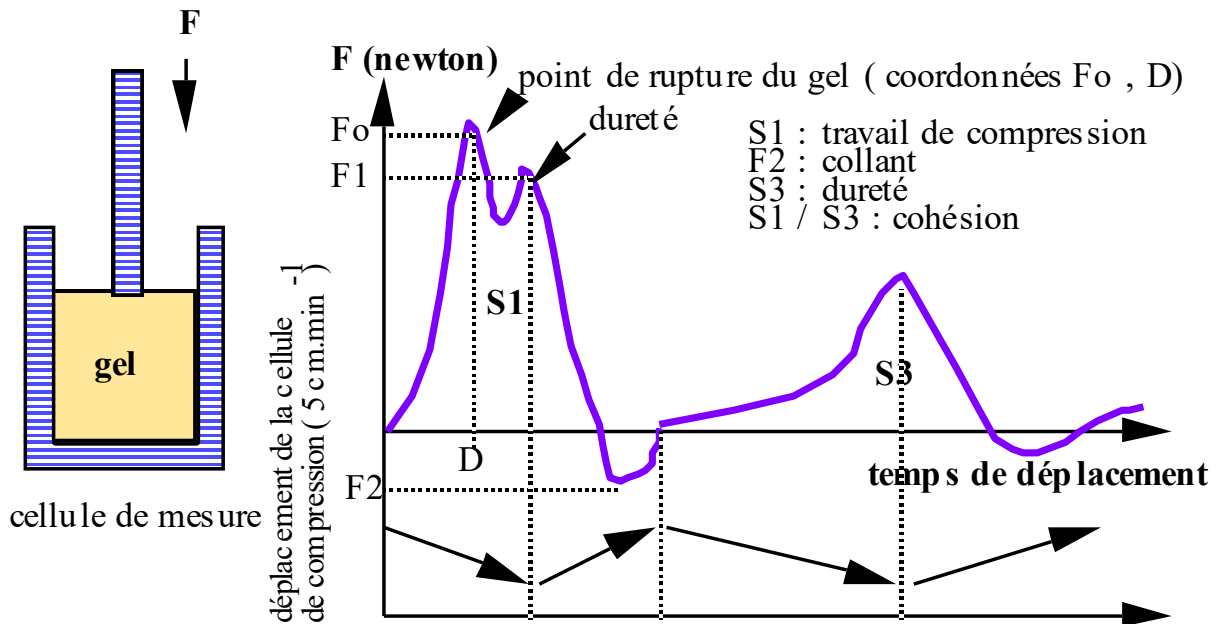


figure 79. Mesure des propriétés rhéologiques des gels

Les protéines alimentaires utilisables pour leurs propriétés gélifiantes sont les protéines de légumineuses (soja surtout), l'ovalbumine, la gélatine, la sérum albumine bovine, la β -lactoglobuline, les caséines et les protéines de viande. Ces structures sont recherchées dans des produits laitiers, des soupes, des pâtes, des crèmes glacées, des sauces, des gelées et marmelades etc. En s'appuyant sur le diagramme de phase, des gels mixtes sont souvent réalisés ; ils permettent d'obtenir des produits aux qualités rhéologiques souvent remarquables.

XVIII.6.3. Les pâtes.

Si la **concentration protéique est élevée (supérieure à 50 g/l)** il est probable que de très nombreuses interactions intermoléculaires d'énergie moyenne s'installent entre les molécules. Il se crée une **pâte** dont les propriétés seront fonction des interactions établies.

- Si seules de nombreuses interactions intermoléculaires de faible énergie sont mises en place le réseau sera **extensible** mais non élastique.
- Si quelques liaisons de forte énergie participent au réseau, le système sera extensible réversiblement (**élastique**). Enfin, si de nombreuses liaisons fortes s'établissent le réseau deviendra rigide et cassant (figure 80). Il faudrait pour décrire un système modèle adaptable à tous les systèmes tridimensionnels formés par des protéines introduire des notions comme celle de la **densité d'énergie par unité de volume**. Avec les gluténines et les gliadines des céréales, l'élasticité ou l'extensibilité des pâtes résultent de l'établissement de liaisons hydrogène et/ou covalentes (ponts disulfure).

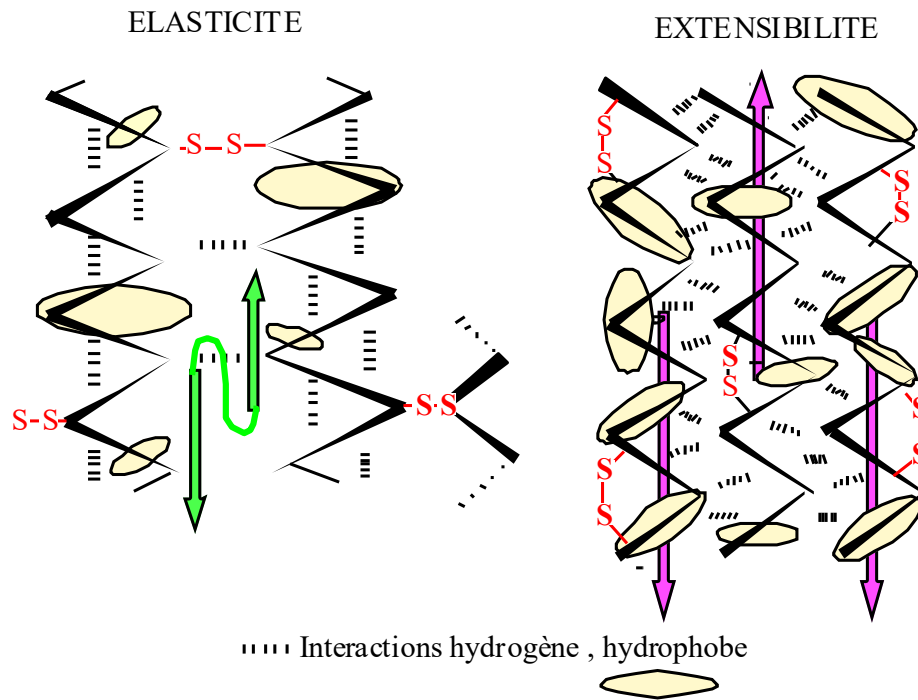


Figure 80. Elasticité et extensibilité de deux réseaux protéiques

• Des **solutions très concentrées de protéines qualifiées de collodion (120 g/l)** sont nécessaires à l'obtention de fibres par filage. Dans ce cas les forces répulsives des macromolécules protéiques hyperchargées à des pH très éloignées de leur pHi empêchent toute interactions intermoléculaire et confèrent à la solution une viscosité très élevée (**épaississant**).

De tels systèmes sont utilisables en sciences des aliments mais à des concentrations comprises entre 30 et 70 g/l. Parfois l'épaississement est obtenu avec des protéines donnant entre elles des interactions hydrogène qui ne permettent pas, du fait de leur densité énergétique insuffisante, de former un gel.

XVIII.6.4. Les films protéiques.

Le Concept de films et enrobages comestibles s'appuie sur des pratiques séculaires. En Asie des films lipo-protéiques sont utilisés pour emballer des aliments : feuilles lipoprotéiques (lait de soja). Le pelliculage à la cire depuis le XII^{ème} siècle pour conserver oranges ou citrons.

Aujourd'hui les usages des films sont très nombreux (boyaux de saucissons - enrobage de chocolat en confiserie - couche barrière anti-détrempage des cornets de glace - capsules de gélatine pour le mini conditionnement de poudres - enrobages de cire sur les fruits - pharmacie : protection de substances actives, masquage d'odeurs, identification colorée etc)

Le **concept de base est le suivant** : il faut concevoir une formulation des films impliquant la présence d'au moins un constituant capable de former une matrice de cohésion et continuité suffisantes, assurer la mise en réseau des molécules de constituant et adopter une technique de réalisation efficace.

a) Quelques généralités sur les biopolymères et les polymères synthétiques filmogènes

La production / consommation de polymères à « usage alimentaire » au niveau mondial est indiquée sur la figure 81. La plupart de ces polymères sont à la base de la production de nos déchets et sont donc des polluants potentiels. Il est aujourd'hui possible de substituer une partie des polymères d'origine chimique (issu de la pétrochimie le plus souvent) par des biopolymères.

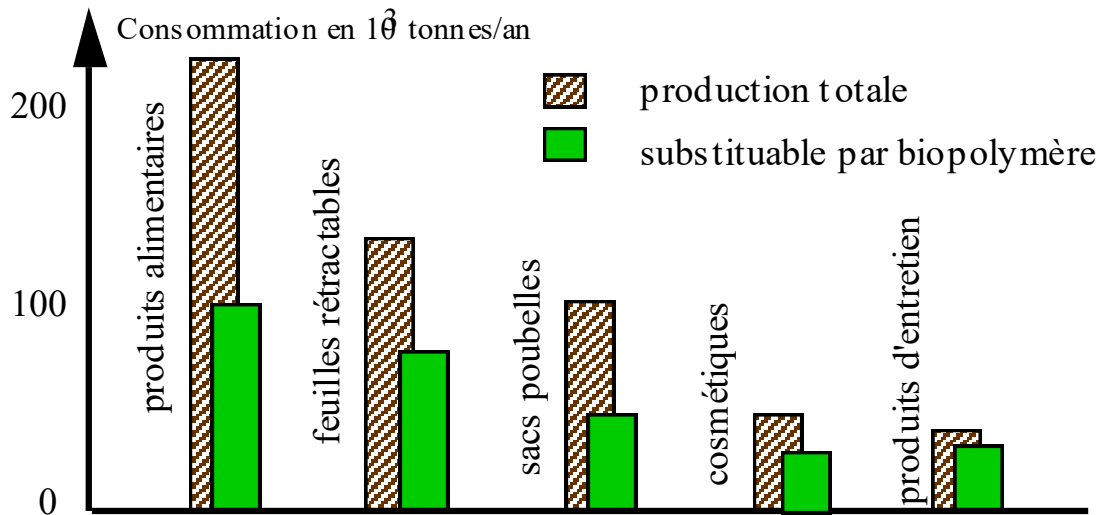


Figure 81 . Consommation mondiale de polymères

L'Europe consomme 15 millions tonnes de matières plastiques pour l'emballage, ce qui représente 10% du poids et 75% volume des déchets. Une solution «écologique» consiste à développer des emballages à durée de vie réduite : ce sont les **BIOEMBALLAGES** qui sont obtenus à partir de produits agricoles recyclables, biodégradables et/ou comestibles.

La comparaison biopolymères / polymères synthétiques au niveau de leurs potentialités d'applications, de leur biodégradabilité, de leurs propriétés fonctionnelles et de leurs coûts est présentée sur les figures 82 et 83.

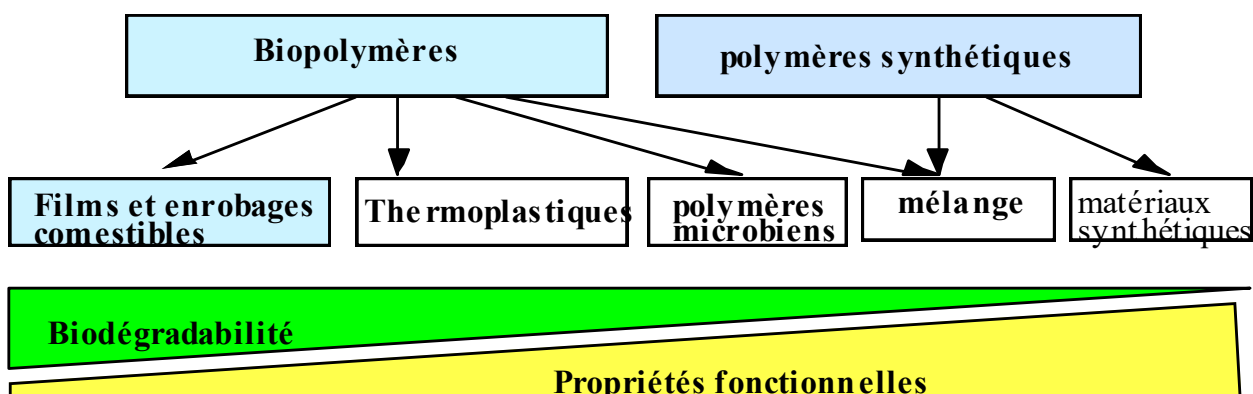


Figure 82. Biopolymères et polymères synthétiques.

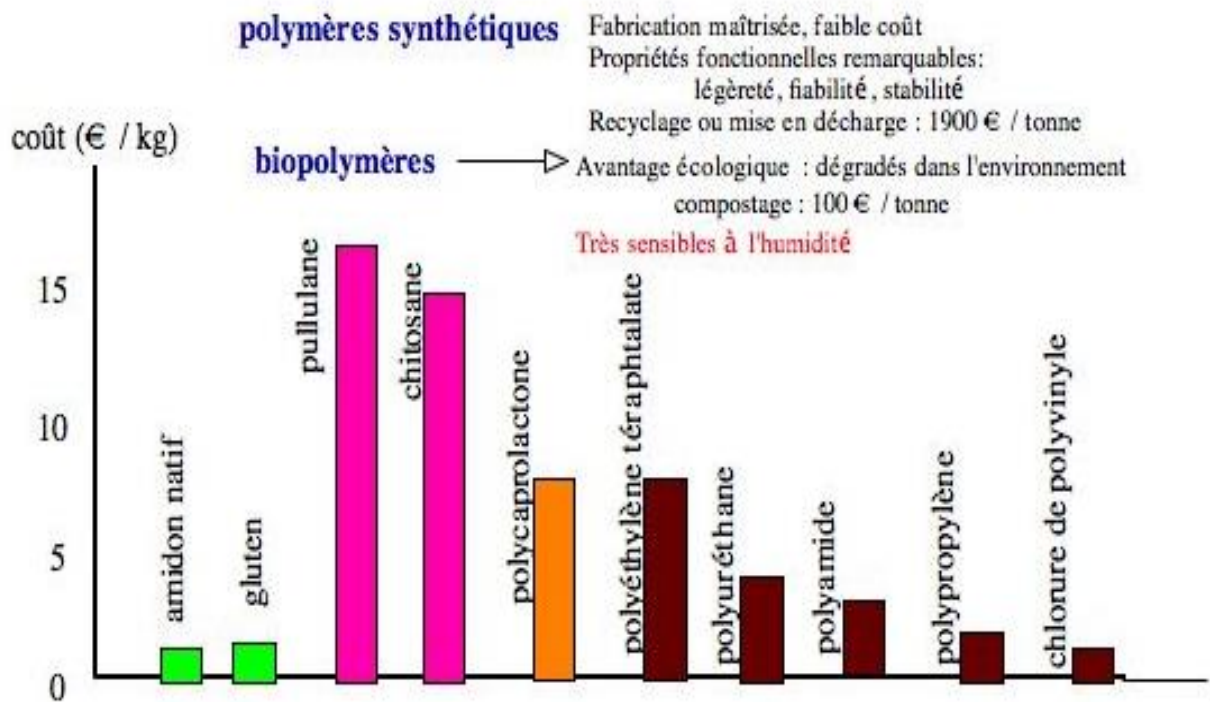


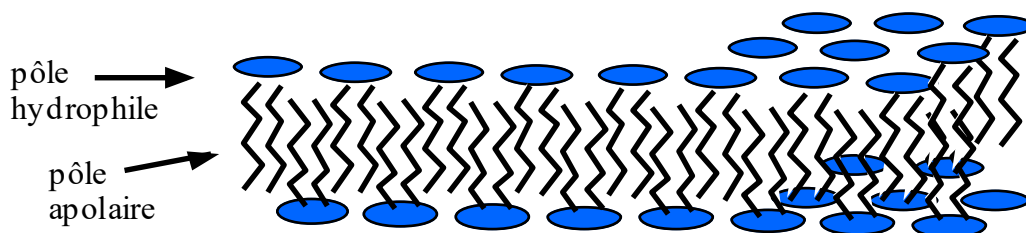
Figure 83. Coût comparé des substances filmogènes

b) Conditions de faisabilité d'un film

Le composant filmogène doit être capable de former une matrice tridimensionnelle cohésive et continue.

- Ces conditions sont retrouvées avec des molécules de faible masse molaire mais très fortement interactives dans leur environnement

Ex : film de phosphoglycérides de liposome

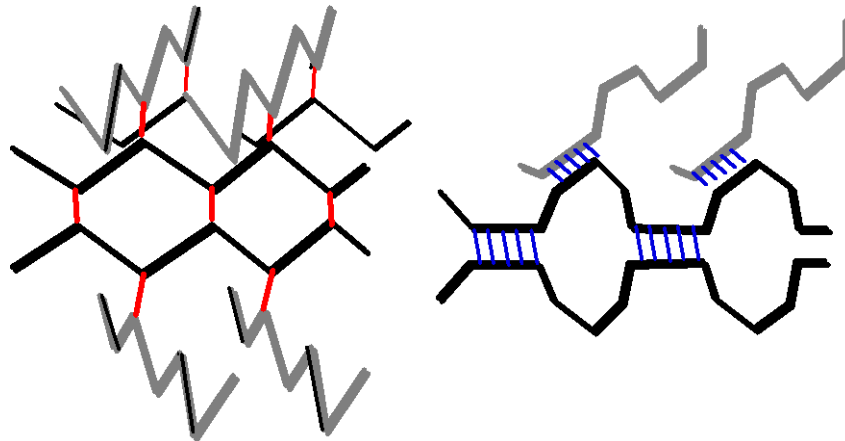


- Ces conditions sont surtout retrouvées avec les molécules de masse molaire élevée (polymères de masse molaire > 5000 D). Dans chaque polymère plusieurs zones d'interactions intermoléculaires sont nécessaires pour que le réseau tridimensionnel du film puisse se former.

L'énergie des liaisons entre monomères doit alors atteindre une valeur minimale par unité de volume pour que le réseau soit réalisable et stable dans des conditions données. Cette énergie d'échange résulte de la formation de liaisons covalentes avec la plupart des films obtenus par synthèse chimique. Ces liaisons sont, pour de nombreux polymères, de même nature : **système monotone**.

liaison covalente

liaisons multiples de faible énergie



L'énergie échangée par unité de volume du réseau est sensiblement identique dans les deux cas, le système multiliaison étant **coopératif**.

Les systèmes monotones sont obtenus avec des polymères naturels du type cellulose, amidon par exemple. Dans ces derniers cas ils résultent de l'établissement de nombreuses **liaisons hydrogène** entre les groupements hydroxyles des résidus d'oses qui composent le polymère.

Certaines des propriétés des films fabriqués à partir de ces polysides dépendront donc des propriétés des liaisons impliquées dans le réseau.

La connaissance des potentialités de formation de liaisons du polymère utilisé en vue d'obtenir un film est donc fondamentale pour maîtriser sa technologie et ses propriétés.

c) Les biopolymères filmogènes

Les biopolymères sont des substances polymères de monomères naturels (*amidon, protéines, celluloses, polyacide lactique, polycaprolactone*).

Pour fabriquer des films biodégradables il est possible d'utiliser des :

1) des **mélanges de type amidon** (0,5 €.kg⁻¹) - **polymère synthétique** (polyvinyle, polyéthylène, polystyrène) dont le mélange est obtenu par extrusion (polymère, amidon et agent de mélange : alcool vinylique, etc).

2) des **polymères microbiens** qui sont des réserves énergétiques. Par exemple, on peut citer l'acide lactique, le polyacide glycolique, la polycaprolactone, le poly 3-hydroxybutyrate, le poly 3-hydroxyvalérate et les polymères thermoplastiques (Biopol = poly 3-hydroxybutyrate) à 20 €.kg⁻¹. Il existe aussi des polysaccharides filmogènes comme le pullulane, le xanthane, le gellane, le chitosane (crustacés) : Kytex. Des films insolubles chitosane-cellulose sont actuellement disponibles (Aisero Chemical) : 25 €.kg⁻¹.

3) des biopolymères d'origine agricole

Rappelons que le galalithe (caséine - formol) et le celluloid (nitrocellulose - camphre) sont des matières plastiques connues depuis fort longtemps. Parmi les composés les plus importants on peut citer :

- les celluloses, ses dérivés (carboxyméthylcellulose, méthylcellulose, hydroxypropylcellulose, hydroxypropylméthylcellulose) et les dérivés ligno-cellulosiques (papier, carton, acétate de cellulose, cellophane etc).
- les amidons et dérivés (amidons modifiés, les amidons pré-gélatinisés, dextrines, maltodextrines) ont de nombreuses applications basées sur les propriétés thermoplastiques; ils sont très hydrophiles et leurs propriétés mécaniques sont médiocres.
- Les pectines HM et LM.
- les gommes végétales comme la gomme arabique, la gomme gua, la gomme ghatti ou encore la gomme de karaya.

4) les protéines (cf tableau 44)

Collagène et gélatine sont utilisés pour leurs propriétés filmogènes depuis 1936. D'autres protéines d'origine animales comme les caséines, les protéines myofibrillaires etc. sont à même de former des films de même que des protéines d'origine végétale comme le gluten, ou issues du soja, du coton, du maïs (zéine), d'arachide.

5) les extraits d'algues comme l'agar, les alginates, les carraghénanes ou encore le furcellarane.

6) les cires pratiquement imperméables à l'eau mais aux propriétés mécaniques limitées.

7) les chitosanes extraits de la chitine

d) Les films protéiques

Il n'existe pas de texte actuel concernant les **films et enrobages comestibles**: ils doivent être constitués d'ingrédients alimentaires et additifs autorisés (JO du 10 décembre 1991).

1) *Propriétés attendues*

Les propriétés mécaniques et barrières de ces films sont supérieures à celles des films lipidiques ou polyosidiques. Ils présentent de grandes potentialités interactives (nature et énergie) et transforment partiellement la chaleur en énergie mécanique.

Utilisés depuis de nombreuses années avec comme base principale la gélatine, les **films protéiques** (biodégradables, et pour certains comestibles) disponibles de nos jours doivent généralement répondre à un certain nombre de propriétés qui sont les suivantes (figure 84):

- faible coût
- technologie potentielle de fabrication en continu
- absence de toxicité - comestibilité
- modifications favorables des propriétés organoleptiques des produits emballés
- biodégradabilité
- stabilité au moins égale à celle du produit emballé
- propriétés mécaniques adaptées à la fonction recherchée
- propriétés barrières à l'eau et aux matières grasses
- propriétés barrières aux gaz et aux solutés
- contrôle de la prolifération microbienne
- support d'écriture
- thermosoudabilité

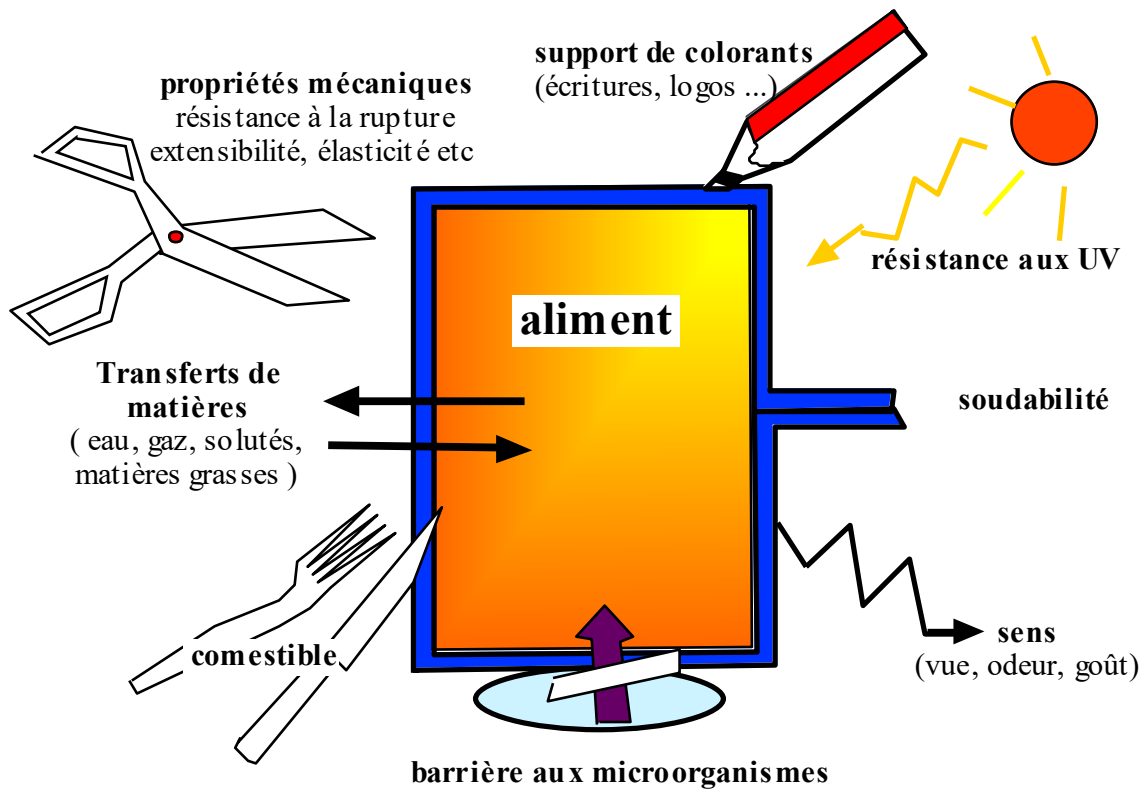


Figure 84. Les propriétés attendues des films protéiques

Un des avantages des films, c'est qu'ils permettent de disposer au niveau du point sensible d'un aliment quelconque d'une concentration en un composant anti-microbien ou anti-oxydant ou... particulièrement élevée et peu évolutive dans le temps (figure 85).

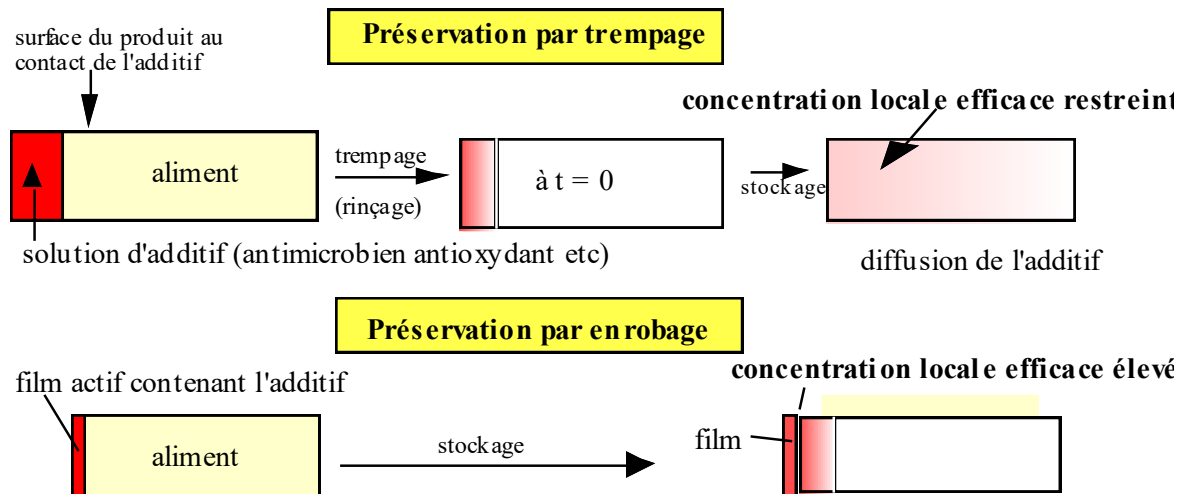


Figure 85. Evolution de concentration d'un composant « actif » au niveau d'un aliment trempé ou « enrobé »

Par exemple, il a été démontré que l'enrobage d'un fruit dans une protéine additionnée d'acide sorbique permet d'augmenter de façon considérable sa DLC si le point critique de conservation est une prolifération fongique de surface. Pour la fraise conservée à température ambiante la durée de conservation passe de 3-4 jours à plus de 10 jours, le développement d'*Oidium en surface* limitant la conservation du produit. Pour obtenir un effet fongistatique, la quantité d'acide sorbique à inclure au film est très faible alors que sa concentration locale "efficace" est très élevée; pour obtenir le même

effet fongistatique par contact direct acide sorbique - fruit, le plus souvent par immersion, la quantité d'acide sorbique totale du fruit doit être d'environ 100 fois plus élevée.

2) Les principales protéines filmogènes et leurs propriétés

Les composition et nature des protéines filmogènes, les conditions de solubilisation des protéines filmogènes, la nature du plastifiant efficace, les conditions principales de formation, les propriétés barrières à l'eau et aux gaz, certaines des propriétés mécaniques et organoleptiques ainsi que la solubilité des films obtenus sont indiquée dans le tableau 44 et sur la figure 86.

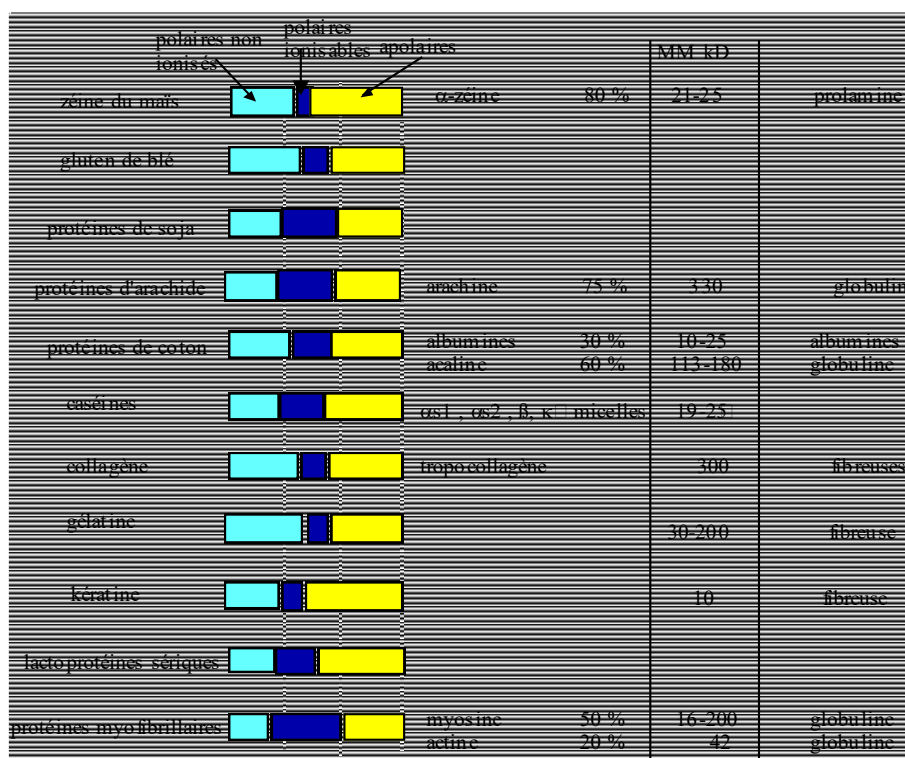


Figure 86. Propriétés de structure de quelques protéines filmogènes.

Tableau 44. Quelques protéines filmogènes et propriétés des films

protéine	Solubilisation	plastifiant glycérol	formation	solubilité dans l'eau		propriétés barrières		propriétés mécaniques organoleptiques
				froide	chaude	eau	gaz	
gélatine 20%	eau, chaleur	0 - 10		-	+	M	V	flexible, lisse transparent sans goût
			CaCl2 20%	-	+	M	V	idem mais amer, salé
			acide lactique (-> 50%)	-	+	M	V	idem mais acide
			acide tannique (--> 20%)	-	+	M	V	astringent, brun
protéines myofibrillaires	adaptée	5 - 25		-	-	M	V	transparent
		5		+	-	M	V	flexible clair lisse

ovalbumine 10 %	NaOH pH 8		CaCl ₂ 20 % a.lactique 30% acide tannique	- -	- -	M B B	V V V	jaune goût acide brun
Sérum albumine 10 %	eau	5		+	+	M	V	lisse, transparent fragile
caséine	NaOH pH 8	5 - 10		+	+	M	V	lisse, transparent flexible, goût lactique
			CaCl ₂ 20%	+	+	M	V	idem mais amer
			MgCl ₂ 20%	+	+	M	V	idem mais amer
			acide lactique (-> 30%)	-	-	B	B	rugueux mais acide
caséinates Na K	eau	5 - 10		+	+	M	V	
caséine as1			transglutaminase	-	-	B	V	flexible extensible
β-lactoglobuline	eau - réducteur	2 - 10	transglutaminase	-	-	B	V	
gluten	pH 11, chaleur	(--> 30)		-	-	M	B	opaque jaune
	pH acide éthanol	(--> 30)		-	-	M	B	extensible, flexible
zéine	éthanol (55-80%)	(--> 30)		-	-	B	V	transparent
isolat de soja	eau, pH 8	(--> 10)		-	+	M	V	transparent
protéines de coton	eau, pH 8	(--> 30)	formol	-	-	M	V	brun

3) Formation des films

La formation de **films protéiques** nécessite d'abord la mise en solution de protéines potentiellement interactives, le solvant présent empêchant l'établissement des liaisons intermoléculaires. C'est donc l'élimination du solvant (alcool pour les liaisons hydrophobe, eau pour les liaisons hydrogène, acide ou base volatils dont la présence génère une charge nette répulsive pour les macromolécules protéiques) qui permettra aux protéines d'établir des liaisons intermoléculaires et le réseau résiduel peu "hydraté" constitue alors un film dont les propriétés sont surtout fonction du type de liaisons établies.

Certains additifs sont indispensables à leur obtention; ils modifient des résidus d'acides aminés ou s'intègrent au réseau en modifiant le nombre et l'intensité des interactions (**plastifiants**).

Pour obtenir un film protéique il est d'abord nécessaire de disposer de protéines de masses molaires suffisamment élevées pour pouvoir réaliser un réseau : il faut donc veiller à ne jamais trop diminuer par hydrolyse la masse molaire des protéines utilisées.

Comme pour le filage ou d'autres procédés de texturation, il est préférable de disposer de protéines dans un état natif, souvent pseudo-globulaire, pour lequel les interactions intraprotéiques sont importantes tandis que les interactions interprotéiques sont peu nombreuses (figure 87).

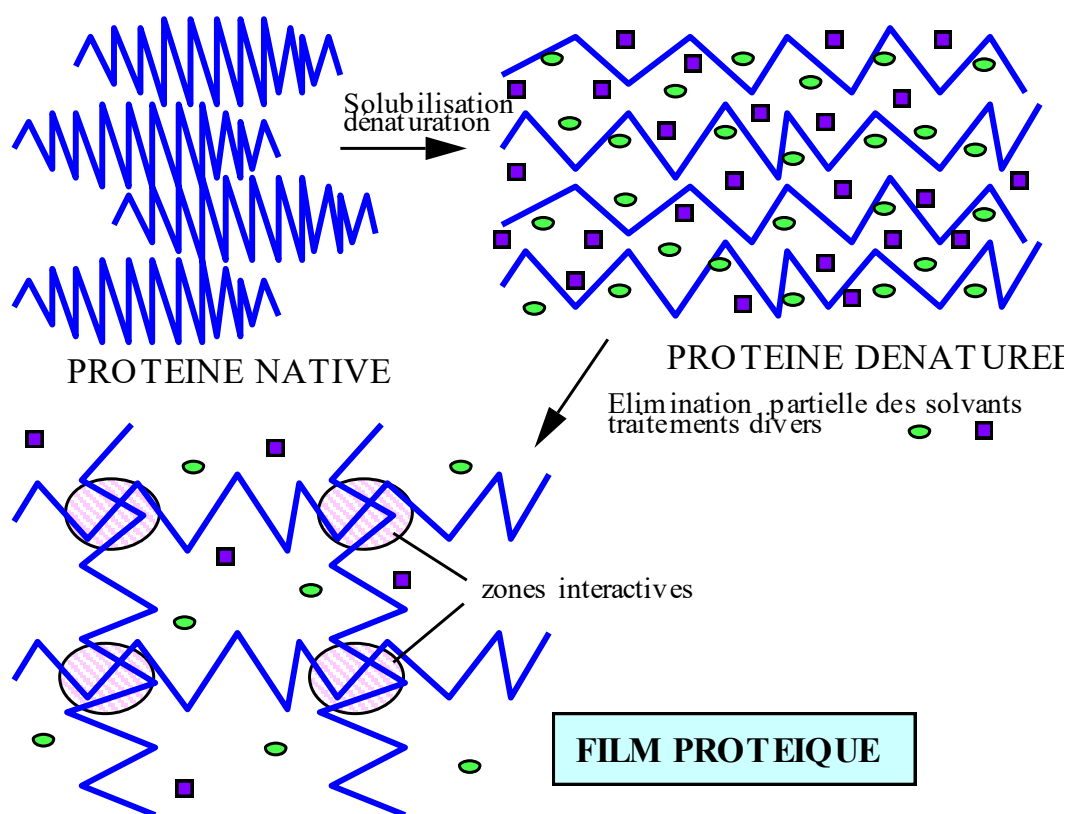


Figure 87. Schéma général de la formation d'un film protéique

Les protéines sont alors solubilisées et dénaturées pour passer d'un état pseudo-globulaire en un état plus étiré. Dans cette phase les principales zones d'interactions intramoléculaires sont démasquées sous l'effet des solvants et des conditions de traitement (température, concentration, pH, μ , solvants organiques, etc.). Il suffit alors de permettre à ces centres réactifs de donner des interactions non plus intra mais intermoléculaires pour constituer un réseau qui après élimination d'une partie du solvant sera à l'origine du film .

Il est donc fondamental de bien connaître les propriétés des diverses interactions à rompre puis à reformer pour fabriquer des films protéiques. Par ailleurs ce sont elles qui par leur distribution et leur intensité conféreront au film ses propriétés mécaniques et physico-chimiques. Leur caractérisation permet aussi de choisir des additifs susceptibles d'interagir sur des interactions soit d'un type donné (composé bifonctionnel homogène) soit de deux types différents (composés bifonctionnels amphipolaires par exemple).

Les principales réactions impliquées dans la formation de films sont schématisées sur la figure 88. Le rôle des agents dissociants, des solvants et des agents plastifiants ou durcisseurs n'est pas précisé sur ce schéma. Il est évident que l'établissement de liaisons covalentes (S-S par exemple) confèrera au film une grande rigidité, le film étant souvent cassant et transparent du fait de l'organisation plus isotrope du réseau.

Il est possible d'intervenir sur les **liaisons intermoléculaires de faible énergie**.

Si ce sont des liaisons hydrogène qui sont les plus fortes contributrices à la stabilisation du réseau, des composés polyhydroxylés ou polypolaires non ionisés pourront servir d'agents de pontage (**plastification**) .

Le composé le plus utilisé est le glycérol, mais il existe d'autre dérivés polyhydroxylés susceptibles de jouer le rôle de plastifiant (éthylène glycol, propylène glycol, etc).

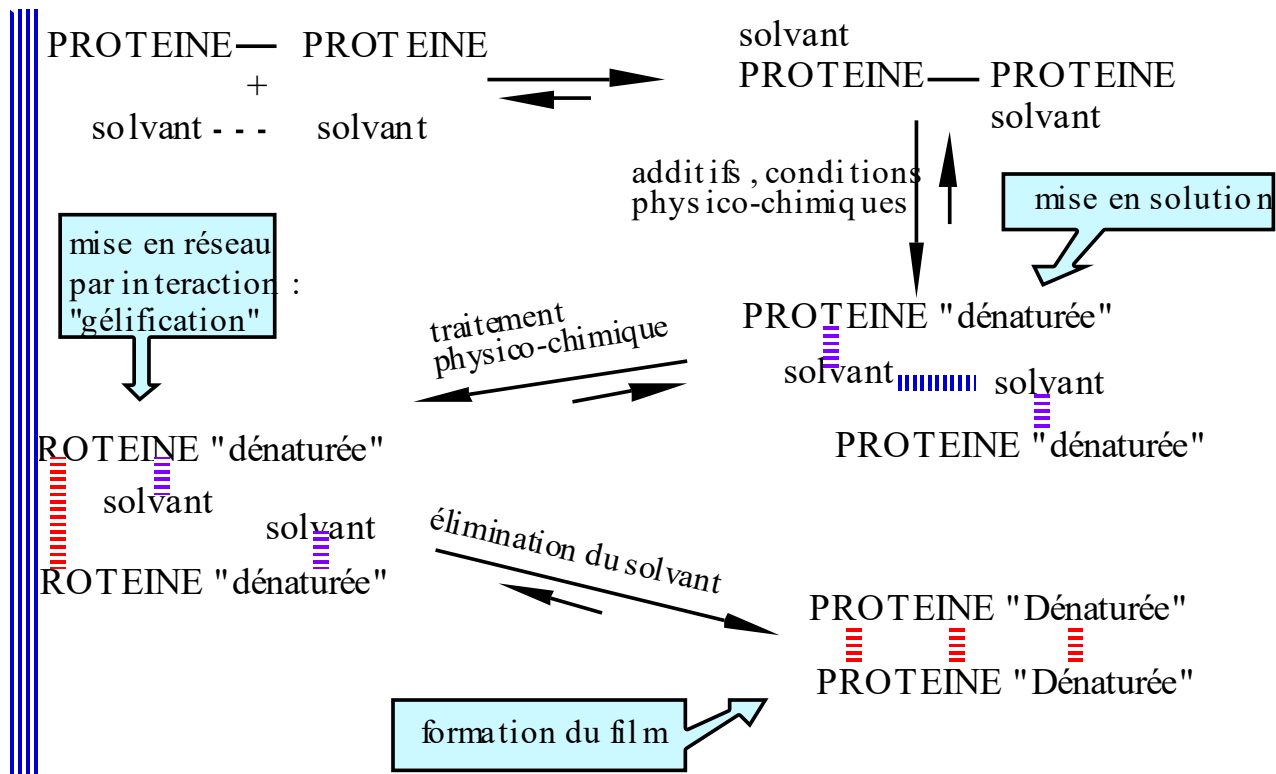


Figure 88. Etapes réactionnelles impliquées dans la formation des films

Si les liaisons hydrophobes sont impliquées, des composés apolaires sont utilisables. Ces liaisons sont d'autant plus fortes que la température est élevée en milieu aqueux ; cependant, en milieu deshydraté, les résidus hydrophobes interagissent par des liaisons du type Van der Waals par exemple. Il est aussi possible de ponter entre zone polaire et zone apolaire au moyen de composés amphipolaires comme les émulsifiants. En général ces "plastifiants" contribuent à améliorer "la déformabilité et l'extensibilité" des films mais ils diminuent leur élasticité et leur résistance à la rupture.

Il est possible de créer des **liaisons covalentes** entre les macromolécules protéiques au moyen d'agents bifonctionnels de pontage. Un des plus utilisés est le formol, mais tous les composés dialdéhydriques sont à même de jouer ce rôle (glutaraldéhyde, malonaldéhyde etc.).

L'**épaisseur** des films obtenus est facilement contrôlable et il est envisageable de les produire avec des technologies en continu du type extrusion ou sécheur cylindre. Leur **biodégradabilité** est bonne, et les films obtenus par mélange et traitement de composés alimentaires sont de plus **comestibles**. Il devient alors possible d'envisager, quand cela est nécessaire, d'emballer un produit dans ces propres protéines. Les applications de ces films sont potentiellement extrêmement nombreuses et variées.

4) Technologies de fabrication et de mise en œuvre des bioemballages

4-1) Coacervation et formation des films et enrobages

1) Obtention d'une solution (ou d'une dispersion protéique) filmogène

2) Séparation du polymère de la phase solvante :

Coacervation par précipitation ou par changement de phase sous l'effet d'un traitement physique (chaleur) ou chimique (polarité du solvant, pH, température, électrolyte : calcium et alginate etc.). Le film est obtenu par séchage des précipités

Coacervation simple avec un seul hydrocolloïde

Coacervation complexe avec plusieurs hydrocolloïdes souvent de charges opposées (ex protéines et chitosanes)

Formation par traitement thermique de liaisons intermoléculaires et séchage du gel.

3 - Elimination du solvant :

Le solvant à éliminer est très souvent l'eau, plus rarement l'éthanol. Evaporation à température donnée.

4 - Formation du film ou de l'enrobage :

Etalement en couche mince de la solution filmogène (casting), pulvérisation, immersion, turbinage, etc.

A l'échelle Industrielle : sécheurs cylindres ou tapis roulants

Récupération de films en surface (soja)

Les parties hydrophobes des protéines sont situées à l'interface film-air

4-2) Formation par application des propriétés thermoplastiques des protéines

1) Fusion des structures cristallines

Malgré la masse moléculaire élevée et la structure tridimensionnelle complexe des monomères, il arrive qu'un arrangement spatial régulier de ces monomères intervienne : **réseau cristallin ou partiellement cristallin (zones)**

La **fusion des zones cristallines** ressemble à une **transition solide - liquide**. A la température de fusion (**T_f**), les structures cristallines sont désorganisées.

T_f est d'autant plus élevé que l'énergie intermoléculaire est grande

2) Transition vitreuse des structures amorphes

Les zones amorphes sont caractérisables par une transition vitreuse : passage d'un état vitreux stable à un état caoutchoutique instable à une température qualifiée de transition vitreuse (**T_g**).

T_g est déterminable par analyse thermomécanique dynamique (ATMD) ou analyse enthalpique différentielle (ATD).

A **T_g** le matériau change de propriétés (optique, mécanique, diélectrique, mécanique, etc), les molécules devenant plus mobiles, désorganisées (figure 89)

3) Applications

Les procédés thermomécaniques utilisables sont applicables à des préparations de polymères peu hydratés : extrusion, enduction, thermoformage, moussage etc.

Le polymère est **malléable** au dessus de T_g et **visqueux** au-delà de T_f

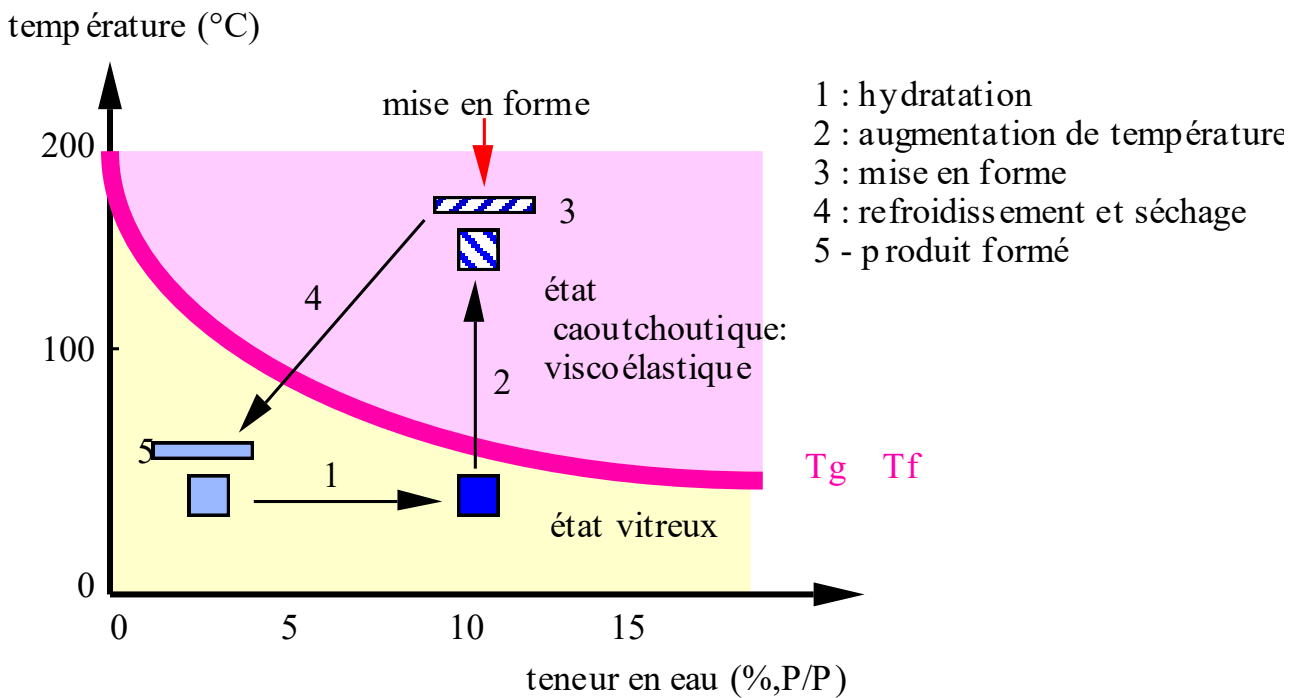


Figure 89. Thermoformage des films protéiques

5) Les additifs des bioemballages protéiques

5-1) Les plastifiants

La plastification externe permet la modification de la structure tridimensionnelle du réseau de polymères

Principe : il s'agit de composés donnant les mêmes types d'interactions (hydrogène, hydrophobes ou ionique) que ceux qui s'établissent entre les chaînes de polymères. De taille réduite ils agissent sur la mobilité apparente des chaînes (figure 90)

Plastifiants des liaisons hydrogène :

l'eau, le glycérol, les polyols, l'éthylène glycol, le sorbitol; l'acide lactique etc.

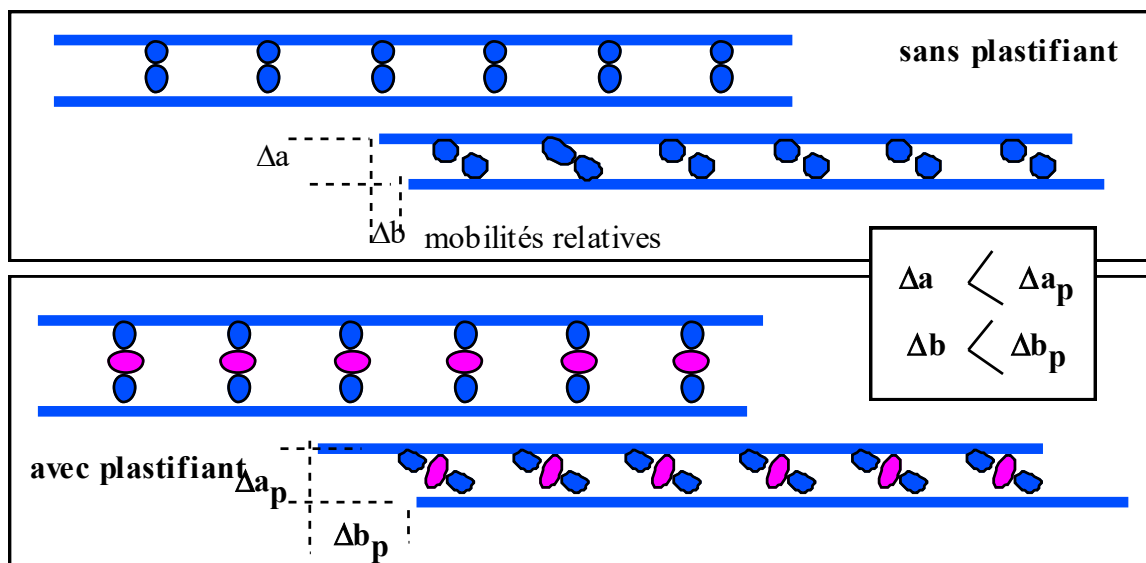


Figure 90. Rôle des plastifiants dans les réseaux protéiques de type film.

Plastifiants des liaisons hydrophobes :

les lipides et dérivés

Plastifiants “mixtes”:

les émulsifiants et agents amphipolaires

5-2) Les agents de pontage

La création de liaisons covalentes entre les chaînes protéiques peut être obtenue par plastification interne en créant des liaisons du type :

protéine-S-S-plastifiant-S-S-protéine

protéine-NH-CO-plastifiant-CO-NH-protéine

protéine-COO--Ca⁺⁺-COO--protéine

Les principaux agent réticulants ou pontants sont le formaldéhyde, le glutaraldéhyde, le gossypol, l'acide tannique, l'acide lactique, les ions bivalents, etc

Il est aisé d'obtenir un pontage par voie enzymatique à l'aide de la transglutaminase.

e) Détermination des propriétés fonctionnelles des bioemballages protéiques**1) Les propriétés mécaniques**

Elles sont évaluées par des tests de compression, de perforation ou d'extension et nécessitent l'interprétation des relations force-déformation-temps (texturomètres, rhéologie dynamique).

Ces propriétés sont très dépendantes de la teneur en eau et de la température mais aussi de l'épaisseur.

2) Les propriétés thermiques

La **transition vitreuse** est accompagnée d'une variation de **chaleur spécifique** en fonction de la température. La **fusion** est une transition du premier ordre caractérisée par une variation rapide de l'**enthalpie** en fonction de la température.

3) Les propriétés barrières (gaz, vapeur d'eau, solutés et lipides)

Les transferts d'eau et de gaz à travers les films constituent des éléments souvent déterminants des propriétés attendues des films. Il y a succession de 3 étapes pour les phénomènes de diffusion :

- adsorption à la surface

- diffusion selon la loi de Fick

$$F = - D \frac{\delta C_i}{\delta x}$$

(F flux du pénétrant, D coef de diffusion, C_i concentration du pénétrant, x coordonnée d'épaisseur)

- désorption par évaporation à la surface “opposée”

Les phénomènes de sorption dépendent de la solubilité du pénétrant dans le film (loi de Henry : C_i = S.p_i (S = solubilité, P_i : pression partielle, C_i concentration du pénétrant)

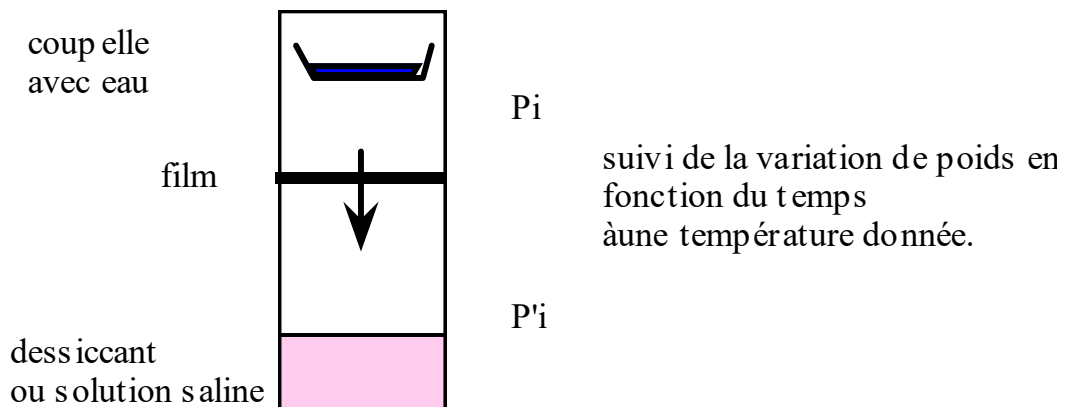
Le produit du coefficient de diffusion D avec le coefficient de solubilité S est la **perméabilité (P)**

A l'état stationnaire le flux de perméant est relié à la perméabilité par:

$$P = F \frac{\delta x}{\delta p}$$

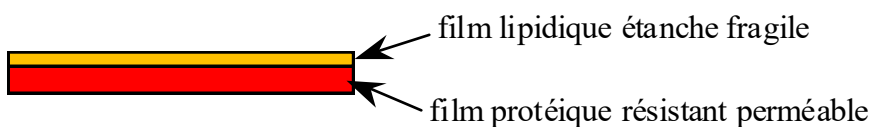
4) Propriétés barrière à la vapeur d'eau et aux gaz

Les propriétés barrières à la vapeur d'eau sont déterminées par des méthodes gravimétriques en fonction du temps.



Les films protéiques sont en général de mauvaises barrières à la vapeur d'eau: en raison de leur nature polaire ionisée ou non.

L'amélioration de leur perméabilité est obtenue par réalisation de films bi-couches:



La lipophilisation par greffage covalent d'acides gras par la méthode au chlorure d'acide n'améliore que peu cette perméabilité.

Pour les gaz des dosages IR (CO₂) ou par CPG ou coulométrie (oxygène) permettent d'évaluer la perméabilité.

Des perméabilités différentielles entre le CO₂ et l'O₂ permettent d'envisager l'utilisation des films pour réguler les transferts de gaz avec certains emballages contenant du matériel végétal.

5) Les propriétés "organoleptiques" et la valeur nutritionnelle

L'aspect visuel du film est important : opaque, transparent.

La **délictence** en bouche est fonction de l'épaisseur et de la nature du film.

Le **goût** est souvent neutre et dépend des conditions de fabrication. Certaines protéines amènent leur amertume (hydrophobicité élevée)

Attention aux **protéines allergènes** : la fabrication modifie la conformation des monomères : probabilité de diminution de l'éventuelle allergénicité

La **digestibilité** *in vitro* des protéines des films est plus élevée que celle des protéines natives.

f) Exemple de fabrication de film protéique à partir de gluten (cf p 26 chapitre IX)

1) Généralités sur les interactions intra et interprotéiques des protéines du blé (cf p26 chapitre IX)

Ce sont les propriétés physico-chimiques des protéines du blé qui permettent la fabrication d'aliments comme les pâtes ou le pain. Ces protéines se composent essentiellement d'albumines (8 à 10 %), de globulines (4 à 6 %), de prolamines : les *gliadines* (38 à 42 %) et de gluténines: les *gluténines* (44 à 46 %).

2) Influence des conditions expérimentales sur les propriétés des films. Rôle des additifs et des modifications chimiques des protéines .

Le principe fondamental de réalisation des films est le suivant : dans la protéine matière première native la répartition des liaisons est anisotrope (localisation et énergie). Dans le film idéal, cette répartition doit être isotrope en localisation et modulée en énergie pour conférer au film ses qualités. Pour atteindre ce but il faut réaliser un certain nombre d'opérations séquentielles :

a) Les différentes étapes de la formation du film de gluten

La formation du film passe par une *solubilisation* préalable des protéines. Rappelons que ces protéines constituent le résidu insoluble d'un pâton extrait à l'eau et que les gliadines sont solubles dans l'éthanol alors que les gluténines sont solubles en milieu alcalin. Pour solubiliser simultanément ces deux classes de protéines on est donc logiquement amené à essayer d'utiliser de l'"éthanol alcalin" ou une "soude éthanolique".

Si ces protéines pseudo-natives sont additionnées d'eau, elles s'hydratent par absorption au niveau de leurs résidus polaires accessibles. Il se produit des destructions très limitées des liaisons hydrogène de faible énergie tandis que les liaisons hydrogène "fortes", les liaisons hydrophobes et les ponts disulfure sont toujours présents et interdisent toute dispersion, donc toute solubilisation des molécules. Ces liaisons confèrent au pâton ses propriétés rhéologiques.

Si ces protéines sont additionnées d'un **solvant moins polaire que l'eau** comme l'éthanol, les gliadines très hydrophobes donneront des interactions apolaires avec ce solvant et se disperseront sous une structure tertiaire et même secondaire largement modifiée.

L'addition d'une **base**, comme l'hydroxyde de sodium, contribue à la rupture des ponts disulfure intermoléculaires des gluténines qui deviennent alors facilement dispersibles. La charge nette négative de la protéine dans des conditions de pH élevé contribue aussi à cette dispersion: pour des pH inférieurs à 10, la charge nette des gluténines est faible et par là même les forces dispersives nécessaires à leur solubilisation (figure 88); la viscosité de la solution est alors élevée par l'établissement de liaisons hydrogène entre molécules protéiques. Si des composés polyphénoliques sont présents dans le gluten , ils donnent alors , en présence d'oxygène , des phénates puis des quinones responsables du jaunissement observé .

L'addition d'un **acide** jusqu'à des pH inférieurs d'une ou deux unités aux valeurs des pKa des groupements carboxyliques des acides glutamique et aspartique confère aux gluténines une charge nette positive suffisante pour permettre sa dispersion (figure 91).

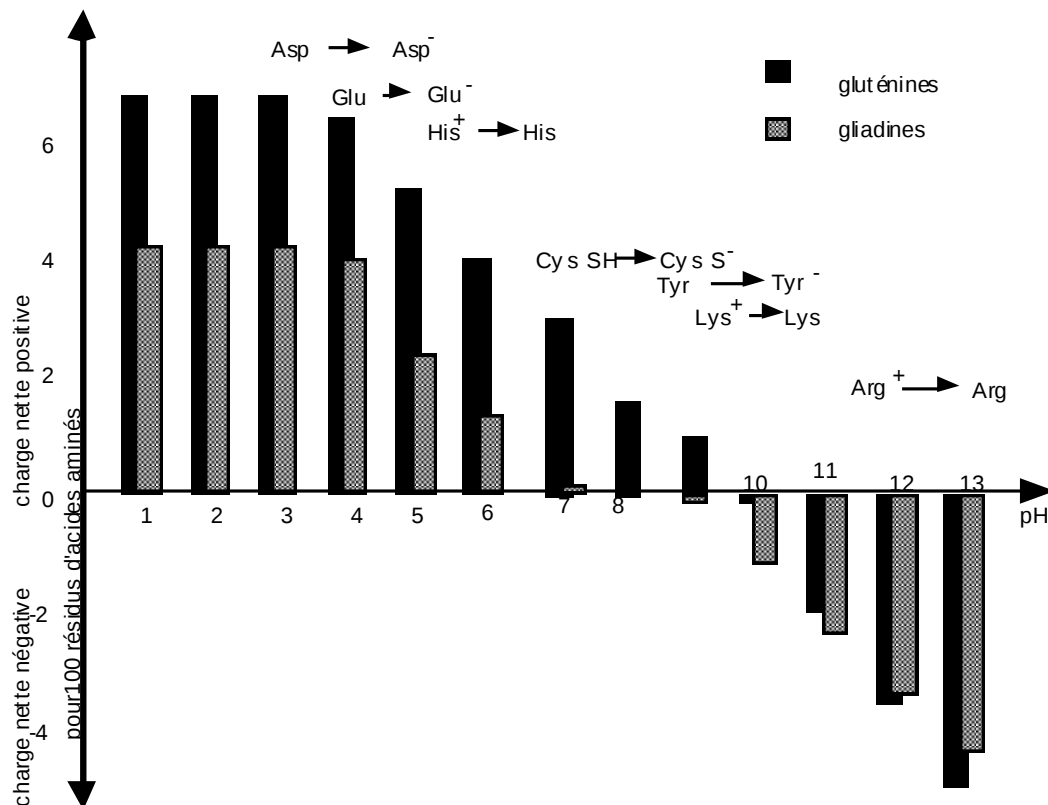


Figure 91. Variations de la charge nette des protéines du gluten.

Dans ces conditions, la charge nette des gliadines n'est pas suffisante pour engendrer des forces répulsives intermoléculaires. Si l'acide utilisé est organique, la partie de sa molécule non carboxylique sera susceptible de donner des interactions avec des zones hydrophobes (acide acétique) ou avec des donneurs de liaisons hydrogène (acide lactique). Par ailleurs, leur forme non déprotonée est apte à donner des liaisons hydrogène et donc capable de fragiliser et même rompre les liaisons hydrogène inter et intramoléculaires; l'acide se comporte comme un solvant organique. Il se produit alors une modification structurale de la molécule protéique. Il apparaît donc que la réalisation de la solution filmogène nécessite des pH supérieurs à 10 (au delà de 13 les risques d'hydrolyse de liaisons peptidiques sont élevés) et inférieurs à 4, zones de pH permettant la solubilisation des gluténines.

Ces acides ou ces bases devront dans la mesure du possible être volatils pour ne pas se retrouver à l'état concentré dans le film, avec tous les inconvénients que cela représente au niveau des qualités organoleptiques et de la stabilité du film.

Cependant, en milieu acide, les ponts disulfure ne sont pas rompus et il est alors nécessaire d'utiliser des agents réducteurs comme les **thiols** ou encore les **sulfites** pour dissocier et donc solubiliser les gluténines.

Le chauffage de ces solutions acido-sulfito-alcooliques ou alcalino-alcooliques contribue à la "destruction" des liaisons intermoléculaires prépondérantes dans la solubilisation mais aussi à celle de liaisons intramoléculaires nécessaires à la structuration ultérieure du film. Si les interactions intermoléculaires des protéines ainsi dispersées sont faibles, la viscosité de leur solution sera faible et inversement. Les protéines adoptent une conformation dénaturée avec un maximum d'interactions avec le solvant.

L'élimination plus ou moins partielle du solvant (associée ou non à un traitement complémentaire de formation de liaisons interprotéiques) se traduit par une augmentation de concentration de la solution protéique. La probabilité élevée de chocs efficaces permet alors aux protéines d'interagir par des liaisons "plus éloignées" et donc moins énergétiques qu'elles n'existaient dans la forme native, ce qui conduit à un produit intermédiaire aux propriétés rhéologiques particulières. Ainsi l'étalement en surface de la solution conduit à un gel puis par élimination du solvant à un film. Si la densité et l'énergie des liaisons interprotéiques néoformées dans le film sont élevées, le film sera cassant, dur et donc difficilement utilisable. Si cette densité et cette énergie sont par contre trop faibles, le film sera peu résistant et irrégulier.

Si la **concentration initiale** en protéines est par ailleurs trop faible, il ne peut s'établir, pour une surface donnée, suffisamment d'interactions protéiques pour que le film soit réalisable. Inversement, une concentration trop élevée en protéines dans la solution filmogène aura les mêmes effets qu'une insolubilisation imparfaite. La nature du support, polaire comme le verre avec des groupements silanols ou apolaires comme les métaux téflonés, sur lequel le film sera collant ou non renseigne sur les interactions dominantes de "surface" du film et encore "disponibles" car non impliquées dans la formation du réseau.

b) Le rôle des additifs ou des modifications chimiques des protéines dans la technologie de fabrication des films

Des modifications chimiques des protéines filmogènes ou l'emploi d'additifs sont souvent nécessaires à l'obtention de films aux qualités satisfaisantes. Ces opérations ont pour but soit d'améliorer la solubilisation obligatoire des polymères protéiques et leur dénaturation, soit de rendre possibles des interactions inter et intramoléculaires nécessaires à la formation du profil puis du film, soit enfin de moduler le nombre et l'énergie des interactions mises en jeu entre les molécules protéiques.

Ces modifications restent limitées en raison des possibilités ou non d'application des réactifs utilisés. La rupture des *ponts disulfure* intra et surtout intermoléculaires nécessaire à la solubilisation des globulines requiert l'utilisation de réducteurs dont l'efficacité sera d'autant plus élevée que leur pouvoir réducteur et leur concentration seront élevées. Si les réactions sont réversibles après élimination du réducteur (distillation ou oxydation), les fonctions thiols reformeront dans des conditions douces d'oxydation des ponts disulfure en fonction de leur probabilité de rencontre. Les ponts disulfure néoformés constituent des liens peu abondants mais d'énergie très élevée et conféreront au film, en association avec des liaisons réversibles et de plus faible énergie son élasticité.

Ainsi les *sulfites* permettent la lyse des ponts disulfure et les S-sulfonates formés redonneront des thiols au cours de la phase de séchage par "décomposition-distillation". Ces thiols pourront alors s'oxyder, si les possibilités de "rencontre" le permettent, en ponts disulfure. La *cystéine* permet également la réduction des ponts disulfure dans les protéines initiales. Il s'établit alors des réactions d'échange et en milieu oxydant (séchage à l'air) il se forme des ponts disulfure, mais surtout des cystines et des dérivés entre protéine et cystéine.

L'**addition de composés** susceptibles de donner des interactions avec les groupes protéiques donneurs de liaisons hydrogène et si possible bifonctionnels (glycérol) contribue à la formation d'un réseau dans lequel les interactions hydrogène d'origine protéique sont minimisées par rapport aux possibilités offertes par les protéines seules. Ces additifs ou plastifiants diminuent les "densités" d'interactions protéiques directes en s'intercalant entre les différents points de liaisons possibles des chaînes polypeptidiques.

Sur la figure 91, les flèches donnent les possibilités de mobilité des deux chaînes polypeptidiques l'une par rapport à l'autre. Il apparaît ainsi que le film obtenu avec les protéines seules est très "cristallin", avec une densité maximale d'interactions hydrogène inter et intraprotéiques. Le film est alors peu déformable, cassant et sa force à la rupture est grande.

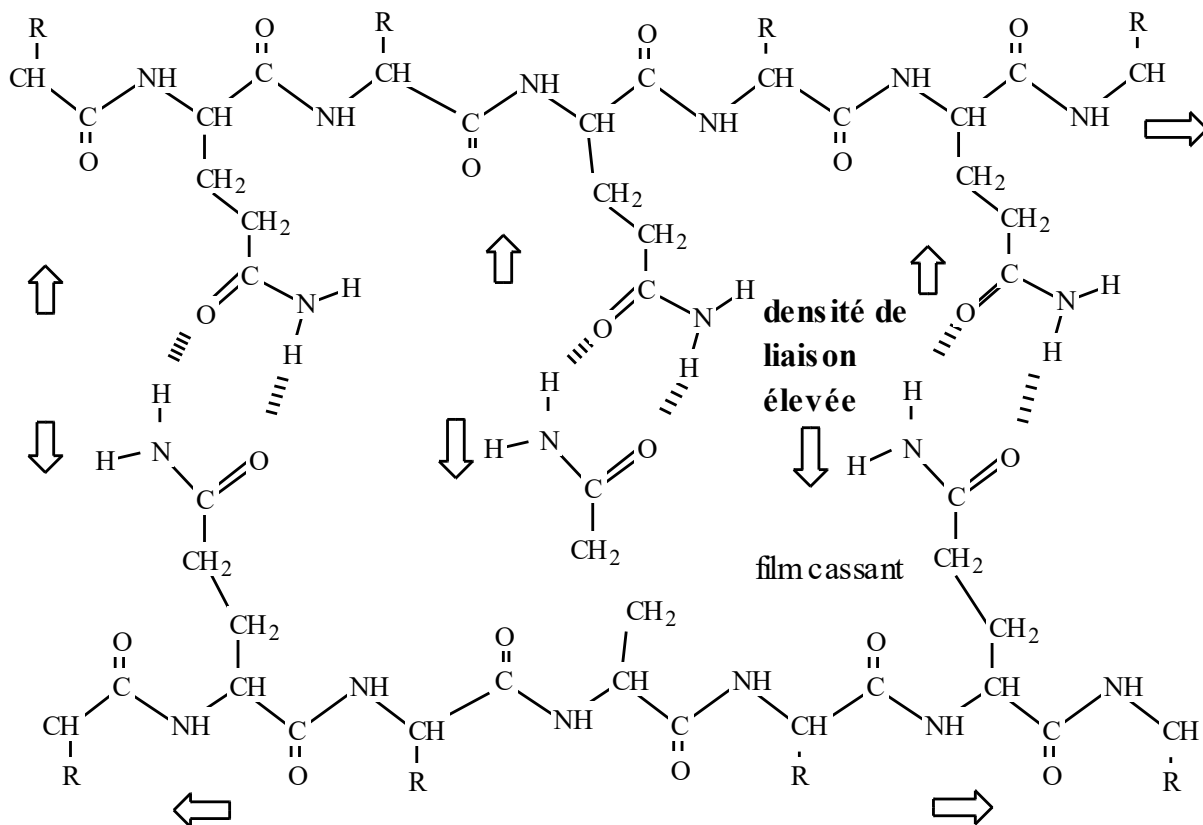


Figure 91. Degrés de liberté d'un réseau protéique de type film en absence de plastifiant

Avec le glycérol comme plastifiant, les liens interprotéiques GLN-GLN de forte énergie (2 liaisons hydrogène par résidu) sont remplacés par des liens GLN--Glycérol--GLN d'énergie plus faible. Les deux chaînes polypeptidiques s'éloignent et leur degré de liberté augmente ce qui confère au film sa plasticité (élasticité et/ou extensibilité). Les films obtenus ont alors une force à la rupture qui est diminuée et une déformabilité augmentée (figure 92).

Il est évident que cet effet plastifiant n'apparaît de façon significative que pour des concentrations relatives légèrement inférieures ou voisines de celles des groupements protéiques avec lesquelles elles vont réagir. Si la concentration du plastifiant dépasse ce seuil, des groupements amides protéiques seront "libres" et aptes à réagir avec leur environnement ; c'est ainsi que les films fabriqués avec 30 % glycérol par rapport au gluten deviennent collants, ce collant correspondant à des liaisons hydrogène qui s'établissent entre le film et son "contact" hydrophile (la peau par exemple). Il est également nécessaire que l'énergie totale d'échange mise en jeu entre ce composé et le groupement "fonctionnel" protéique soit inférieure à celle qui existerait entre les groupements protéiques. Il est enfin souhaitable que ces additifs soient bifonctionnels pour s'intercaler et assurer la liaison interprotéique à l'origine de la cohésion recherchée du film. Si ces plastifiants sont "monofonctionnels" ils se comportent alors en agents dissociants; leur effet plastifiant reste efficace tant que leur concentration est très inférieure à celle des groupements protéiques avec lesquels ils réagissent, la structure et les propriétés du film dépendant alors du nombre de liens interprotéiques encore susceptibles de se former. Ainsi, l'addition de composés hydrophobes détruit des liaisons

hydrophobes interprotéiques ce qui se traduit par une diminution de la force à la rupture et une diminution de la déformabilité.

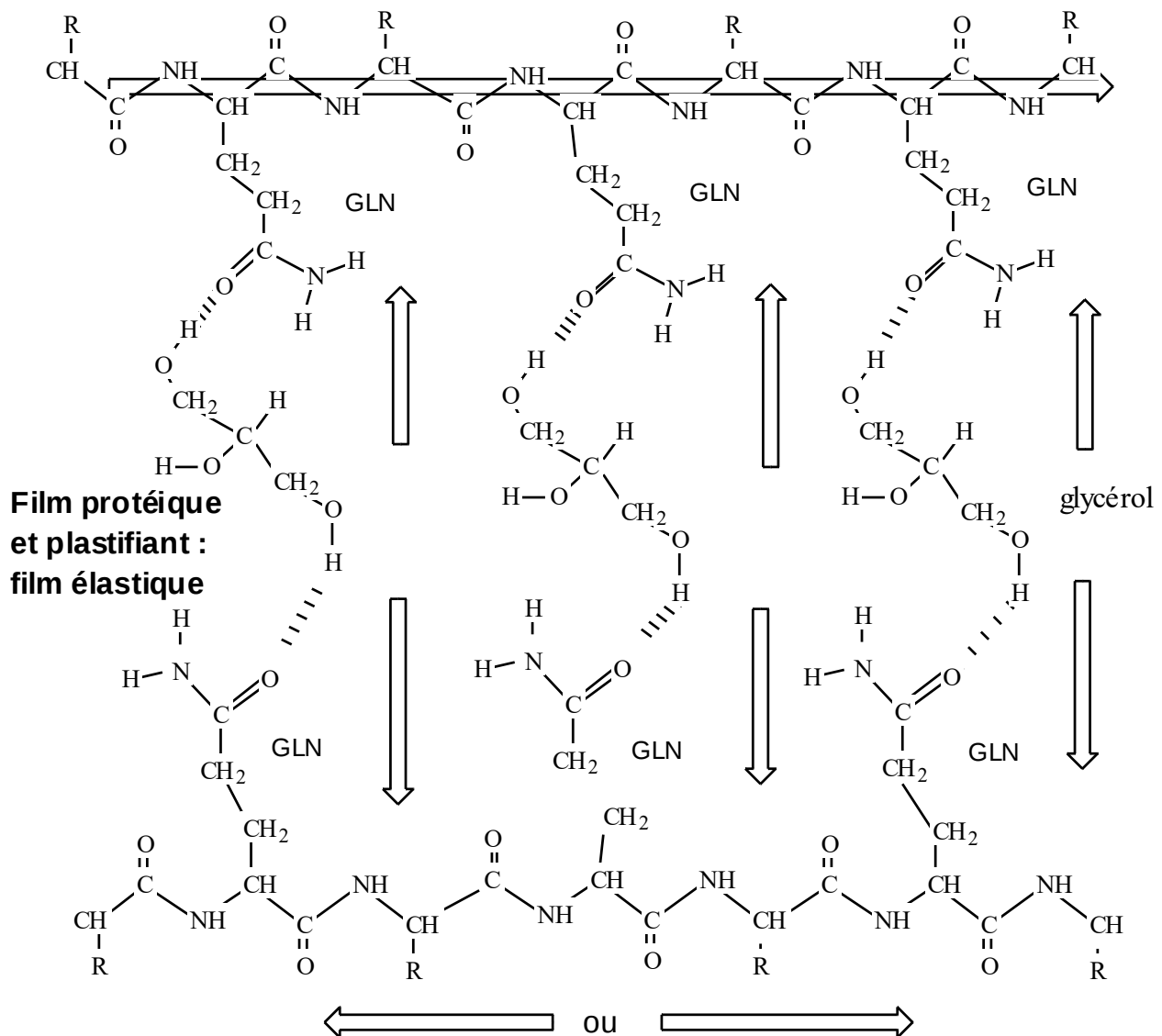


Figure 92 . Structure d'un film de gluten avec du glycérol comme plastifiant

L'addition de composés amphipolaires (émulsifiants ou autres), dont l'efficacité est surtout fonction de l'aptitude à former des liaisons hydrophobes et des liaisons hydrogène peut contribuer à la plastification du réseau. Dans ce cas, l'intercalant réagit d'une part avec des chaînes latérales de résidus d'acides aminés polaires et d'autre part avec des chaînes latérales de résidus d'acides aminés hydrophobes. La concentration optimale de ces additifs dépendra donc de l'énergie des liaisons qu'ils sont capables de former mais aussi du nombre de groupes protéiques aptes à réagir.

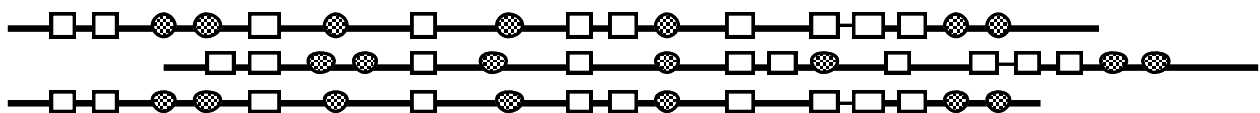
Pour créer des liaisons covalentes intermoléculaires il existe de nombreux réactifs (formol, glutaraldéhyde, etc.). Leur emploi, s'il préserve la biodégradabilité des films traités, rend néanmoins non comestibles ces produits du fait de la toxicité potentielle des résidus d'agents pontants. Ces agents peuvent être fort utile s'il s'agit d'obtenir des films très résistants quant à leurs propriétés mécaniques et éventuellement dotés d'une perméabilité satisfaisante à l'eau et aux gaz .

3) Les interactions moléculaires et les propriétés générales des films

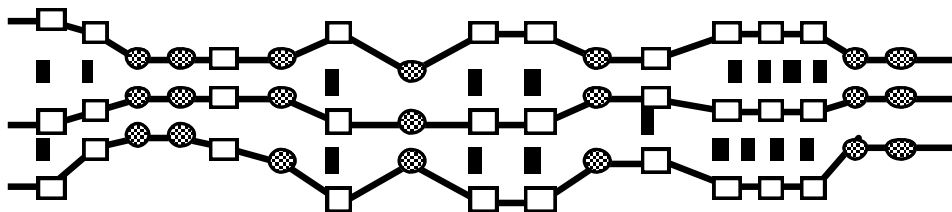
Le schéma des interactions intermoléculaires en fonction de la nature de l'additif actif sur les liaisons de faible énergie est présenté sur la figure 93.

Si le réseau qui se constitue est :

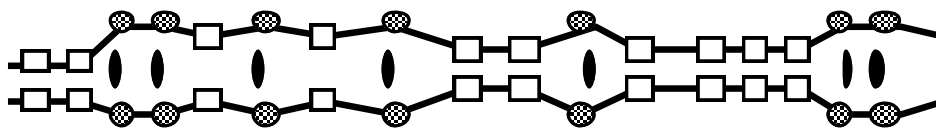
- composé de macromolécules et de molécules dont les interactions sont nombreuses et uniformément distribuées le film sera homogène.
- "régulier" ou pseudo-cristallin ou vitreux, le film sera transparent (à un niveau d'organisation élevé).
- élastique : certains des liens qui existent entre molécules protéiques sont de forte énergie et peu nombreux (ponts disulfure) tandis que les liaisons intra et intermoléculaires sont de faible énergie et réversibles (liaisons hydrogène des structure pseudo-hélicoïdales ou en feuillets β).



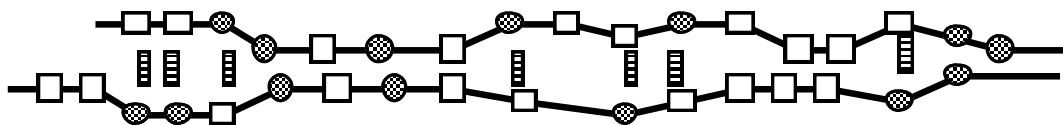
Film protéique sans additif résidu polaire □ (GLN , ASN), hydrophobe



Film protéique avec additif hydrophile bifonctionnel (glycérol ▮)



Film protéique avec additif apolaire (cire ○)



Film protéique avec additif amphipolaire (émulsifiant ▮)

Figure 93. Rôle des additifs dans la structure des films à base de gluten .

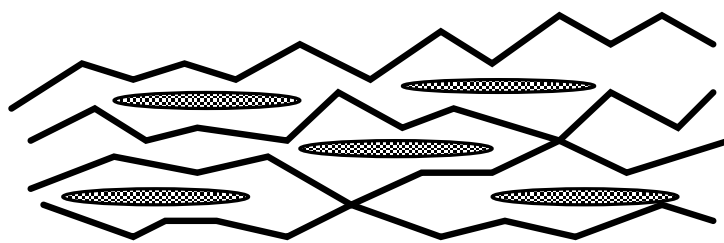
- extensible : les liens interprotéiques sont de faibles énergie et nombreux (liaisons hydrogène ou hydrophobe).
- d'une bonne résistance mécanique : la "densité d'énergie" de liaison est élevée et uniformément répartie.
- facilement hydratable : il reste des groupes polaires non impliqués dans des interactions intra ou intermoléculaires. La vitesse d'hydratation est fonction de l'accessibilité de ces groupes et de leur nombre.

- “soluble” : le nombre de groupes polaires accessibles à l’eau, c’est à dire non impliqués dans le réseau, est important ou alors les liens interprotéiques polaires possèdent une énergie peu élevée et inférieure à celle que ces groupes peuvent donner avec l’eau.
 - perméable aux gaz : c’est la densité du réseau et sa nature (hydrophobicité interne ou de surface, hydrophilicité etc.) qui sont responsables de cette propriété. Ainsi si le réseau comprend une majorité de groupements hydrophobes “libres” (non impliqués dans les liaisons intermoléculaires), ce réseau sera peu hydratable et sa perméabilité à la vapeur d’eau sera grande tandis que sa perméabilité aux gaz hydrophobes (oxygène, azote) sera faible. A l’inverse, si le réseau comprend une majorité de groupements hydrophiles “libres”, la perméabilité à la vapeur d’eau sera faible et celle aux gaz hydrophobes élevée.
- Par contre, en présence d’eau, le réseau va s’hydrater et les transferts vont se produire dans la phase liquide ainsi “piégée”, la nature du film étant alors profondément modifiée. Le réseau protéique est capable d’adsorber jusqu’à 20 g d’eau par interaction hydrogène sur ses sites hydrophiles non impliqués dans des liaisons intermoléculaires. Au-delà de cette quantité, l’eau ajoutée peut être considérée comme pratiquement de l’eau libre piégée dans le réseau.
- composé de macromolécules très interactives et donc très “rapprochées”, le film sera “pseudo-cristallin” et donc cassant.

4) Relations entre les structures moléculaires, microscopiques et macroscopiques dans les films de gluten

Les dimensions des monomères protéiques natifs est de l’ordre de la centaine de nm et les observations microscopiques avec un grossissement 10 000 permettent une résolution d’environ 250 nm. Par ailleurs, la complexité du réseau du film (gliadines, gluténines, plastifiant, eau) fait que les images observées par microscopie électronique ne permettent pas de visualiser individuellement les molécules protéiques mais donnent une bonne idée de leurs arrangements en système homogène ou non.

Il est probable que leur solubilisation se traduise par une augmentation de leur rapport longueur / diamètre, et ce d’autant plus que le pH est éloigné du pHi. Le film sera alors d’autant plus homogène et solide que ce rapport sera élevé; en effet, c’est dans cette configuration que les probabilités d’interactions interprotéiques sont les plus élevées. En microscopie électronique, l’image des films obtenus avec ces molécules sera homogène et lisse (figure 94).



gluténines “linéaires”

Figure 94. Structure probable d’un film obtenu dans des conditions optimales de solubilité des gliadines et des gluténines.

Dans le cas des films obtenus à partir de gliadines ou de gluténines on peut supposer les structures suivantes : avec les gliadines seules le réseau sera homogène et pseudocristallin (figure 95),

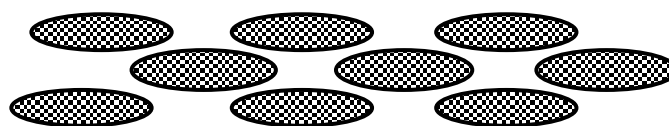


Figure 95. Structure d’un film à base de gliadines (pH 4, éthanol 45 ml % V/V)

tandis qu'avec les gluténines la structure sera plus fibreuse avec des liaisons fortes intermoléculaires (figure 96).

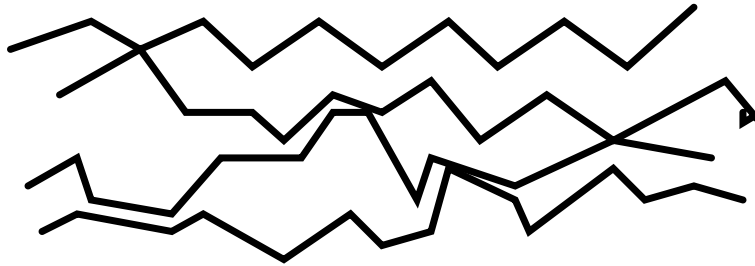


Figure 96 . Structure d'un film à base de gluténines (pH 4, éthanol 45 ml % V/V)

Dans cette approche, il ne faut cependant pas perdre de vue que les protéines impliquées dans ces films possèdent des propriétés très différentes qui rendent complexes toutes hypothèses sur la structure du réseau . Néanmoins, il est probable que les contributions relatives des gliadines et des gluténines à la structure du film puisse être considérée comme additives. Si les conditions de pH et de concentration en éthanol permettent un rapport longueur / diamètre plus grand pour les gluténines que pour les gliadines, le maillage pourra être attribué aux gluténines et les zones plus denses aux gliadines (figure 97).

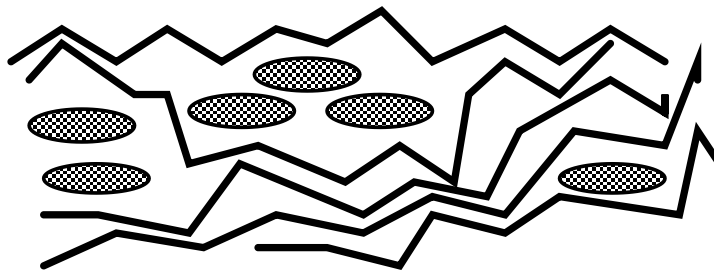


Figure 97. Schéma des associations protéiques dans un film pH 4 et 20 ml % (V/V) d'éthanol

Il est ainsi probable que les molécules de gliadines présentent à leur surface d'autant plus de groupements hydrophobes que la teneur en éthanol est élevée. Ce solvant contribue par ailleurs à démasquer des groupements hydrophobes des gluténines , le réseau comportant alors des protéines très dénaturées de structure fibreuses. La stabilisation intermoléculaire est assurée par des liaisons hydrophobes et hydrogène. L'étirement des molécules démasque également des zones hydrophiles qui rendront le film facilement hydratable et dissociable en présence d'eau (figure 98).

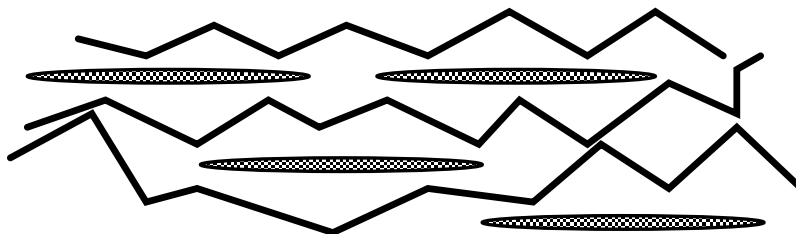


Figure 98. Schéma des associations protéiques dans un film à base de gluten obtenu avec une teneur élevée en éthanol

En se plaçant au voisinage du pHi, les gluténines ont une structure moins étirée et le film prend un aspect granuleux (figure 99).



Figure 99. Schéma des structures et associations moléculaires dans un film à base de gluten à pH voisin de 6

L'augmentation de la concentration en gluten permet la mise en place d'un nombre plus élevé d'interactions entre molécules protéiques et le film devient plus compact.

Dans cette approche nous avons imaginé les structures des composants protéiques du gluten dans le réseau que constitue le film. Il ne faut cependant pas perdre de vue que si la forme des molécules est un facteur fondamental, leurs propriétés de surface (hydrophobicité, hydrophilicité, présence de thiols) jouent un rôle fondamental dans la cohésion et les propriétés barrière du réseau.

En l'état actuel de nos connaissances, et qui plus est en présence des protéines au comportement "très particulier" du gluten, il nous est difficile de décrire un modèle d'interaction. Néanmoins il est clair que les interactions par pont hydrogène dominantes sont apportées par des résidus d'amides (gluténines et à un degré moindre gliadines), les liaisons par pont disulfure surtout par les gluténines et les liaisons hydrophobes par les gliadines et à un degré moindre par les gluténines.

XVIII.7. PROPRIETES EMULSIFIANTES

En technologie, l'intérêt de produits à propriétés émulsifiantes est double :

- **réalisation d'émulsion de type carné** (viande, pâté, saucisse)
- **fabrication de boissons ressemblant au lait** (laits végétaux)
- **stabilisation de produits divers** (mayonnaise, fromage fondu, beurre, crèmes glacées, etc).

Les protéines constituent des molécules amphipolaires capables de donner des interactions entre deux phases non miscibles. Leur adsorption à l'interface est de l'ordre d'une dizaine de mg.m⁻². Pour qu'une protéine ait des propriétés émulsifiantes, il faut d'abord qu'elle soit soluble en phase aqueuse et que son hydrophobicité de surface soit importante. Ainsi la capacité émulsifiante est minimale au pHi (figure 100).

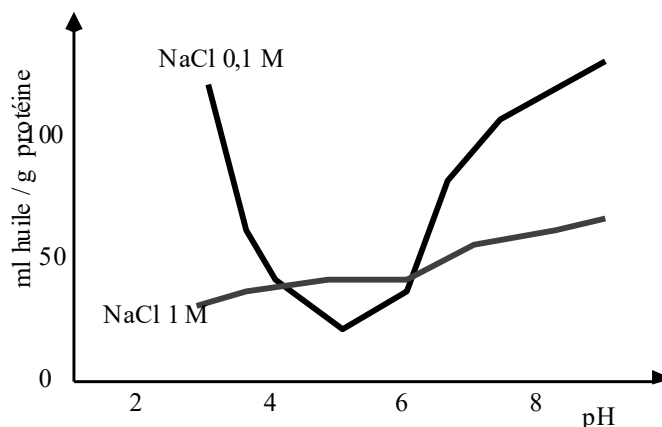


Figure 100. Capacité émulsifiante d'isolat protéique d'arachide en fonction du pH

Ce sont les phénomènes physico-chimiques aux interfaces qui sont responsables de ces propriétés mais aussi de celles d'adhésion, de mouillage, de détergence ou encore de moussage. Au sein d'un liquide une molécule protéique donne des interactions avec ses voisines ; à la surface du liquide (ou au contact des parois), elle donne des interactions partielles avec les autres molécules protéiques mais aussi des interactions de faible énergie (hydrophobes) avec la phase gazeuse : ce déséquilibre dans les interactions se traduit par une énergie libre superficielle. Un phénomène identique est observé à l'interface entre deux liquides non miscibles. L'énergie interfaciale résulte alors de la différence d'intensité entre les interactions protéiques dans les deux phases.

L'énergie libre superficielle ou interfaciale est le travail par unité de surface (exprimé en J.m²), ce qui est équivalent à une force par unité de longueur (exprimée en N.m) : on parle alors de **tension interfaciale ou superficielle**.

Quand une molécule protéique "**multiampipolaire**" en solution aqueuse affleure à une interface eau-lipide ou eau-air, ses parties hydrophobes ont tendance à se répartir dans la phase gazeuse ou lipidique. Comme dans cette situation son énergie libre est minimale, elle reste "piégée" dans cette zone. La molécule protéique adsorbée à l'interface contribue alors à un abaissement important de la tension de surface.

Le phénomène d'adsorption d'une protéine à une interface se produit avec une vitesse dépendant entre autre de la vitesse de diffusion mais aussi de celle du démasquage de groupements hydrophiles et hydrophobes. La concentration interfaciale C_i est déterminée par :

$$C_i = 2 \cdot C_s \left[\frac{D \cdot t}{3,142} \right]^{0,5}$$

avec C_i concentration interfaciale, C_s concentration protéique de la solution, D coefficient de diffusion. Avec des solutions diluées à 0,001 g/100 ml, C_i est de voisin de 0,5 mg.m⁻²

La vitesse d'adsorption d'une protéine à l'interface (figure 101) est donnée par :

$$\text{Log } \frac{dC_i}{dt} = \text{Log} (k \cdot C_s) - \frac{P \cdot \Delta A + q E}{k T}$$

avec q charge de la molécule, E potentiel électrostatique des groupes chargés à l'interface, $q.E$ énergie qui s'oppose à l'adsorption, P pression de surface ($P = \gamma_o - \gamma$ avec γ_o et γ tensions interfaciales initiale et après adsorption de la protéine), k constante de Boltzmann et T température absolue.

A l'équilibre, la tension superficielle est fonction de la densité des molécules à l'interface ; elle dépend alors de la concentration de ces molécules.

Quand l'interface est saturée (**concentration critique micellaire C_o**), la tension superficielle reste constante quelle que soit la concentration en protéines (figure 101).

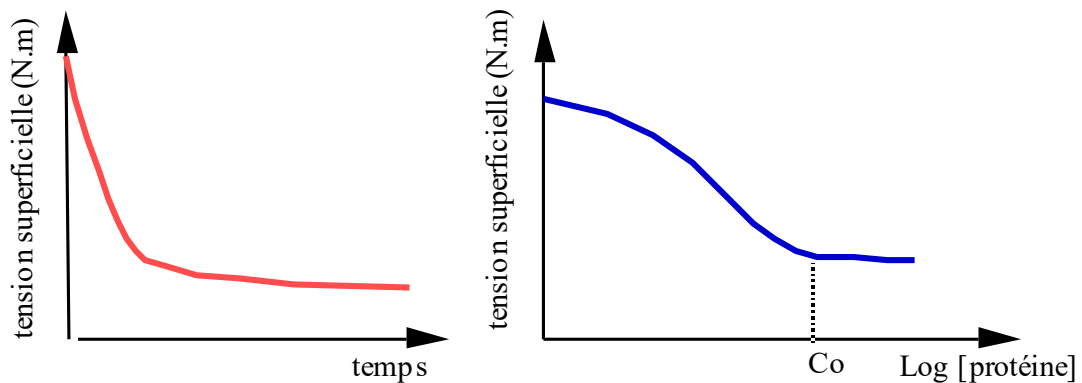


Figure 101 . Variations de la tension superficielle • au cours du temps (pour une concentration donnée en protéine)
• en fonction de la concentration en protéine (à l'équilibre)

Généralement les protéines flexibles et dépliées forment des émulsions peu stables sauf si elles sont soumises à une dénaturation. Les facteurs de contrôle des propriétés émulsifiantes sont la nature, la concentration et la conformation de la protéine, le pH, la force ionique. Un bon pouvoir émulsifiant n'est généralement observé qu'à partir de concentrations protéiques supérieures à 2 g / 100 ml.

La conformation spatiale des molécules protéiques joue un rôle fondamental dans leur aptitude à s'adsorber aux interfaces. La caséine β sans structure ordonnée et de conformation lâche présente une grande flexibilité et une bonne aptitude au déplissement ; la vitesse avec laquelle elle abaisse la tension interfaciale est alors plus élevée que celle de molécules à structure stable et ordonnée.

La vitesse d'adsorption varie beaucoup avec le pH et beaucoup de protéine migrent rapidement à leur pHi si leur solubilité dans la phase aqueuse le leur permet.

Il existe de bonnes corrélations entre l'hydrophobicité de surface des protéines et leur incidence sur les valeurs de la tension interfaciale huile - solution aqueuse de protéine ou encore entre l'hydrophobicité et l'indice d'activité émulsifiante exprimé en $\text{ml}^2.\text{g}^{-1}$. Ce sont les travaux de KATO et NAKAI (Biochim. Biophys. Acta , 1980, 624, 13) qui ont montré ces corrélations (figure 102).

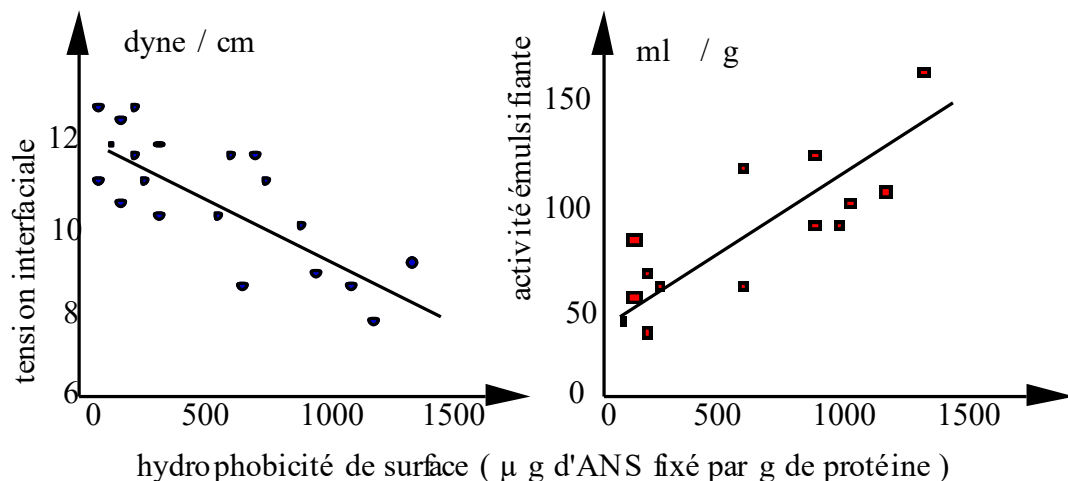


Figure 102. Hydrophobicité de surface des protéines et propriétés émulsifiantes

Ces propriétés émulsifiantes sont déterminées après réalisation d'émulsions *solution protéique - matière grasse* . Plusieurs méthodes sont utilisables :

1) Mesure de la capacité émulsifiante (volume d'huile émulsifié / g de protéine)

L'huile est ajoutée jusqu'à l'inversion de phase évaluée par un conductimètre (huile dans eau : bonne conductibilité ; eau dans huile : très faible conductibilité). Le montage utilisé schématisé figure 103 conduit à une mesure très relative qui dépend de la vitesse d'agitation, de la température, de la nature de l'huile. Pour une protéine donnée, la capacité émulsifiante est plus grande avec des acides gras à chaîne courte et saturés.

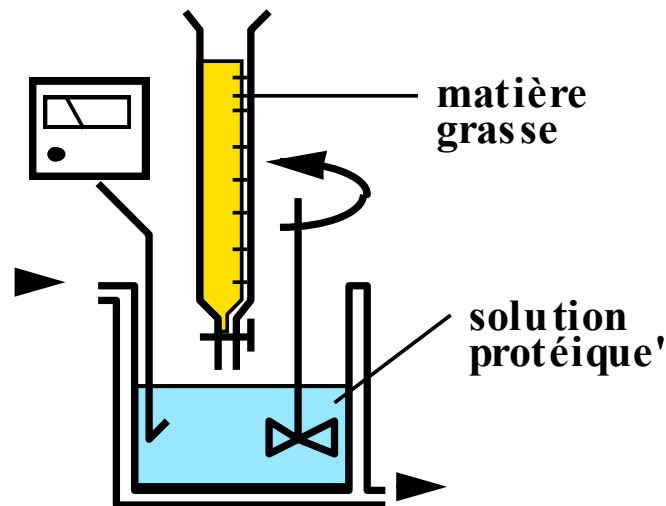


Figure 103. Schéma du système d'évaluation de la capacité émulsifiante des protéines.

Le volume d'huile ajouté au moment de l'inversion de phase correspond à la valeur maximale de la capacité émulsifiante de la protéine. La capacité émulsifiante de la protéine dépend de sa concentration et varie beaucoup d'une protéine à une autre (figure 104). Parfois le démasquage de groupes hydrophobes conduit, pour une protéine donnée, à une augmentation très nette de sa capacité émulsifiante.

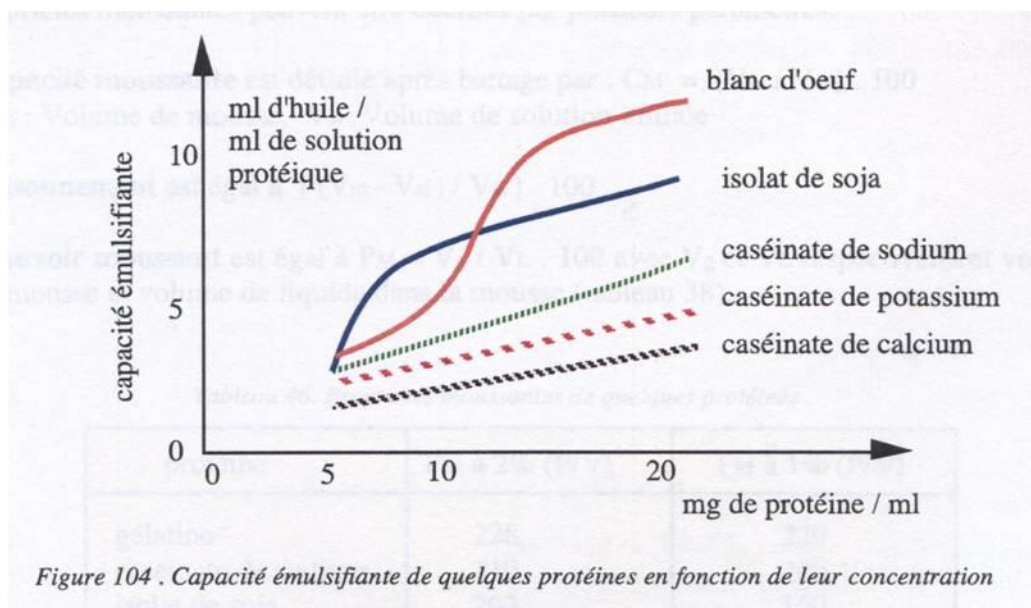


Figure 104 . Capacité émulsifiante de quelques protéines en fonction de leur concentration

2) Stabilité de l'émulsion (méthode INKLAAR)

Elle est déterminée par la mesure de l'huile séparée d'une émulsion solution protéique - huile après décantation ou après centrifugation. Le pourcentage de séparation de l'huile ou le rapport (volume

de l'émulsion "traitée" / volume de l'émulsion initiale) x100 permettent d'estimer cette propriété. Parfois l'émulsion réalisée est soumise à un traitement thermique (80°C, 15 min) avant d'être centrifugée.

Les propriétés émulsifiantes de quelques protéines sont indiquées dans le tableau 45.

Tableau 45. Propriétés émulsifiantes de quelques protéines.

protéine	solubilité (%) N soluble/Ninitial	% séparation de l'huile
isolat de soja	71	44 (bon)
caséinate	100	55
blanc d'oeuf	92	55
protéines bactériennes	30	95 (mauvais)

XVIII.8. PROPRIETES MOUSSANTES

Ces propriétés importantes dans de nombreux systèmes alimentaires (*meringue, cakes, marshmallow, pâtisseries diverses, crème fouettée, soufflés, nappages, crèmes glacées, pain, mousse de bière ou de champagne etc.*) sont déterminées après **battage** d'une solution protéique; il est également possible d'obtenir une mousse par **injection de gaz** dans une solution protéique concentrée (2%) au travers d'une membrane poreuse. La mousse obtenue est constituée de vacuoles d'air (de 1 µm à 1 cm de diamètre) entourées de liquide. La protéine donne à l'interface des interactions hydrophobes avec l'air (ou le gaz) et des interactions hydrophiles avec la phase aqueuse. Pour que la mousse se forme et se stabilise il est par ailleurs nécessaire que les molécules protéiques présentes dans la solution donnent des interactions entre elles; ces interactions ne doivent pas être trop fortes sinon il se produira une agrégation / précipitation et la mousse sera déstabilisée.

Les propriétés moussantes peuvent être décrites par plusieurs paramètres.

- La **capacité moussante** est définie après battage par : $CM = (V_m / V_{si}) \cdot 100$ avec V_m : Volume de mousse, V_{si} : Volume de solution initiale
- Le **foisonnement** est égal à $[(V_m - V_{si}) / V_{si}] \cdot 100$
- Le **pouvoir moussant** est égal à $PM = V_g / V_L \cdot 100$ avec V_g et V_L respectivement volume de gaz dans la mousse et volume de liquide dans la mousse (tableau 38).

Tableau 46. Propriétés moussantes de quelques protéines .

protéine	PM à 2% (P/V)	PM à 1% (P/V)
gélatine	228	220
caséinate de sodium	210	200
isolat de soja	203	150

Pour standardiser l'évaluation des propriétés moussantes il est possible de procéder de la façon suivante: dans un mélangeur batteur donné (type HOBART) procéder de la façon suivante :

60 g de blanc d'oeuf battage 40 secondes Ajouter 46 g de saccharose battage 40 secondes Volume V ₁	60 g de blanc d'oeuf battage 40 secondes ajouter 0,25 g de protéine à tester Ajouter 46 g de saccharose battage 40 secondes Volume V ₂
---	--

Le saccharose en jouant le rôle d'intercalant par liaison hydrogène (plastifiant) contribue à la stabilisation de nombreuses mousses. Pour de nombreuses protéines, le pouvoir moussant est maximum au voisinage du pHi: démasquage de nombreux groupes hydrophobes aptes à donner des interactions avec la phase gazeuse dispersée. Il en est de même après pré-traitement de la protéine par un solvant comme l'acétone ou l'éthanol.

L'addition de sels comme le chlorure de sodium jusqu'à 3% (P/V) améliore le pouvoir moussant par effet de salting in.

La plupart des corps gras ont un effet négatif sur la formation de mousses.

La **fermeté de la mousse** peut être évaluée en cours de battage par la force de torsion (figure 105).

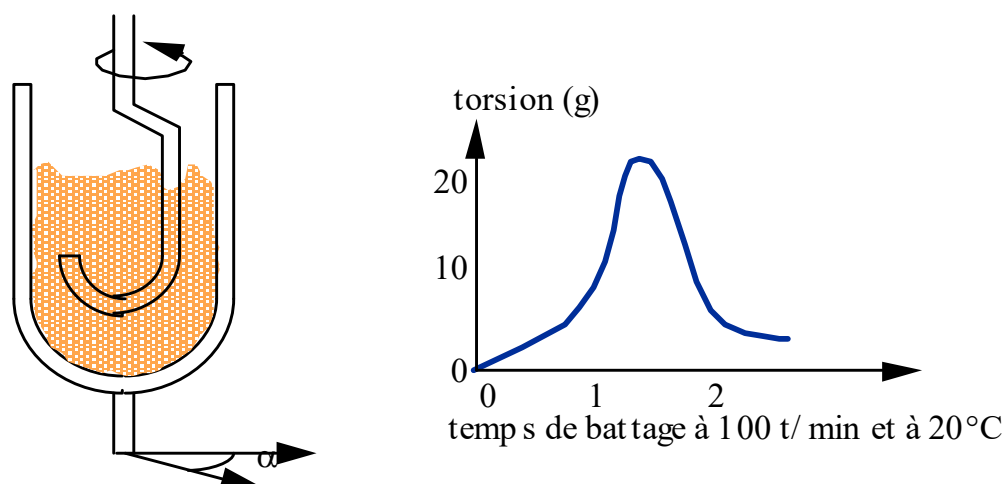
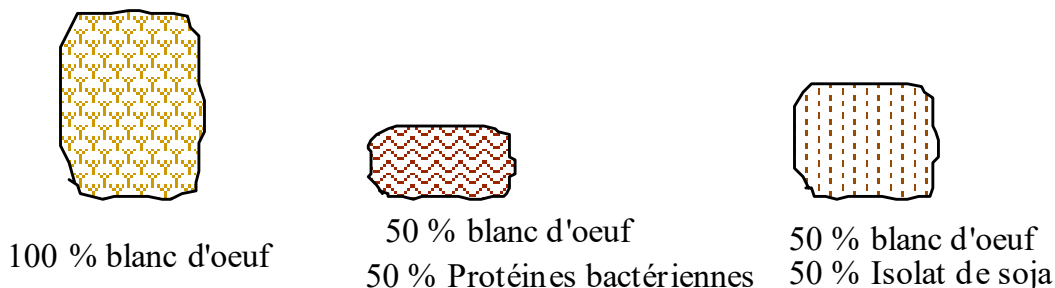


Figure 105. Evaluation de la fermeté de la mousse

Dans le **test meringue** (Angel cake), un bateau est réalisé "normalement" avec du blanc d'oeuf (100%) puis avec la protéine à tester. Le volume final des gâteaux après cuisson (**expansibilité**) sont mesurés et comparés entre eux.



Il est possible de mesurer la **distribution du volume des bulles de gaz** dans un produit type meringue par radiographie aux rayons X. La référence est constituée par les protéines du blanc d'oeuf et les variations de volume moyen des bulles de gaz en fonction du temps de cuisson sont d'excellents indicateurs des propriétés moussantes (figure 106).

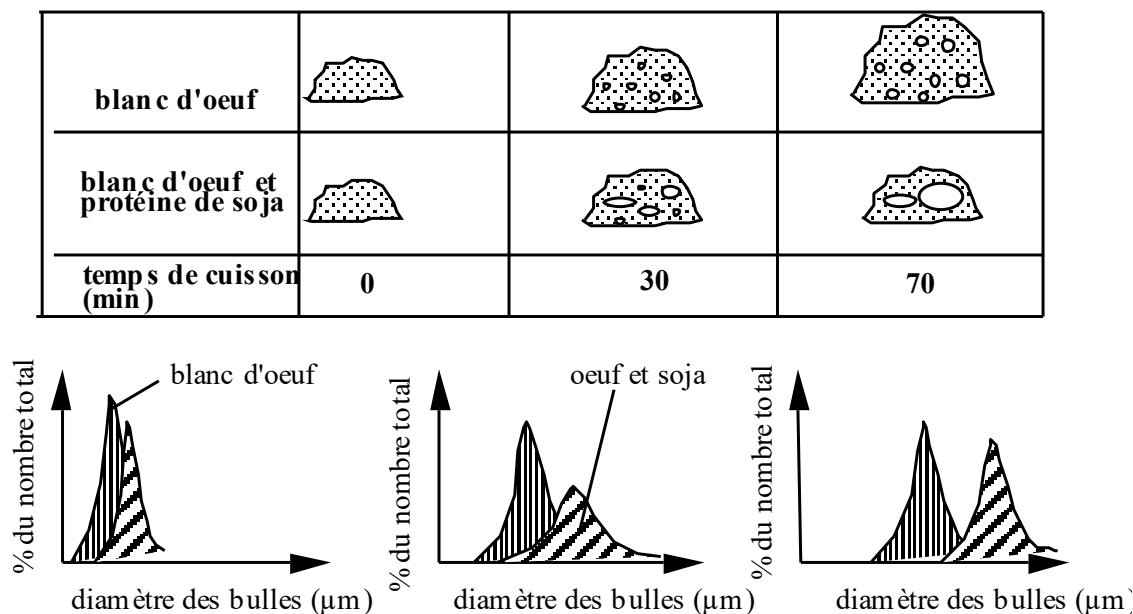


Figure 106. Propriétés moussantes. Variations de la distribution du volume des bulles dans un système type meringue

XVIII.9. AUTRES PROPRIETES (adhésivité, colle,...)

De par leur multifonctionnalité, les protéines peuvent servir de **colles** entre deux matériaux dont les structures de surface sont à même de donner des interactions avec elles. Ainsi les protéines solubles susceptibles de donner de nombreuses interactions hydrophiles (polaires non ionisées au niveau des résidus de glutamine ou des résidus hydroxylés du type hydroxylysine, hydroxyproline ou sérine etc) dans un solvant facilement évaporable à l'interface constituent une excellente colle "papier". Plus une colle est "forte" et plus la densité d'énergie de liaisons établies par unité de surface est grande.

XVIII.10. MODIFICATIONS DES PROPRIETES FONCTIONNELLES

De très nombreux travaux, initiés vers 1975, sont encore aujourd'hui consacrés à l'amélioration des propriétés fonctionnelles des protéines alimentaires. Ces propriétés sont essentiellement fonction des structures primaire, secondaires, tertiaires et quaternaire et dépendent donc surtout des caractéristiques de charge, de la taille, de l'hydrophilicité et hydrophobicité de surface. Les modifications peuvent être obtenues par voie physique (température, pression etc.), chimique ou biochimique (enzymatique) et affecter une structure donnée (il est évident qu'une modification de la structure primaire affectera les autres structures protéiques).

Ces modifications, pour rester applicables, ne doivent pas faire appel à des réactifs toxiques et ne doivent pas diminuer la valeur nutritionnelle. Il s'agit là d'une démarche délicate puisqu'il s'agit de faire réagir avec des protéines « alimentaires » des composants souvent peu spécifiques à qui il est demandé par ailleurs de ne pas manifester de toxicité, donc de ne pas réagir avec les protéines du consommateur potentiel !

XVIII.10.1. Modifications chimiques de la structure primaire

Les modifications de la structure primaire sont généralement obtenues par voie chimique mais en présence d'eau et sous l'effet de la température, il est possible d'obtenir des modifications de

fonctions de chaînes latérales de résidus d'acides aminés (glutamine, asparagine, arginine, cystéine, etc Cf chapitre XXII) et éventuellement des hydrolyses partielles. Ces modifications ont généralement pour objectif principal de fabriquer des **produits biodégradables** destinés à une **utilisation non alimentaire**. Parmi l'ensemble des biopolymères, les protéines sont les seules à posséder la plupart des fonctions réactives de la « chimie organique ». Le nombre de réactions possibles est très élevé et nous n'en sécrirons que quelques unes.

a) Acylation

Elle est généralement obtenue par réaction avec des anhydrides (acétique, succinique, propionique, valérique, maléique). Les réactions d'acylation sont nombreuses et les réactifs utilisés réagissent avec les groupements α ou ε aminés, les fonction alcool, phénol, imidazole et thiol (figure 107).

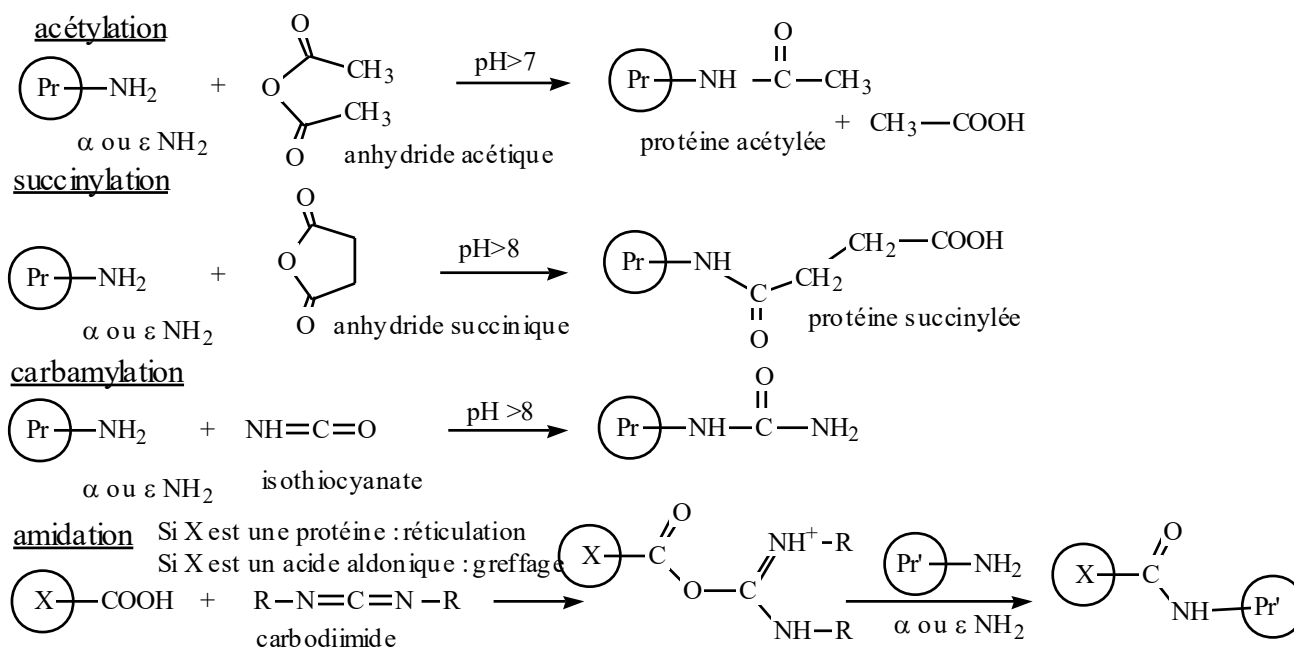


Figure 107. Acylation des protéines

L'acétylation diminue la polarité des protéines en introduisant des fonctions non polarisables sur les fonctions aminées. L'hydrophobicité de la protéine augmentera d'autant plus que la partie aliphatique de l'agent d'acylation sera importante. Il est ainsi possible de greffer des acides gras en utilisant des anhydrides d'acides gras. De telles modifications augmentent l'aptitude au plissement et à l'agrégation des protéines sous l'effet de la température. Généralement, et selon le niveau d'acylation, la molécule devient globalement plus amphipolaire. Les protéines acétylées possèdent une capacité émulsifiante meilleure que celle de la protéine native. Par ailleurs, la stabilité des émulsions est très sensiblement augmentée en présence des protéines acétylées. La capacité moussante est généralement améliorée par cette modification chimique.

La succinylation permet l'introduction de groupes carboxyles ionisables. L'augmentation du nombre de groupes COOH diminue le pHi des protéines modifiées, augmente la charge nette à des pH supérieurs au pHi, entraîne des répulsions électrostatiques, le déplissement et la répulsion. Il en résulte une augmentation de la solubilité, de la capacité de rétention d'eau, une amélioration de la stabilité à la chaleur et une susceptibilité accrue de la protéine ainsi modifiée aux cations divalents comme les ions Ca^{++} . Les propriétés gélifiantes et filmogènes de nombreuses protéiques sont améliorées dans ces conditions.

Le niveau de succinylation influence les propriétés des protéines modifiées : à environ 50 % de succinylation des résidus de lysine, la capacité d'absorption d'eau augmente tandis que le pouvoir émulsifiant diminue ; à 100 % de succinylation, le pouvoir émulsifiant et le pouvoir moussant sont

accrus. L'aire interfaciale occupée par molécule protéique dans la couche monomoléculaire est plus importante après succinylation.

Cette modification décroît la disponibilité nutritionnelle des résidus de lysine.

La carbamylation diminue le nombre de groupes ionisables positivement en leur substituant des groupes aptes à former des liaisons hydrogène particulièrement sensibles aux agents de plastifications comme l'eau ou des composés polyhydroxylés comme le glycérol.

La guanidination substitue un groupe ionisable positivement par un autre qui ne diffère que par son pHi.

L'amidation au moyen d'agent comme le carbodiimide permet, selon les conditions expérimentales, soit des greffages de composés aux propriétés bien définies (greffage de composés polyhydroxylés et obtention de protéines polaires moins ionisables, donc solubles dans une large gamme de pH, soit des réticulations.

Le greffage d'acides gras par des chlorures d'acides permet la lipophilisation des protéines une augmentation de leur hydrophobicité d'autant plus grande que le niveau de réaction est élevé et que la chaîne greffée comporte de groupes CH₂.

Les charges négatives additionnelles améliorent la solubilité, la stabilité à la chaleur, la capacité de rétention d'eau et accroît la sensibilité aux ions bivalents. Il est alors possible de réaliser à froid des gels en présence d'ions bivalents type ions calcium.

Pour la globuline 11 S du soja, la succinylation se traduit, en fonction du nombre de résidus de lysine modifiés, par une dissociation du dodécamère en 2 hexamères puis en 6 dimères.

On a :	11S	7S	3S
	(AB) ₆	2 (AB) ₆	2 (AB)
	dodécamère	2 hexamères	6 dimères

La dissociation s'accompagne d'une modification de la structure tertiaire. Entre 40 et 80% de modification, la viscosité intrinsèque est multipliée par 3 tandis que l'ellipticité (Θ) mesurée par dichroïsme circulaire diminue, ce qui traduit un déploiement des protéines. Les structures secondaires sont affectées à partir d'un niveau de modification de 40%.

En général, l'acylation induit une très grande stabilité thermique (plus de floculation). En solution aqueuse, l'albumine de colza précipite après un traitement thermique de quelques minutes à 50°C. Son acétylation à 80 % ou sa succinylation à 35 % permettent sa solubilité jusqu'à des températures de traitement supérieures à 90°C.

Les gels thermiques obtenus avec des protéines acétylées ont des propriétés mécaniques, évaluées par le module de cisaillement, qui passent par un optimum pour un niveau de modification voisin de 40 %.

La valeur nutritionnelle des protéines est modifiée par leur acylation. La vitesse initiale de protéolyse est augmentée après succinylation mais la disponibilité en acides aminés essentiels diminue. Les protéines de lait acylées sont absorbées mais pas utilisées.

b) Estérification

En milieu acide, les alcools réagissent avec les groupements carboxyliques et amidés pour donner des esters. Cette réaction s'accompagne d'une augmentation du pHi de la protéine.

L'estérification permet le greffage d'acides gras et donc une lipophilisation des protéines.

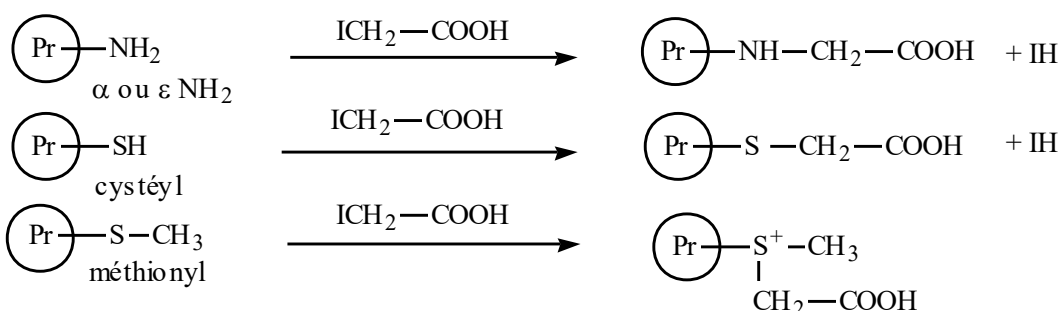
c) Alkylation et glycosylation

L'alkylation des groupements thioéther, thiol, aminé, phénol, imidazole, indole avec des réactifs de type haloacétate ou haloalkylate permet de générer, à partir des groupes réactifs des chaînes latérales, d'autres groupes polaires ionisés ou non et même de transformer certaines de ces chaînes en zones hydrophobes (figure 108).

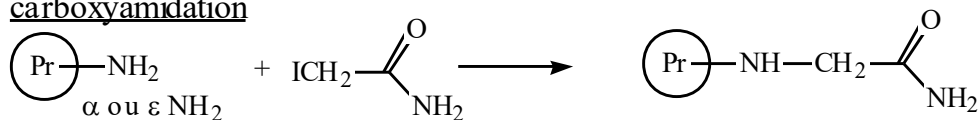
Certaines de ces réactions peuvent conduire à la formation de carbocations. Ces composés peuvent induire des effets mutagènes et même cancérigène quand les molécules impliquées sont les acides nucléiques par exemple.

Ces produits présentent donc une toxicité directe relativement importante et ne restent utilisables qu'à des fins de recherche dans les laboratoires.

carboxyméthylation



carboxyamidation



alkylation réductrice

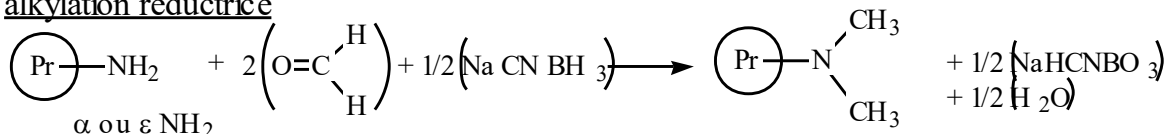


Figure 108. Réactions d'alkylation des protéines.

Il en résulte des modifications dirigées des propriétés des protéines en particulier au niveau de leur certaines de leurs propriétés fonctionnelles.

d) Oxydation et Réduction (Voir chapitre XXII)

Les réactions d'**oxydation** affectent essentiellement les résidus d'acides aminés soufrés et le tryptophane. L'agent oxydant le plus utilisé est l'acide performique (HCOOOH) préparé en mélangeant de l'acide formique et du peroxyde d'hydrogène.

Il existe de nombreux traitements technologiques alimentaires **oxydants** comme les traitements thermiques réalisés à l'air et à chaud (atomisation par exemple), les traitements qui font appel à des composés comme le peroxyde d'hydrogène ou l'hypochlorite de sodium, le contact avec des lipides ou des polyphénols en voie d'oxydation, l'irradiation γ et certaines réactions photocatalysées.

En présence de peroxyde d'hydrogène ou d'hypochlorite de sodium la méthionine est facilement oxydée en méthionine sulfoxyde et plus rarement, dans des conditions drastiques, en méthionine sulfone (figure 109). Le soufre du méthionine sulfoxyde présente une asymétrie qui donne deux isomères d et l.

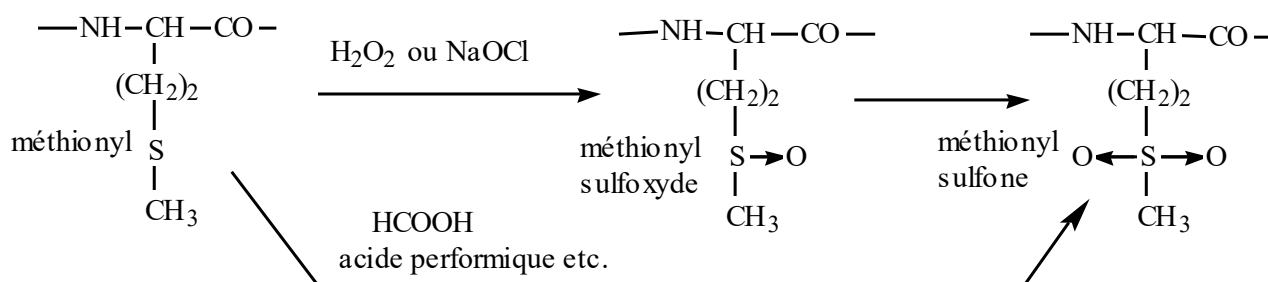


Figure 109. La méthionine et ses dérivés d'oxydation

La vitesse d'oxydation de la méthionine est élevée et dépend surtout de la concentration en agent oxydant et de la température. Ainsi le traitement par du peroxyde d'hydrogène conduit à une oxydation rapide de méthionine avec formation de sulfoxyde.

Les effets de cette oxydation sur les propriétés fonctionnelles sont mal connus. Il est probable, compte tenu du fait que la teneur des protéines en méthionine est relativement basse et que les propriétés du dérivé sont voisines de celles de la méthionine, que la protéine ainsi oxydée ne présente pas de particularisme fonctionnel.

L'oxydation de la cystéine conduit, dans certaines conditions, à la formation de cystine qui est elle-même réduite en présence de réducteurs comme le β -mercaptoéthanol ou le dithiothréitol, en cystéine (figure 110). Les effets d'une telle réaction sont, au niveau de la plupart des propriétés fonctionnelles des protéines, considérables. Généralement, les protéines réduites sont moins solubles que les protéines oxydées et la plupart de leurs propriétés fonctionnelles sont modifiées. La susceptibilité à la dénaturation par la chaleur ou d'autres agents de dénaturation augmente avec le niveau de réduction, la réduction affectant par ailleurs l'ensemble des propriétés de la protéine. Quand l'accessibilité à un grand nombre de résidus est requise (par exemple formation de réseau, digestibilité etc), il est souvent utile de procéder à une réduction qui confère une grande « mobilité » à la protéine.

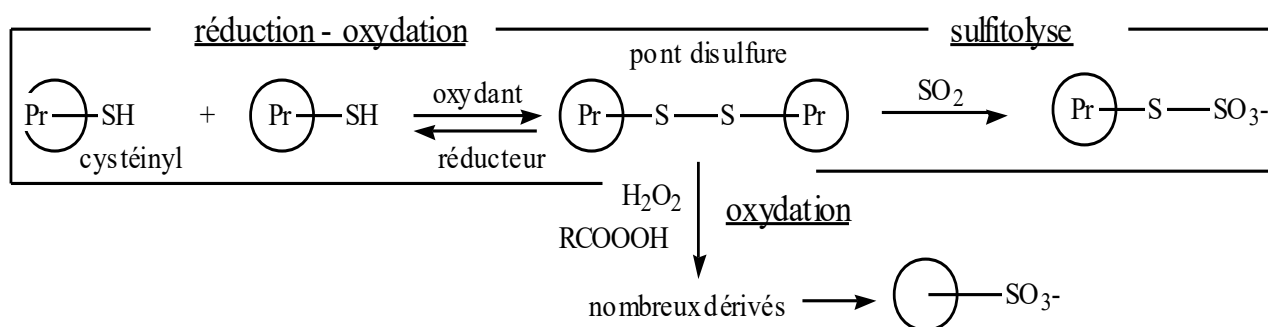


Figure 110. Oxydo-réduction, oxydation et sulfiteolyse des résidus de cystéine

Les composés oxydants peuvent par ailleurs générer de nombreux dérivés d'oxydation à partir de la cystéine (ou de la cystine) et l'asymétrie de l'atome de soufre permet de plus d'envisager de nombreux isomères (mésos avec la cystine, d ou l avec les dérivés sulfoxyde).

Certains de ces dérivés comme la cystine monosulfoxyde et la cystine disulfone peuvent subir une réaction de β -élimination conduisant à la formation de déhydroalanine avec toutes les conséquences que cela engendre quant à la formation de lysinoalanine. Ce type de réaction se produit au cours du chauffage. Les incidences sur la fonctionnalité de la protéines sont importantes.

La réduction par des agents qui sont souvent des alcools-thiols permet de rompre les ponts disulfure présents dans les protéines. Cette modification permet un déplissement plus facile des protéines et donc une meilleure solubilisation.

La sulfitolyse (figure 110) est obtenue par traitement avec des sulfites qui sont largement utilisés en technologie comme agents facilitant la dispersion / solubilisation de certaines protéines filmogènes (gluten). Il s'agit également d'inhibiteurs du brunissement enzymatique et non enzymatique et d'antiseptiques. Ils forment à partir des composés carbonylés ou des bases de Schiff de la réaction de Maillard des sulfonates stables et à partir des ponts disulfure des dérivés S-sulfonés; la rupture des ponts permet en général une solubilisation accrue de la protéine et leur éventuelle reformation pour une réticulation (figure 19). Cette sulfitolyse n'affecte généralement que les ponts disulfure accessibles

Des thiolations des protéines peuvent être obtenues par de nombreux réactifs parmi lesquels le 2-iminothiolane permet un greffage des fonctions thiols sur les fonctions aminées de la lysine essentiellement (figure 111).

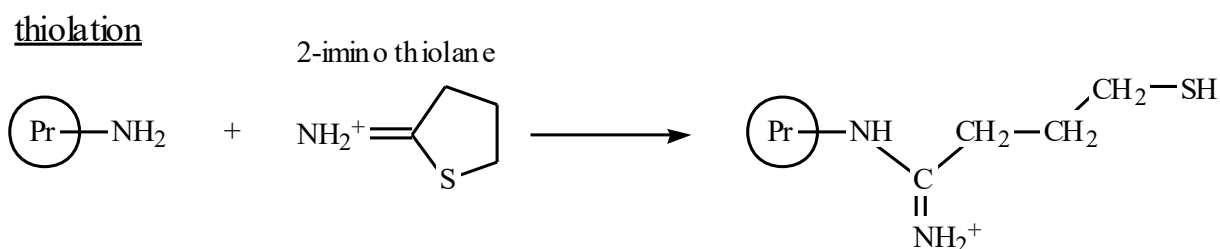


Figure 111. Thiolation des protéines par le 2-iminothiolane

Les protéines ainsi greffées sont aptes à former des ponts disulfure dans des conditions oxydantes. Ces liens covalents, de 300 kJ.mole^{-1} sont à même de contribuer à la formation de réseaux ou de diminuer la solubilité de la protéine.

e) Phosphorylation

La phosphorylation par voie chimique fait appel à des réactifs particulièrement dangereux comme l'oxychlorure de phosphore (POCl_3) ou des mélanges pentoxyde de phosphore - acide phosphorique. Les protéines ainsi phosphorylées et dénaturées présentent une solubilité améliorée dans une large gamme de pH. Ce sont les fonction alcools de la sérine et de la thréonine qui donnent les dérivés les plus stables (liaisons O- phosphoryles). Le pHi de la protéine modifiée est abaissé et sa capacité à fixer des ions calcium est augmentée: possibilité de former des gels à froid.

Il peut se former des liaisons isopeptidiques et de type O-O'-phosphodiester.

Il est possible de réaliser des phosphorylation « douces » par voie enzymatique (kinases) mais les coûts de telles réactions les rendent irréalistes en technologie des protéines.

f) Désamidation

En milieu acide ou alcalin et à chaud ($80^\circ - 1 \text{ h}$), la fonction amide des résidus GLN et ASN est déamidée avec formation de carboxyles. La vitesse de la réaction est plus élevée avec ASN que GLN.

Le chauffage des protéines en milieu peu hydraté ($<1 \text{ g d'eau par g de protéine}$) peut induire des désamidations.

Le traitement du gluten de blé par $\text{HCl } 0,05 \text{ M}$ pendant 15 minutes à 120°C permet d'améliorer très significativement ses propriétés moussantes et émulsifiantes. L'hydrophobicité augmente et le

volume des pains ainsi que son extensibilité diminuent. Par une désamidation à 40 %, la conformation hélicoïdale du gluten est très abaissée.

La désamidation en milieu acide des protéines de soja améliore les propriétés émulsifiantes, moussantes, la solubilité en phase aqueuse et l'adsorption d'eau.

g) Formation de ponts covalents par voie chimique, réticulations - polymérisations.

De très nombreux réactifs bifonctionnels sont actuellement disponibles. Ils permettent, en se liant au niveau des chaînes latérales de résidus d'acides aminés, de former des liens covalents intra ou intermoléculaires. Dans ce dernier cas il seront qualifiés de réticulants (figure 112). Si leurs fonctions réactives sont identiques ils sont qualifiés d'homobifonctionnels alors que si elles sont différentes ils sont qualifiés d'hétérobifonctionnels. Dans le premier cas ces composés se fixent sur des fonctions identiques (NH₂ par exemple); dans le deuxième ils réagissent avec deux fonctions différentes (NH₂, SH ou COOH par exemple).

Du fait de la grande stabilité des liaisons covalentes qui sont le plus souvent établies entre molécules protéiques, les propriétés fonctionnelles des biomatériaux qui les ont subies, et plus particulièrement leurs caractéristiques mécaniques, sont en général très fortement modifiées au cours de ce type de traitement. De plus ces modifications sont souvent irréversibles.

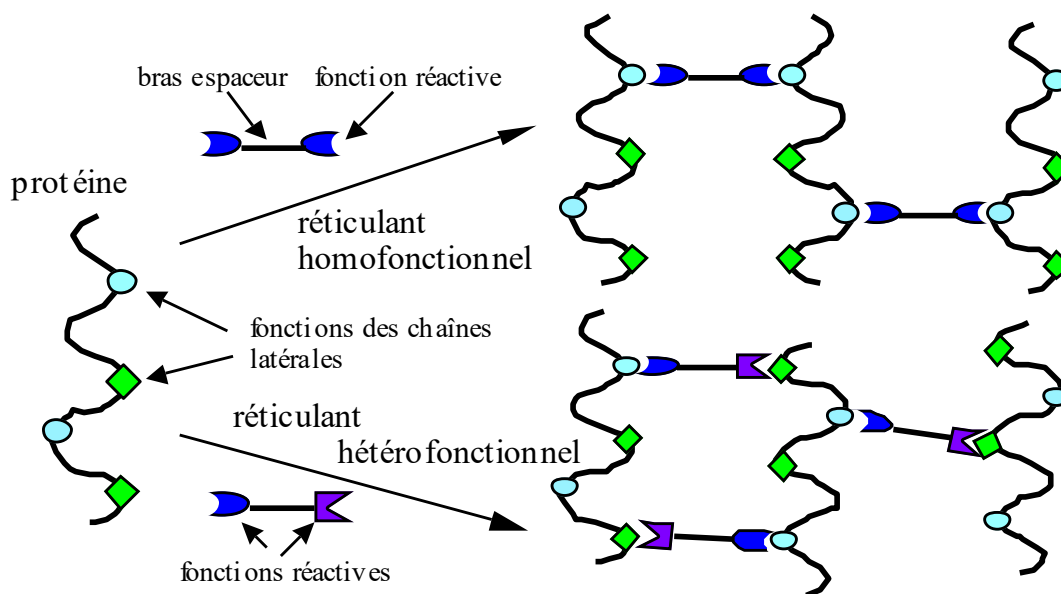


Figure 112. Représentation schématique de la réticulation des protéines

Les composés les plus utilisés parmi les agents réticulants homobifonctionnels sont le formaldéhyde et le glutaraldéhyde.

Avec le **formaldéhyde**, utilisé depuis plus d'un siècle pour le tannage des cuirs et ses propriétés antiseptiques, les réactions sont complexes (figure 113); ce réactif est capable de se polymériser en donnant des complexes mal définis. Il est possible de procéder à la réticulation en solution ou en utilisant des vapeurs de ce composé. Le niveau de réticulation est essentiellement fonction de la concentration en formaldéhyde mais aussi en groupes NH₂ accessibles dans les protéines. Les réseaux protéiques ainsi obtenus sont généralement insolubles en phase aqueuse et dans la plupart des solvants. Leur résistance mécanique est d'autant plus élevée que le niveau de réticulation est important.

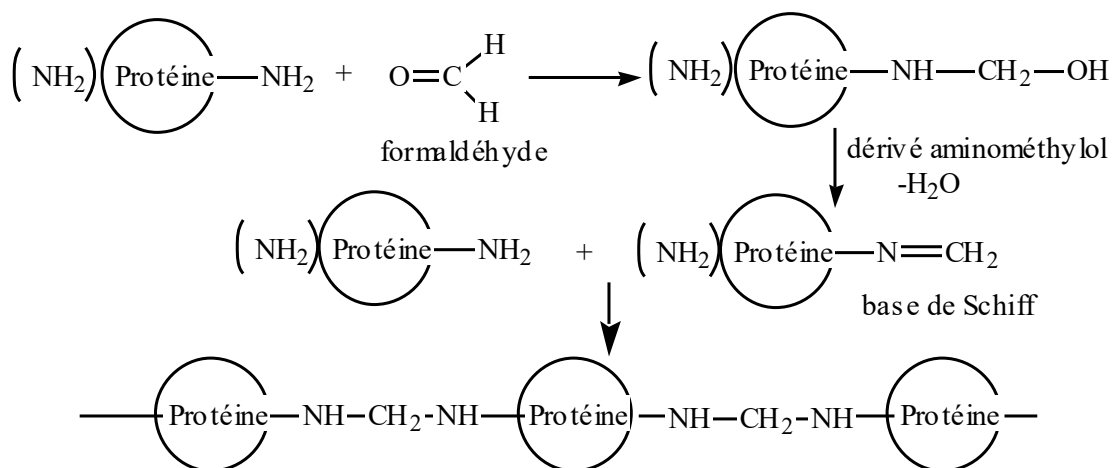


Figure 113. Schéma réactionnel de la réticulation des protéines par le formaldéhyde

Le **glutaraldéhyde** est un des agents les plus utilisés pour réticuler les protéines. Comme le formaldéhyde il peut se polymériser en permettant des pontages de groupes relativement espacés (figure 114).

Parmi les très nombreux réactifs pontants, des réactifs comme le disulfosuccinimidyl-tartrate (sulfo DST) ou le 1,6-bis(maléimido)hexane (BMH) sont aptes à former des ponts covalents respectivement entre les fonctions aminées et les fonctions thiols.

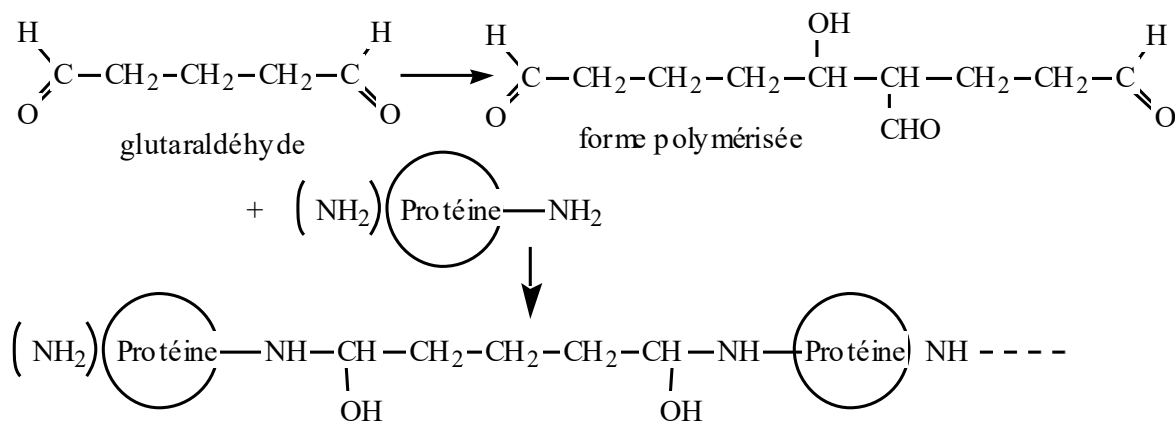


Figure 114. Réticulation des protéines par le glutaraldéhyde

Les **composés réticulants hétérobifonctionnels** disponibles actuellement sont nombreux. Néanmoins, ils restent souvent réservés à des usages de laboratoire et leur prix est très élevé. Les fonctions réactives de la plupart de ces composés leur permettent en général des condensations avec les fonctions thiol et les fonctions amines des protéines. Ainsi un réactif comme le sulfo-SMCC permet de ponter des fonctions amines et des fonctions thiols (figure 115).

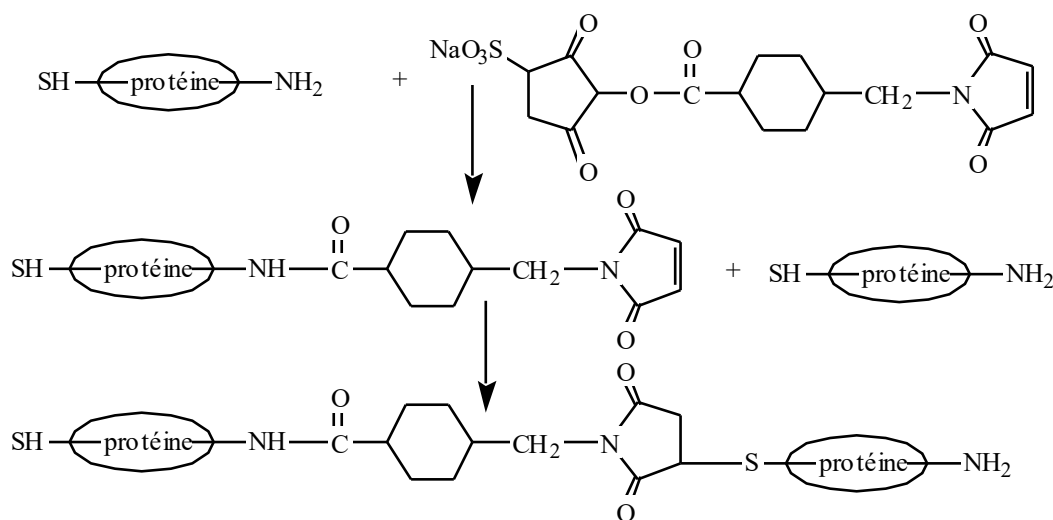


Figure 115. Réticulation par des réactifs bifonctionnels

La digestibilité de la protéine “réticulée” avec ces réticulants est très fortement abaissée et la protéine ainsi modifiée est le plus souvent rendue insoluble dans l’eau.

XVIII.10. 2. Modification des structures secondaires, tertiaires et quaternaire

Certaines de ces modifications sont décrites dans les chapitres précédents et nous ne rappellerons brièvement que les effets de quelques paramètres et/ou traitements importants.

a) pH

Les pH acides ou basiques permettent la fixation soit d’anions soit de cations. La solubilité est minimale au pHi, et aux pH alcalins le déplissement est important. Pour le soja l’alcalinisation à pH 10, suivie d’une neutralisation et d’une atomisation donne un isolat qui gélifie lors de sa réhydratation à température ambiante .

b) teneur en eau

La deshydratation induit des interactions protéine-protéine dont les effets sur les propriétés fonctionnelles sont importants.

c) solvants

Les solvants apolaires démasquent des groupes hydrophobes et dénaturent les protéines. En présence d’éthanol à 20%, une solution de protéine de soja à 8% (P/V) gélifie; si la concentration en éthanol passe à 40%, les protéines précipitent.

d) traitements mécaniques et pressions

Les forces mécaniques de cisaillement liées à l’extrusion ou les hautes pressions hydrostatiques contribuent à modifier les structures secondaires, tertiaires et quaternaire des protéines par modification des liaisons de faible énergie (hydrogène et hydrophobe).

e) traitements thermiques

L’agitation liée à ces traitements modifie les structures protéiques. En milieu aqueux les groupes hydrophobes passent en surface et si l’énergie est suffisante donnent des interactions intermoléculaires aptes à former un gel à des concentrations protéiques voisines de 5%; au-dessus de ces concentrations un précipité se forme généralement. Ces traitements sont indissociables des effets pH, force ionique, teneur en eau etc.. Ces traitements n’affectent que peu la valeur nutritionnelle des protéines; souvent, s’ils ne sont pas trop sévères, ils conduisent même à une augmentation de la digestibilité.

XVIII.10.3. Modifications enzymatiques

Les modifications *in vivo* des protéines se produisent après leur synthèse au niveau des ribosomes pour la plupart d'entre elles. De nombreuses réactions de glycosylation, d'hydroxylation, de phosphorylation, d'acylation, de pontages intermoléculaires sont identifiées de nos jours. La transglutaminase catalyse par exemple la formation de ponts covalents du type ϵ N-(γ -glutamyl)-L-lysine dans des protéines comme le collagène ou la fibrine en favorisant respectivement ainsi le durcissement de l'épiderme ou la coagulation du sang.

Ces modifications enzymatiques sont réalisables dans des réacteurs en continu, mais restent encore, pour la plupart d'entre elles des opérations de laboratoire.

a) transglutamination par la transglutaminase.

L'enzyme (EC 2.3.2.13.) extraite du foie de porc (80000 daltons, calcium dépendante) ou excrétée par des microorganismes (à partir de *Streptoverticillium sp.* l'enzyme extraite a une masse moléculaire égale à 38000 daltons, un pHi = 9, un pH_{op} = 6,5, une t_{op} = 55°C et est insensible au calcium) catalyse les réactions suivantes (figure 116):

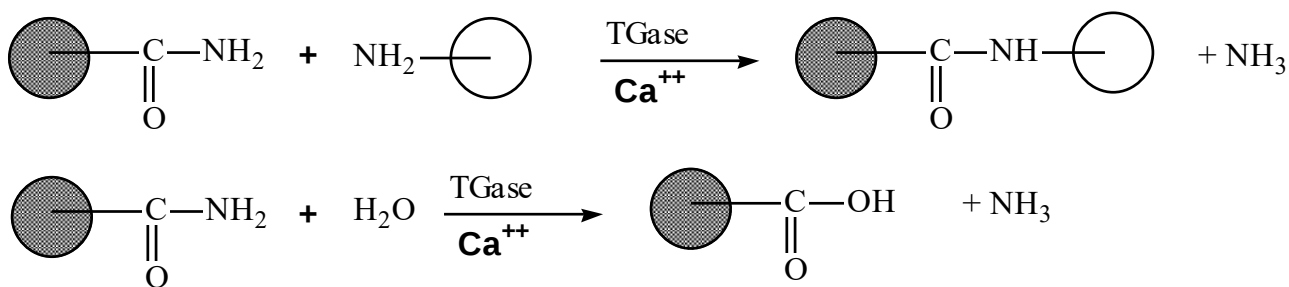


Figure 116. Réactions catalysées par la transglutaminase

Appliqué à des solutions protéiques concentrées, ce traitement conduit à la formation de gels et de films aux propriétés rhéologiques particulièrement intéressantes. Ce gel peut être obtenu à partir d'une émulsion protéine - huile.

La transglutaminase catalyse la désamidation des seuls résidus glutaminyls quand aucun accepteur d'acyle n'est présent dans le milieu réactionnel (bloge des NH₂ de la lysine). Les protéines de céréales riches en glutamine et pauvres en lysine sont d'excellents substrats pour cette réaction. L'amertume d'hydrolysats peut être abaissée par ce type de réaction, le glutamate formé ayant des caractéristiques organoleptiques « typées ».

Il est possible de greffer par cette méthode enzymatique des acides aminés (utilisés sous forme d'esters éthyliques) et des glucides (dérivé glucidique alkylamine comme la glucosamine ou la galactosamine).

b) phosphorylation par des kinases.

Cette réaction est possible par la cAMP-dépendante protéine kinase isolée du muscle cardiaque. La phosphorylation de la β conglycinine ou de la glycine permet d'augmenter la solubilité de ces protéines (ROSS et BHATNAGAR, J. Agric.Food Chem., 1987, 3, 841-844).

c) protéolyse.

La liaison peptidique est hydrolysable en milieu aqueux par des protéases dont la spécificité est liée à la nature de la chaîne latérale des acides aminés. Une telle hydrolyse qui ne modifie pas la composition améliore généralement la digestibilité. Elle induit une augmentation de la solubilité mais diminue généralement, au delà d'un certain seuil, les possibilités de texturation.

Une protéolyse limitée des protéines du gluten par la subtilisine permet une expansion de la pâte au cours de la fabrication du pain. La capacité moussante est améliorée mais pas la stabilité des mousses. Une hydrolyse plus poussée entraîne la formation de petits peptides (Pronase - 12 h) dont certains ont des activités opiacées. Ainsi les peptides ont des activités physiologiques reconnues (tableau 47).

Tableau 47. Exorphines de protélysats de gluten.

IC₅₀ est la concentration inhibitrice de 50 % de la contraction musculaire - récepteur δ - μ M

séquence	nom	origine	IC ₅₀
gly-tyr-tyr-pro-thr	A5	gluténine HPM	60
gly-tyr-tyr-pro	A4	gluténine HPM	70
tyr-gly-gly-trp-leu	B5	gluten	0,02
tyr-gly-gly-trp	B4	gluten	3,4
tyr-pro-gln-pro-gln-pro-phe	gliadorphine	α -gliadine (43-49)	
tyr-gly-gly-phe-leu	encéphaline		

La protéolyse spécifique limitée de la liaison Phe-Met de la caséine κ par la chymosine libère un glycopeptide hydrophile, ce qui permet l'établissement de liaisons de type hydrophobe entre les molécules de protéine résiduelle (paracaséinate) avec formation d'un réseau.

Elle intervient, de façon plus ou moins limitée, dans des phénomènes de :

- texturation (présure et coagulation des caséines)
- clarification (bière)
- attendrissement (viandes)
- amélioration de la texture de fromages (affinage)
- obtention d'hydrolysats de protéines végétales ou de protéines de poisson.

La protéolyse se traduit par une rupture des liaisons peptidiques avec comme conséquences une augmentation du nombre de groupes polaires (NH_3^+ et COO^-), une diminution de la masse molaire et des variations de conformation.

Les principaux paramètres de contrôle de la protéolyse sont la nature de l'enzyme, le rapport E/S, la température et le pH.

1) Evaluation du degré d'hydrolyse

- Le degré d'hydrolyse peut être évalué par estimation des masses molaires des peptides obtenus (FPLC, HPLC, électrophorèse capillaire).

• Il est possible de l'obtenir par titration des protons libérés à pH constant. Dans ce dernier cas l'hydrolyse d'un lien peptidique se traduit, pour des pH inférieurs à 8 par la formation d'un NH_3^+ et d'un COO^- . On a alors :

$$\text{D.H.} = \frac{1}{\alpha} \cdot \frac{\text{moles de base / g protéine}}{\text{Nombre(Eq) liens peptidiques / g protéine}}$$

avec α coefficient de dissociation moyen des groupes α -aminés

$$\alpha = \frac{10^{\text{pH} - \text{pK}}}{1 + 10^{\text{pH} - \text{pK}}}$$

Le pK moyen des groupes α -aminés varie entre 7,7 et 7 entre 25 et 60°C.

- Le degré d'hydrolyse peut être également évalué par mesure de l'azote non protéique libéré au cours de la réaction (après précipitation des polypeptides de poids moléculaire relativement élevé par de l'acide trichloracétique par exemple), par dosage des groupements α aminés (ninhydrine, TNBS, OPA).

2) Les protéases

Aux classiques trypsine, chymotrypsine, pepsine, papaïne sont venues s'ajouter de très nombreuses protéases microbiennes (Pronase, rapidase, alcalase etc). Le plus souvent le rapport E/S est égal au maximum à 1/100 pour minimiser les phénomènes d'autolyse.

Quelques propriétés de protéases de diverses origines sont données dans le tableau 48.

Tableau 48. Propriétés de quelques protéases.

	Origine		pH optimum		T°op °C
			Dégradation	Resynthèse	
Protéases acides					
Pepsine	animale	Souris	1,8	4,5	50
Molsin	microorganisme	<i>Aspergillus saitoi</i>	2,8	5,5	
Rapidase	microorganisme	<i>Trametes sanguinea</i>	3,0	4,0	
Protéases à sérine					
α chymotrypsine	animale	Bovine	7,8	5,0	40
Trypsine	animale	Bovine	7,7	5,5	40
Subtilisine	microorganisme	<i>Bacillus subtilis</i>	8	6,5	
Pronase	microorganisme	<i>Streptomyces griseus</i>	8	6	
Biopase	microorganisme	<i>Bacillus subtilis</i>	10,5	6	
Coronase	microorganisme	<i>Rhizopus</i>	7	4,5	
Prozyme	microorganisme	<i>Streptomyces</i>	8	5,5	
Sulphydryl protéases					
Papaïne	végétale	<i>Papaya carica</i>	7,8	5,5	65
Bromélaïne	végétale	<i>Ananas sativus</i>	5,8	5,5	50
Ficine	végétale	<i>Ficus carica</i>	5,8	5,5	40
Actinidine	végétale	<i>Actinidia chinensis</i>	5,7		35
Mélanges de protéases					
Pronase	microorganisme	(<i>Streptomyces griseus</i>)	7,8		50
Alcalase	microorganisme	(<i>Bacillus licheniformis</i>)	8,6		60
Neutrase	microorganisme	(<i>Bacillus subtilis</i>)	6		56

3) Quelques applications

La plus classique est l'augmentation de la solubilité de l'hydrolysate par rapport à la protéine native. Les pouvoirs moussant, émulsifiant et la rétention d'eau sont généralement améliorées par hydrolyse partielle. Les hydrolysats obtenus sont plus stables à la chaleur et peuvent être stérilisés. La rétention d'arômes diminue avec le D.H. et l'hydrolyse peut générer des peptides amers.

Les capacités moussantes et émulsifiantes sont optimales pour DH compris entre 4 et 6; dans ces conditions le pouvoir gélifiant disparaît complètement.

d) La réaction plastéine.

1) Historique (Fujimaki et Arai, 1975)

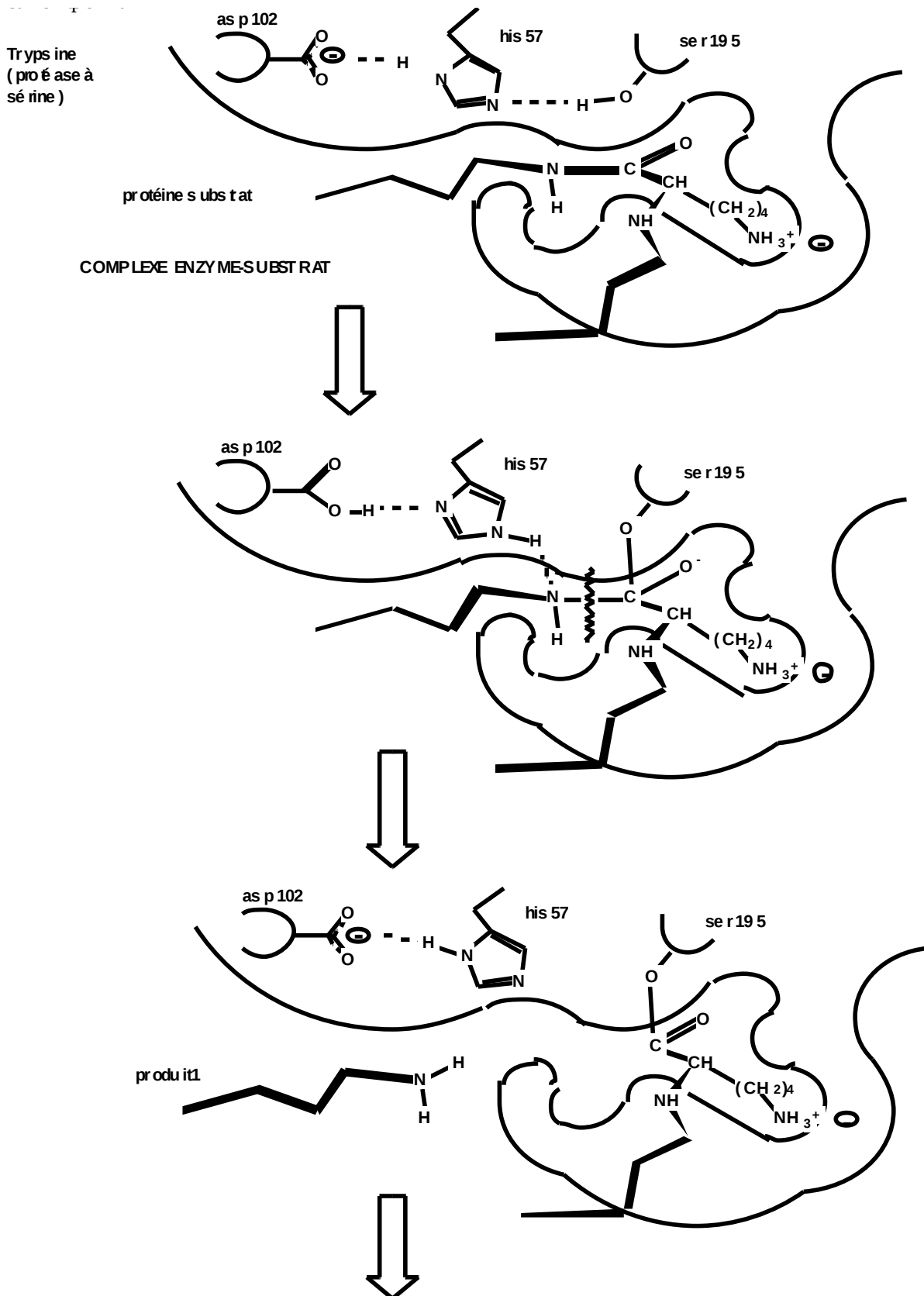
- Quand un concentré protéique de soja à 1 % (P/V) est hydrolysé par protéase bactérienne à pH = 2,8, l'hydrolysate est constitué par une fraction insoluble dans l'acide trichloracétique à 10 % et cette fraction représente 30 % du poids sec.
- Quand l'hydrolysate est concentré à **40 %** (P/V) par évaporation partielle, puis incubé avec la protéase bactérienne à pH 6 pendant 72 h, la fraction insoluble dans l'acide trichloracétique à 10 % passe à 80 % (du poids sec de l'hydrolysate). Il y a donc eu resynthèse par condensation ou/et transpeptidation.

Il s'agit donc d'une resynthèse protéique par transpeptidation en utilisant des protéases dans un milieu dont la concentration en substrat nucléophile (NH_2) est très élevée. Des esters d'acides gras ou d'acides L-aminés peuvent réagir et être ainsi incorporés à la plastéine dont le poids moléculaire peut atteindre quelques dizaines de milliers. Ce procédé est coûteux et ne génère pas de plastéines aux propriétés de texturation suffisamment intéressantes pour être développé.

2) Dégradation enzymatique des protéines (cf XVIII.10.3 - protéolyse)

Elle est fonction de la spécificité de la protéase, du substrat, de $[E]$ et $[S]$, du pH, de la température, de la force ionique encore de la présence d'inhibiteurs. La spécificité est bien connue : la pepsine est une protéase acide qui catalyse l'hydrolyse des liaisons peptidiques à acides aminés aromatiques, l' α chymotrypsine celle des liaisons impliquant trp, tyr, phe par leur fonction COOH , la papaïne ou la trypsine celle des liaisons impliquant arg et lys par leur fonction COOH . Leur pH optimum de dégradation et de resynthèse est indiqué dans le tableau 48.

La plupart des mécanismes réactionnels sont connus. Par exemple la protéolyse catalysée par la trypsine (protéase à sérine) est schématisée sur la figure 117.



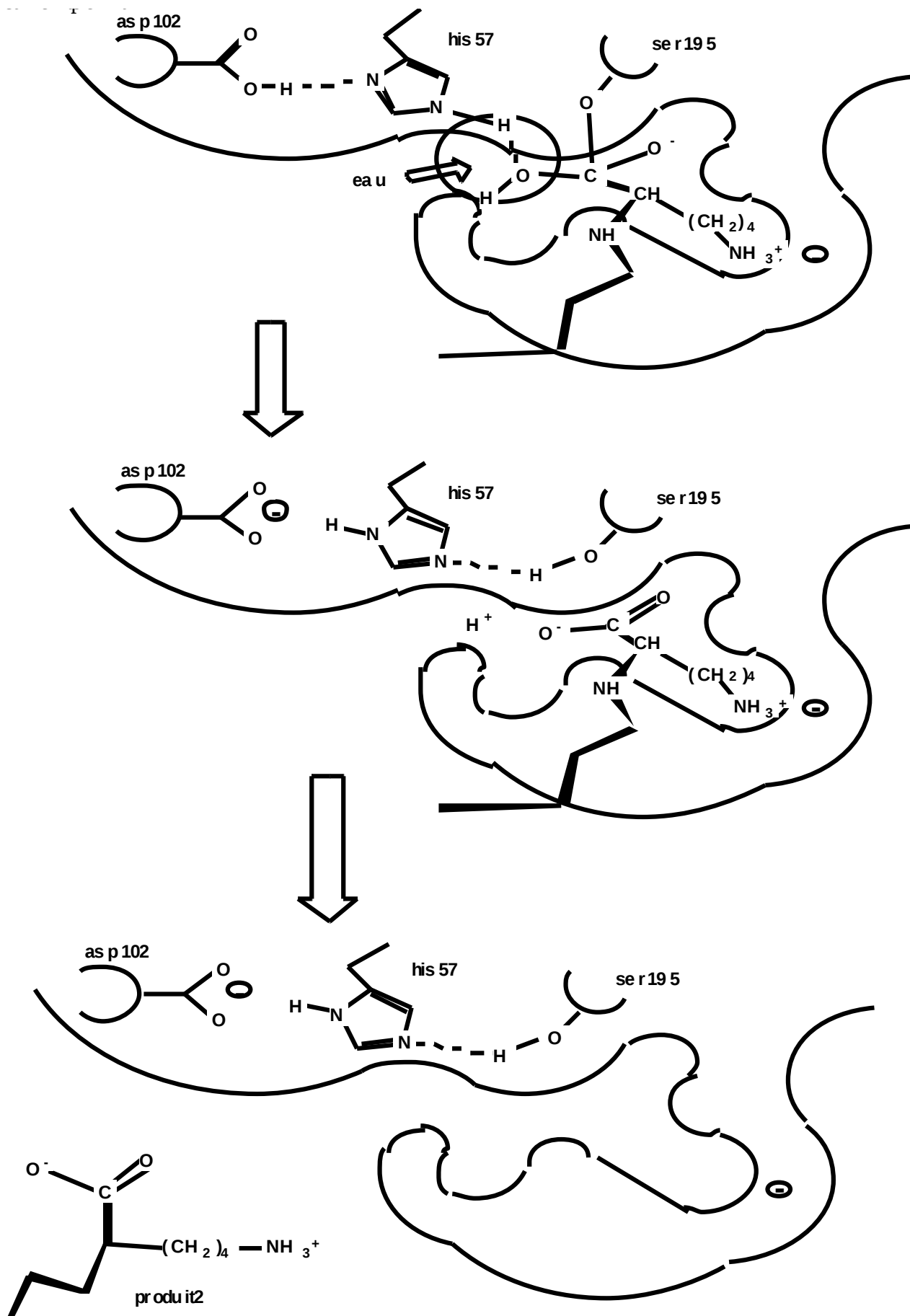


Figure 117. Protéolyse par la trypsine.

3) Resynthèse enzymatique des protéines

Il est d'abord nécessaire que le substrat ait une masse moléculaire peu élevée (tétra à hexa peptides - des substrats de masse moléculaire inférieure à 1000 D donnent généralement des plastéines dont la masse moléculaire est de l'ordre de 2 à 3 000 D.

Il faut ensuite que la concentration en substrat soit l'ordre de 20 à 40 % (w/v).

Ces effets de la concentration en substrat sont schématisés sur la figure 118.

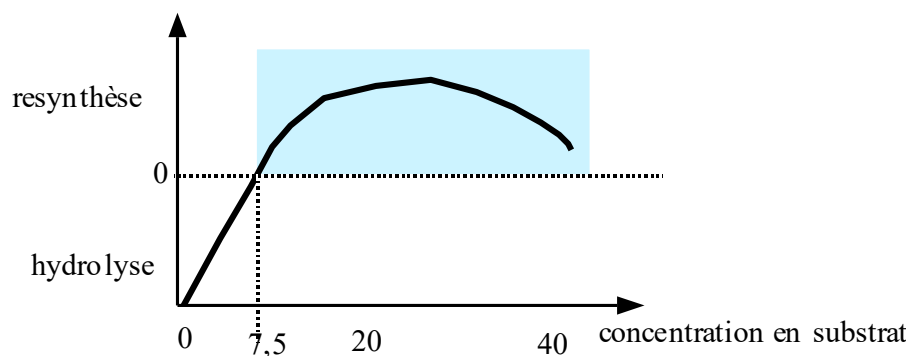
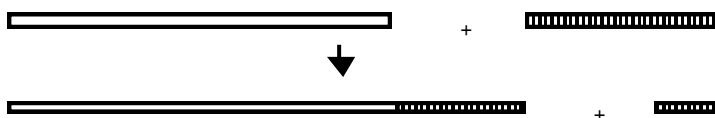


Figure 118. Effet de la concentration de l'hydrolysat sur l'évolution de la réaction

La synthèse peut se faire par transpeptidation ou par condensation (figure 119).



La voie (dégradation ou synthèse) dépend de la concentration en substrat nucléophile (eau ou NH₂).

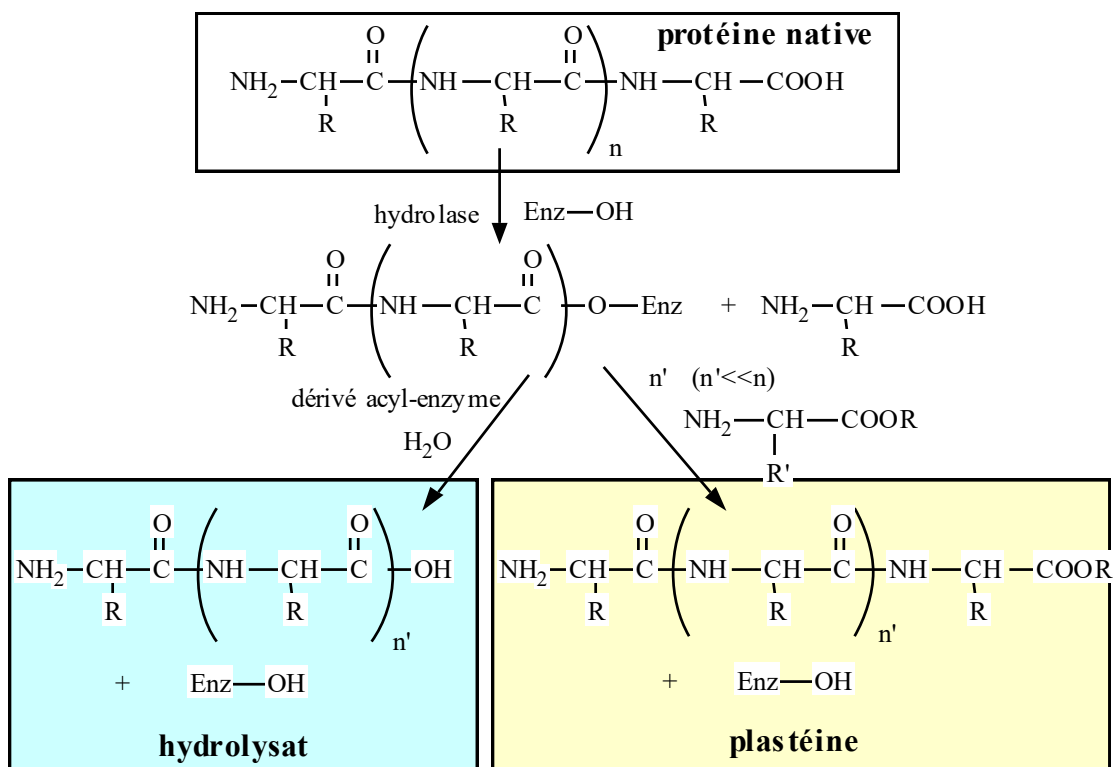


Figure 119. L'hydrolyse des protéines et la resynthèse « plastéine »

Des acides aminés libres apparaissent dans la réaction plastéine. Il y a donc des transpeptidations qui se produisent. Si l'attaquant nucléophile est un pentapeptide (5) à 100 % , on obtient : 8 % de peptide à 5 résidus, 23 % de peptides à 10 résidus, 27 % de peptides à 15 résidus, 22 % de peptides à 20 résidus et 20 % de peptides à 25 résidus d'acides aminés.

4) Propriétés des plastéines

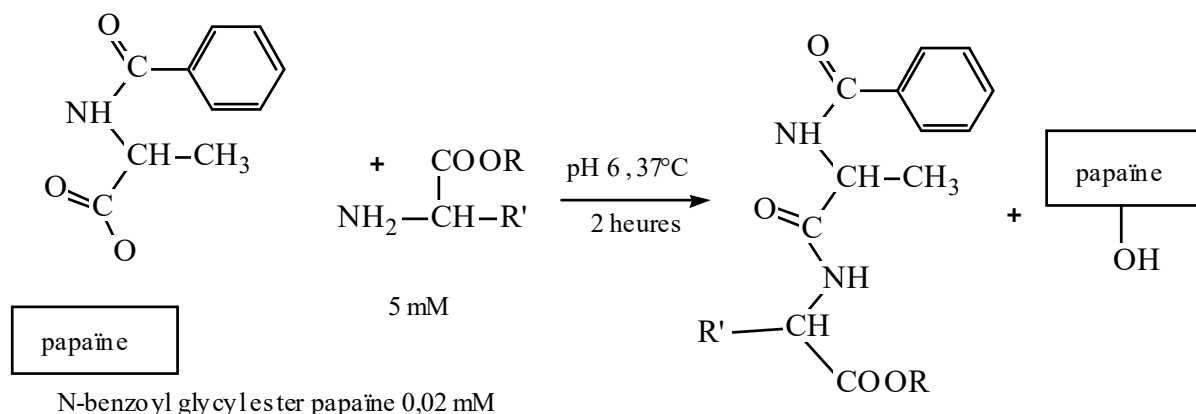
Les plastéines sont en général peu soluble dans l'eau. Le tryptophane semble s'internaliser comme le montre la fluorescence tandis que l'hydrophobicité est accrue (fixation de solvant apolaire)

	Substrat	Plastéine
Fluorescence (nm) par la présence de trp	356	348
Quantité de n heptane fixée (g/kg)	52	12,7

La formation de plastéine est généralement accompagnée de gélification. Les plastéines sont insolubles dans l'éthanol ou l'acétone.

5) Applications

Les esters L (et pas D) des amino acides ajoutés au milieu réactionnel contenant l'hydrolysate protéique sont en général incorporés au cours de la resynthèse. Il est donc possible de préparer des plastéines de composition voulue.



La vitesse d'incorporation des esters éthyliques des acides aminés dans un tel système est très variable (V en $\mu\text{mole} / \text{mg papaine.min}$) (tableau 49).

Tableau 49. Vitesse relative d'incorporation d'esters dans une plastéine

Gly - OEt	0,007	L met -OEt	0,115	(Dmet OEt: 0,000)
L Ala-OEt	0,016	L tyr- OEt	0,120	
D Ala OEt	0,000	L Phe- OEt	0,127	
L-Val-OEt	0,005	L Trp- OEt	0,132	
L-Leu- OEt	0,119	L Glu - $\alpha\gamma$ OEt	0,109	
L-Ileu- OEt	0,005	L Lys -OEt	0,043	

Il est possible d'améliorer la **valeur nutritionnelle** de protéines limitantes par la réaction plastéine. Pour le soja (figure 120), il est nécessaire d'augmenter la teneur en acides aminés soufrés pour augmenter l'indice chimique et donc la valeur nutritionnelle. Après incorporation de l'acide aminé limitant, la plastéine obtenue a généralement une bonne valeur nutritionnelle (rat).

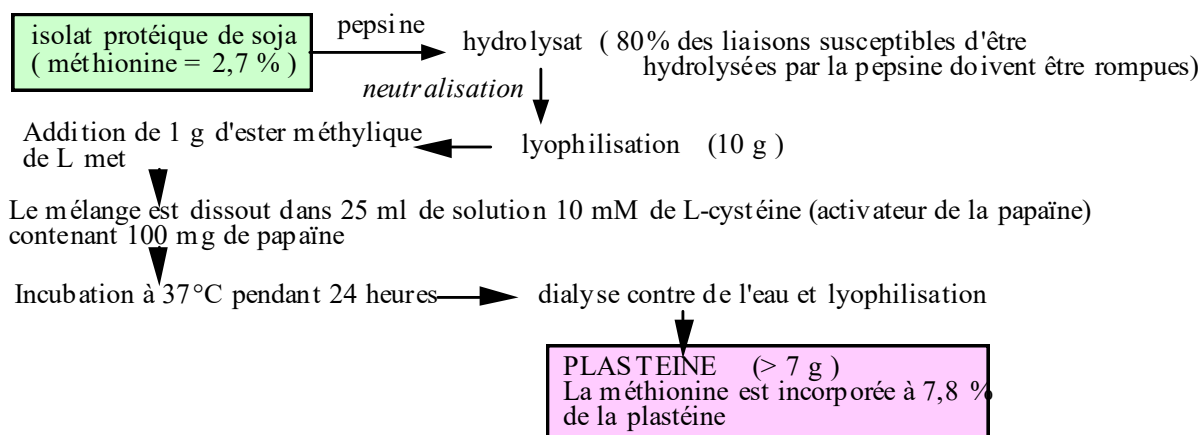


Figure 120. Fabrication d'une plasteine enrichie en méthionine à partir de soja.

Le CEP de l' isolat de soja est égal à 2,4 et le CEP de la plasteine synthétisée dans les conditions décrites est égal à 3,4. La composition en acides aminés (g/100 g) de l'isolat et de la plasteine correspondante déterminée après hydrolyse (24 heures, 110°C, HCl 6M) est indiquée dans le tableau 50.

Tableau 50. Composition en acides aminés du soja et de sa plasteine

	isolat	plasteine		isolat	plasteine
Lys	5,3	4,7	Glu	15	10
The	2,6	2,1	Asp	8,7	7,7
Val	3,4	4,3	His	2	2,2
Ileu	3	5,7	Arg	5,9	5,6
Leu	5,2	7,3	Ser	3,5	2,8
Tyr	2,8	3,5	Pro	4,3	2,2
Phe	4,2	5,9	Gly	4,4	2,6
Trp	1,3	1,3	Ala	4	2,7
Met	1,2	8			
Cys	1,8	2,0			

Dans le cas du gluten il faut enrichir les protéines en lysine. La vitesse d'incorporation de L- lys éthyl ester est très faible et cela nécessite une méthode d'incorporation différente de celle utilisée avec la méthionine (figure 121)

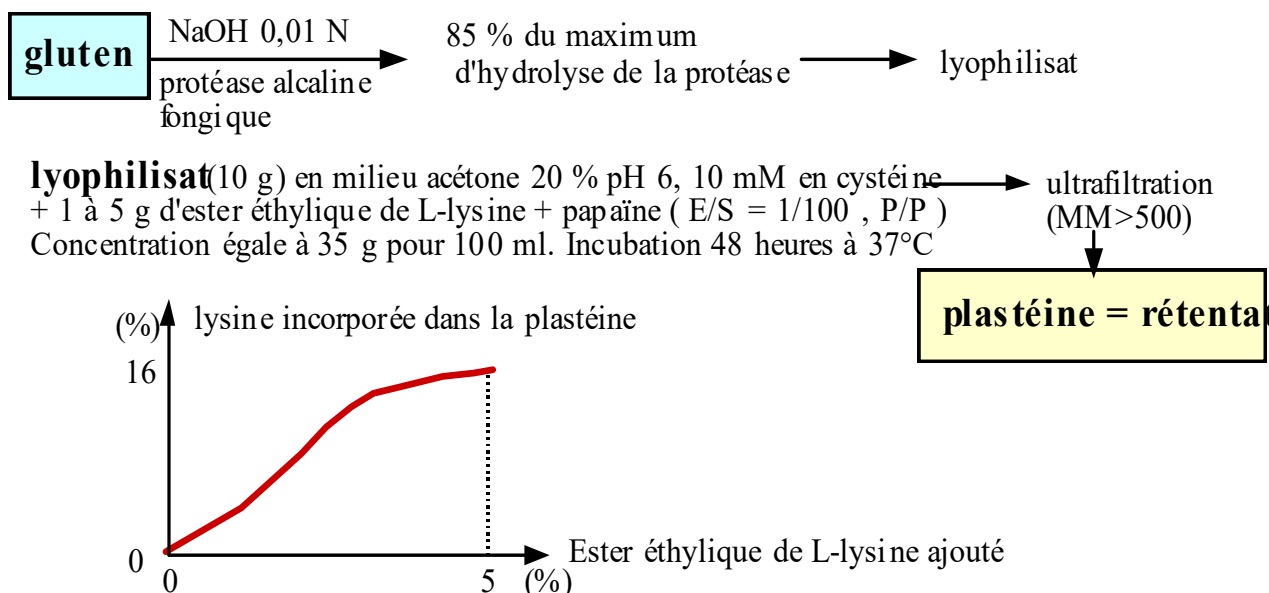
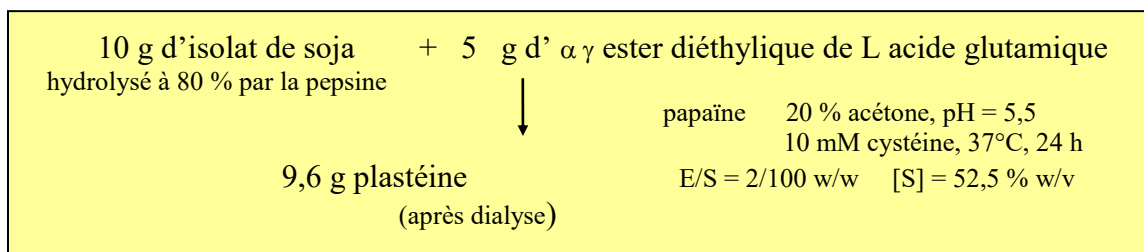


Figure 121. Fabrication d'une plastéine enrichie en lysine à partir de gluten.

L'amélioration simultanée des taux de lysine, méthionine, et tryptophane dans des protéines déficientes est réalisable par cette méthodologie.

Il est également possible d'améliorer la **solubilité** des protéines (soja). Les protéines de soja dénaturées sont peu solubles dans l'eau. On peut améliorer leur solubilité en incorporant de grandes quantités d'acides aminés hydrophiles (glu).



La teneur en acide glutamique passe de 15 % dans l'isolat à 40 % dans la plastéine. La plastéine obtenue est soluble de pH 1 à 9, à 100°C pendant 1 h (70 % du soja initial est insolubilisé par ce type de traitement).

Une des applications les plus réalistes de cette réaction plastéine est la préparation de plastéines à taux très bas de phénylalanine (aliments diététiques). En cas de phénylcétonurie, il est en effet nécessaire d'avoir une alimentation pauvre en phénylalanine.

Concentré protéique de poisson

ou

Isolat protéique de soja

et

1) Pepsine + Pronase

pour libérer Phe, Tyr, Trp en plus grande quantité que les autres acides aminés;
2) ces acides aminés sont éliminés par chromatographie sur Sephadex G-15.

3) La fraction peptidique lyophilisée est additionnée de L-tyrosine éthyl ester de L-tryptophane éthyl ester est incubée en présence de papaïne.

Une **plastéine à faible taux de phénylalanine** est ainsi obtenue. Sa teneur en phénylalanine est de 0,05 % dans une "plastéine fish" et de 0,23 % dans une plastéine de soja.

Une des autres applications de cette réaction est la possibilité d'**élimination de composés indésirables** qu'elle offre. Le principe en est le suivant (figure 122).

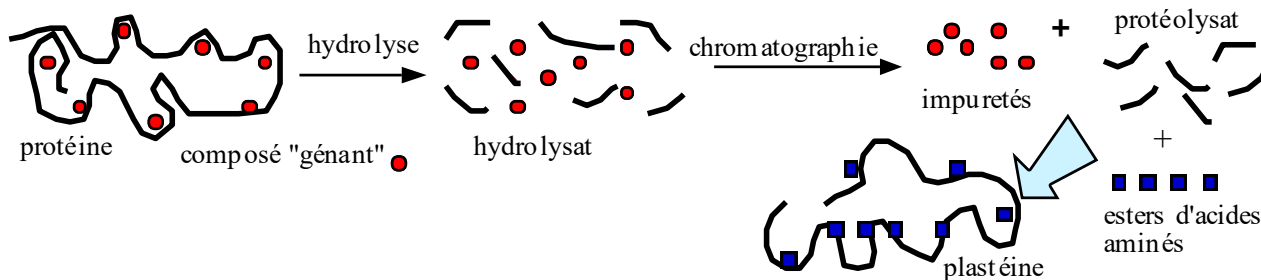


Figure 122. Schéma de l'élimination de composés associés aux protéines par la réaction plastéine

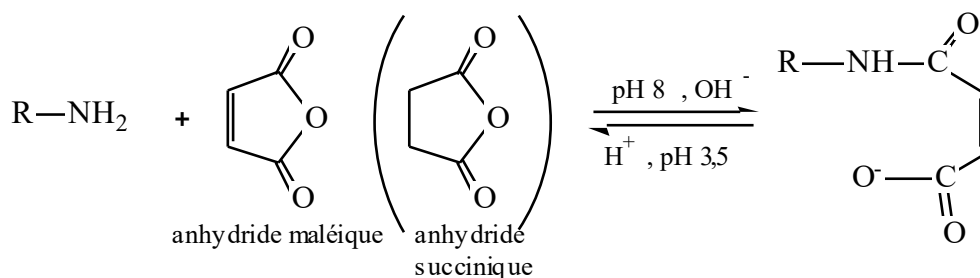
Il est ainsi possible de désodoriser (élimination de 1 hexanol, 1 hexanal), de délipider (triglycérides, acides gras, phosphatidyl choline, saponines, levures sur hydrocarbures), de décolorer (algues vertes), de désaméreriser par élimination de peptides amers (Gly-Leu, Leu-Phe, Phe-Leu, Leu-lys, Arg-Leu, Arg-Leu-Leu, Tyr-Phe-Leu, Ser-Lys-Gly-Leu, etc...)

XVIII.10.4. Incorporation d'acides aminés aux protéines par liaison covalente.

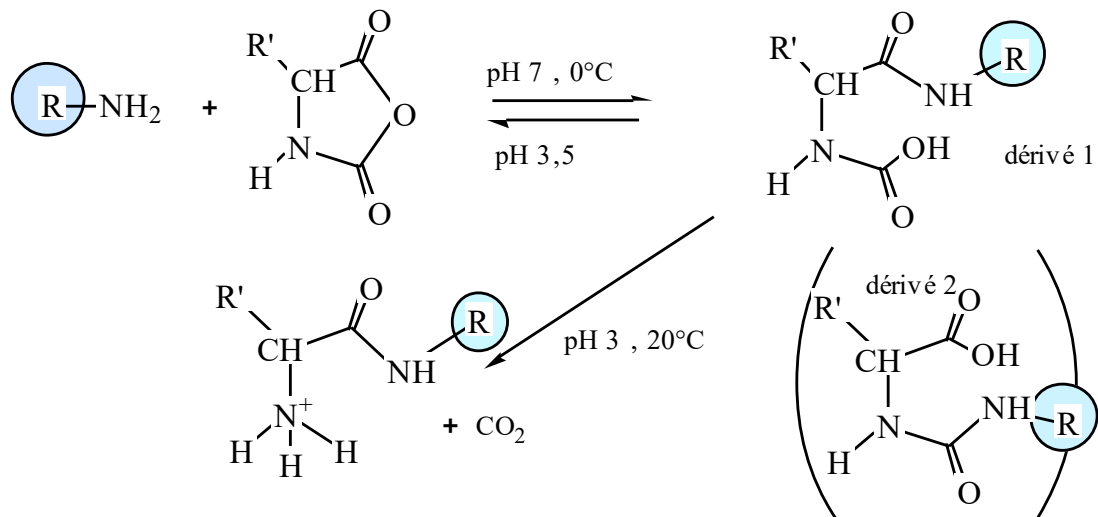
Cette incorporation de l'acide aminé par liaison covalente est favorable car l'acide aminé sous forme de résidu est **plus stable** au cours des traitements technologiques auxquels la protéine sera soumise avant consommation.

a) Condensation chimique directe.

Whitaker et Feeney ont montré que des anhydrides d'acide (anhydride succinique, maléique etc) pouvaient se condenser avec des acides aminés selon la réaction :

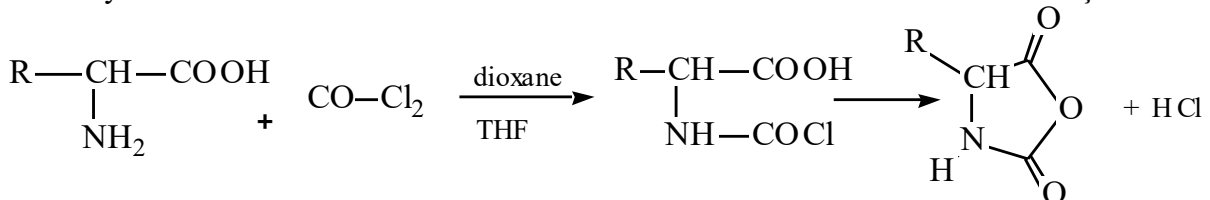


(la succinylation affecte les résidus lys mais aussi les résidus tyr, thr, cys, ser, thr). Il se forme des liaisons isopeptidiques généralement hydrolysables *in vivo*. Il est possible d'utiliser des dérivés d'acides aminés comme des N-carboxyanhydrides (Puisserver). Si on désire supplémenter en méthionine : on choisit un anhydride mixte d'acide aminé qui se condensera sur les α ou les ϵ NH_2 .



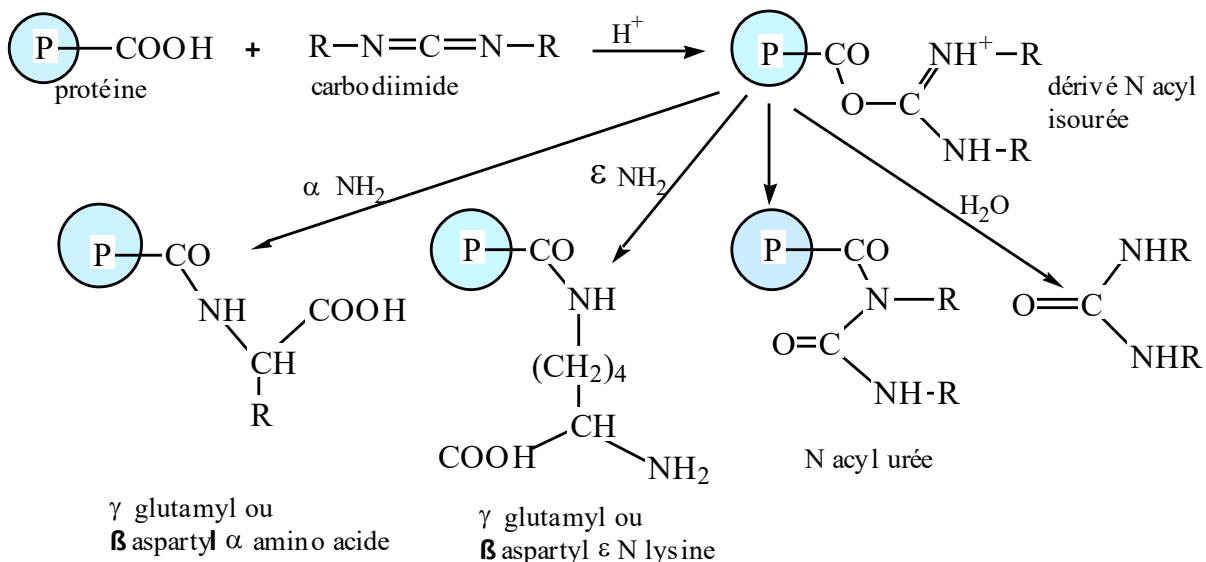
Les dérivés 1 et 2 ne sont pas toxiques. La lysine (ϵ NH₂) est régénérée par digestion in vivo.

La synthèse de ces dérivés est réalisée de la façon suivante:



b) Fixation covalente par agent de pontage.

Cette fixation peut être réalisée soit sur les groupements COOH (Asp, Glu, terminal), soit sur les groupements amines (ϵ NH₂-lys, α NH₂terminal). Il est d'abord nécessaire d'activer les groupes carboxyliques par la méthode au carbodiimide.



La limite principale de cette technique réside dans la toxicité des réactifs utilisés.

Il est également possible de fixer sur les résidus de lysine (par alkylation réductrice) des bases de Schiff obtenues par réaction de Maillard. Ce sont les bases de Schiff qui se produisent au cours des premières étapes de la réaction de Maillard qui sont réduites par des borohydrures. Les dérivés réduits sont stables.

XIX. TEXTURATION DES PROTEINES

La consommation de la plupart des protéines extraites d'une matière première donnée passe le plus souvent par leur texturation (les produits liquides font exception). Lorsque les protéines ajoutées se substituent partiellement ou totalement à des protéines ou à des lipides comme substituts de matières grasses d'aliments traditionnels, elles doivent être modifiées ou structurées afin de conférer au produit ainsi obtenu une texture attrayante.

XIX.1. BASES BIOCHIMIQUES DE LA TEXTURATION

L'objectif est d'établir des liens intermoléculaires. Tous les processus de texturation comprennent plusieurs étapes successives correspondant à des états conformationnels différents :

XIX.1.1. Dénaturation.

La structure native spatiale de la protéine est modifiée: rupture de liaisons de moyenne ou faible énergie intracaténaïres (liaison hydrogène, hydrophobes et ponts disulfure). Il y a démasquage de sites réactifs conduisant à une forte réactivité intermoléculaire (Fig 9.1). Cette rupture et ce démasquage peuvent être provoqués par des traitements **thermiques** (froid ou chaleur) ou **mécaniques**, par des hautes pressions, des traitements **oxydants** ou **réducteurs** (oxydation des ponts disulfure) ou des traitements par des agents **hydrophobes** (solvants organiques, détergents, gaz sous pression).

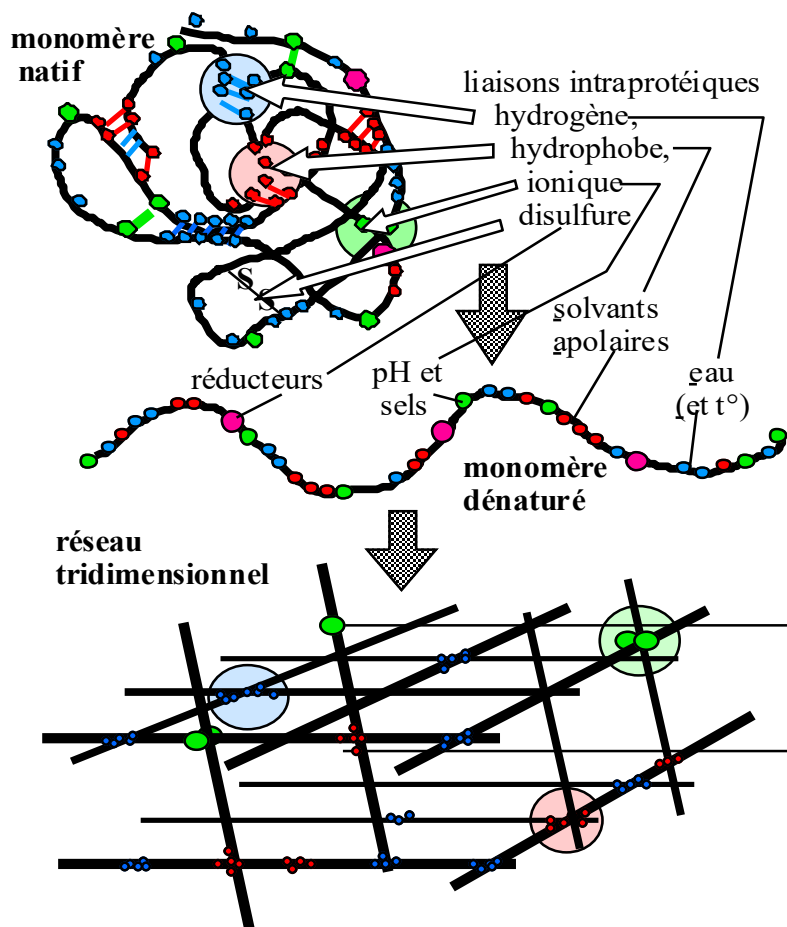


Figure 123. Schéma des phénomènes biochimiques impliqués dans la texturation d'une protéine.

Le changement de conformation peut aussi être causé par une protéolyse limitée surtout lorsque celle-ci est très spécifique (cas de l'hydrolyse de la caséine κ par la chymosine avec changement

corrélatif de l'hydrophobicité de surface de la micelle de caséine) ou s'applique à de très grosses molécules à l'état polymérique : cas des protéines de légumineuses (soja) ou myofibrillaires de poisson.

Bien que cette étape n'entraîne pas de dégradation de chaîne latérale, certains réactifs chimiques en bloquant des groupes latéraux ionisés (groupes ϵ aminés de la lysine) contribuent à la destruction des ponts calciques intervenant dans la structure micellaire native des caséines.

Enfin des modifications de pH ou de la force ionique sont capables aussi de dissocier des liaisons ioniques. Cette première étape exige en général une solubilisation préalable aussi complète que possible, en milieu alcalin (pH 8) ou salin par exemple.

XIX.1.2. Organisation et orientation

Il faut organiser et orienter les macromolécules partiellement ou totalement dépliées : gélification, fibrillation, avec le cas échéant, réorganisation d'agréats moléculaires (peptisation des fromages fondus, par exemple). Généralement, l'orientation des molécules est obtenue soit par extrusion à travers une filière (fabrication de fibres), soit par différents artifices tels que laminage/étalement, précipitation de surface...très utilisés dans des techniques de texturation traditionnelles (fabrication de films, par exemple).

XIX.1.3. Fixation et rigidification

Elle s'applique sur la structure organisée obtenue grâce à une redistribution des liaisons intra- et intermoléculaires rompues au cours de l'étape de dépliement. Différents types de liaisons provoquent la réticulation des chaînes peptidiques et la formation d'un réseau plus ou moins ordonné : très ordonné dans le cas du filage, peu ordonné dans les gels thermoplastiques.

Le **phénomène de transition vitreuse** permet la rigidification (cf chapitre XVII.4.2 page 139).

XIX.2. TECHNIQUES DE TEXTURATION THERMO-MÉCANIQUES ET THERMIQUES

XIX.2.1. Le filage (figure 124)

L'utilisation alimentaire du filage date de 1954 lorsque BOYER envisagea de produire des fibres protéiques analogues aux fibres de viande.

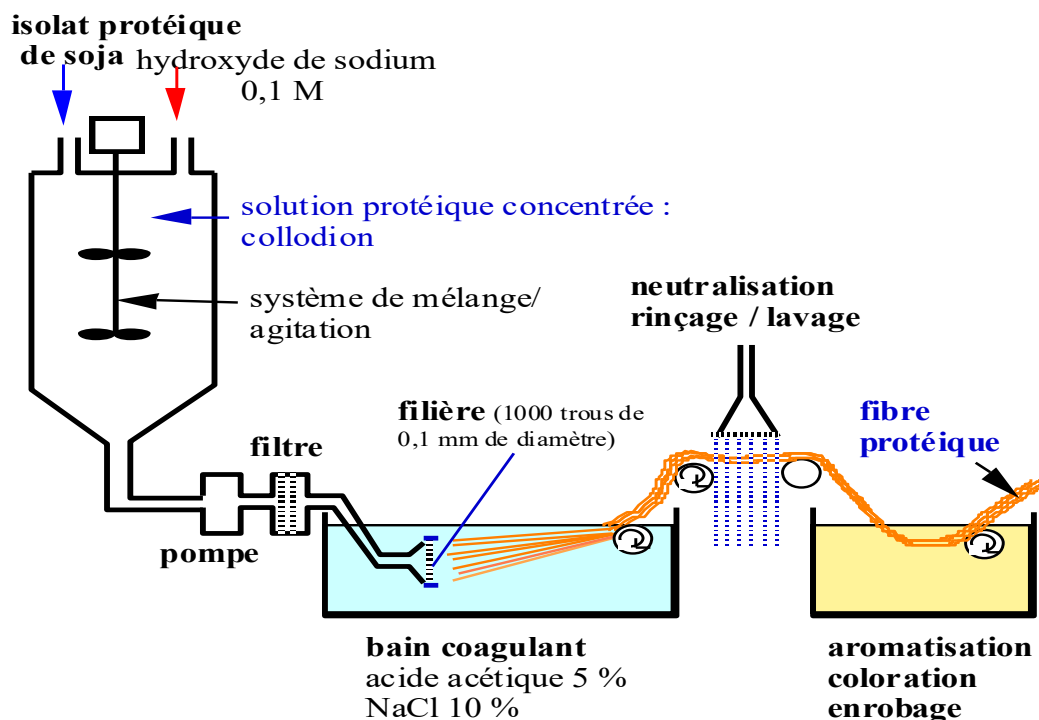


Figure 124. Procédé de texturation des protéines végétales par filage (soja par exemple)

a) Principe de fabrication des fils protéiques

La phase de dénaturation s'accompagne d'une augmentation de la viscosité de la solution protéique appelée dans ce cas **collodion**. Pour l'obtenir, trois conditions sont requises: isolat purifié à haute teneur en protéines (>85 p.cent), concentration protéine élevée du collodion (10 à 30 p.cent), pH élevé (8 à 10). A ce pH les protéines sont chargées négativement et ont tendance à adopter une structure étirée du fait des répulsions électrostatiques intramoléculaires. Elles occupent tout l'espace et leur répulsion rend le système tendu donc très visqueux. L'extrusion du collodion, qui oriente les molécules chargées négativement à un $\text{pH} > \text{pHi}$ dans le sens de l'écoulement, doit s'effectuer à travers une filière dont les trous ont un diamètre compris entre 50 et 250 μm . Celle-ci est immergée dans un bain de coagulation acide et/ou salin : acides lactique, acétique ou phosphorique, à pH compris entre 2 et 4, en présence de 5 à 20 p.cent de chlorure de sodium, conditions qui conduisent à une solubilité minimale. Lors du contact des filaments avec le bain, deux échanges se produisent : l'eau des filaments migre vers le bain et les ions du bain migrent dans les filaments.

Les charges négatives (COO^-) sont ainsi neutralisées (COOH) ce qui se traduit par une des répulsions électrostatiques. Il en résulte l'établissement de liens interprotéiques et donc une formation d'un réseau en filaments.

Les filaments sont ensuite étirés entre deux cylindres et sont transférés dans des bains de lavage à pH neutre légèrement acide (pH 5,5 à 6) puis associés en faisceaux parallèles grâce à des liants **protéiques** (ovalbumine, gélatine, caséine, gluten ou isolat de soja) ou **polyosidiques** (amidon, carraghénates, alginates...).

Cette opération s'effectue par trempage puis chauffage en faisant circuler les fibres à contre-courant.

Pour être **filables**, les protéines doivent réunir plusieurs caractéristiques structurales: elles doivent être déplissables et d'une longueur minimale de 100 nm, sans ramification ou groupes fonctionnels stériquement encombrants. Elles doivent contenir un grand nombre de groupes fonctionnels (polaires) permettant l'établissement de liaisons intermoléculaires (Ser, Thr, Asp, Glu, Lys). Par ailleurs, leurs masses moléculaires doivent être comprises entre 10 000 et 50 000 Da. Si la MM est élevée, la viscosité est élevée et le filage difficile; si elle est trop faible, les filaments ont peu de "tenue".

Les protéines filables sont en premier lieu l'ovalbumine, la zéine et le collagène qui forment des fibres très résistantes à la traction. D'autres protéines telles que la caséine ou des isolats de légumineuses sont filables mais surtout filmogènes, c'est-à-dire aptes à former des films dont l'épaisseur est généralement comprise entre quelques μm et 0,5 mm.

Cette aptitude au filage peut être améliorée à l'aide de traitements chimiques par le formol ou l'anhydride acétique. Des adjuvants de filage sont également employés : l'ajout limité de gluten (quelques p.cent) améliore la résistance mécanique, les lipides rendent les fibres protéiques succulentes et tendres alors que l'amidon accroît leur hydratation et leur rétention d'eau. Enfin, si la concentration saline du collodion est élevée, la résistance mécanique des fibres est importante mais leur diamètre et la capacité de rétention d'eau sont faibles.

b) Techniques de filage

En général, on ajoute au collodion plusieurs adjuvants : ovalbumine, gluten, farine de soja, hydrolysats protéiques, sel, glutamate, colorant, arômes... Souvent, ce sont des mélanges protéine/polyoside qui sont soumis au filage (protéine/pectine à pH neutre avec chlorure de calcium, protéine/carraghénates...). Différents types d'agents coagulants peuvent être ajoutés. Dans le filage hydrodynamique, le bain coagulant est animé d'un mouvement plus rapide que celui de sortie des fibres de la filière; celles-ci sont alors étirées. La coagulation des fibres peut aussi être obtenue par de l'acide chlorhydrique gazeux ou par séchage à haute température (90°C à 140°C).

XIX.2.2. Cuisson-Extrusion

a) Principe du procédé

Il s'agit d'un procédé continu dérivé du filage; en milieu fortement hydraté, c'est un procédé très anciennement connu pour la confection des pâtes alimentaires. La matière à texturer, qui doit être assez visqueuse, est entraînée et malaxée par une vis sans fin. La compression est assurée par resserrement du pas de vis, une diminution de l'espace entre la vis et la paroi du cylindre et la contre-pression due à la filière étroite en sortie. Le produit comprimé subit un cisaillement et un échauffement dus au laminage entre la vis et la paroi striée du cylindre (Meuser et Wiedmann, 1989).

Deux types d'appareils sont utilisés soit des extrudeurs mono-vis (figure 125) soit des extrudeurs bi-vis

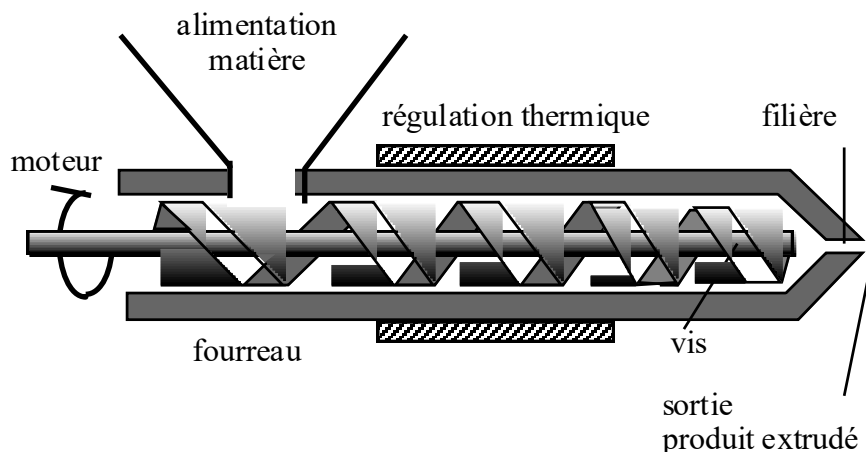


Figure 125. Schéma d'un extrudeur monovis

L'extrudeur de type bi-vis, plus récent, comporte deux vis identiques copénétrantes et corotatives; la matière comprimée le long de la paroi du fourreau et entre les vis avance selon une trajectoire en forme de 8. On peut changer, grâce à un assemblage de fourreaux, le profil de vis. La présence d'un contrefilet permet d'augmenter le temps de séjour et d'appliquer au produit des contraintes de cisaillement plus grandes. D'autres variantes sont proposées: filières diverses, contrôle de la température par zones, intégration à l'endroit voulu de différentes fonctions (dégazage, introduction d'un liquide ou d'un solide,..) Le système bivirus présente les avantages suivants : adaptable à de nombreux produits, profil de vis autonettoyant, fonctionnement et qualité du produit fini plus réguliers.

En milieu peu hydraté, l'ajout de traitement thermique provoque la formation de structures alvéolées après expansion en sortie de filière.

b) Procédé en milieu peu hydraté

Il s'inspire du thermoformage des matières plastiques; les premières utilisations de la cuisson-extrusion en industries alimentaires furent la production de structures expansées à partir d'amidon ou de farine de blé. Par exemple, la farine contenant entre 10 et 20 p.cent de protéines, est chauffée à 65°-100°C par injection de vapeur et ainsi amenée à un taux d'humidité de 20 p.cent. Le mélange est ensuite malaxé dans l'extrudeur à 85°-110°C sous une pression de 50 à 100 bars, puis la température est portée à 130°-180°C durant les 10 à 20 dernières secondes de séjour dans l'appareil. Le produit sortant à travers une filière est expansé et séché sous l'effet de la dépression de sortie et de la vaporisation de l'eau surchauffée.

Pour ce type de cuisson-extrusion, il est nécessaire d'avoir un produit délipidé dont la teneur en azote représente 40 à 70 p.cent de l'extrait sec ; la solubilité doit être suffisamment élevée (50 p.cent), ce qui exclut les matières premières ayant subi des traitements thermiques intenses (cas des tourteaux). La teneur en eau doit être comprise entre 5 et 30 p.cent et le pH entre 6 et 8,5.

Le temps de séjour moyen varie de 30 à 120 sec. Les différentes phases de l'élaboration du produit extrudé sont résumées dans la figure 126.

Les caractéristiques des produits sont les suivants :

- produits expansés peu denses alvéolés mais avec une faible solubilité : ce sont des mousses solides très hydratables ;
- formation probable mais très limitée de liaisons amides inter-moléculaires, très peu de ponts covalents formés ;
- produits dont la densité peut être modifiée en agissant sur la taille des filières et les températures (densité élevée si la température est basse et la filière plus grosse).

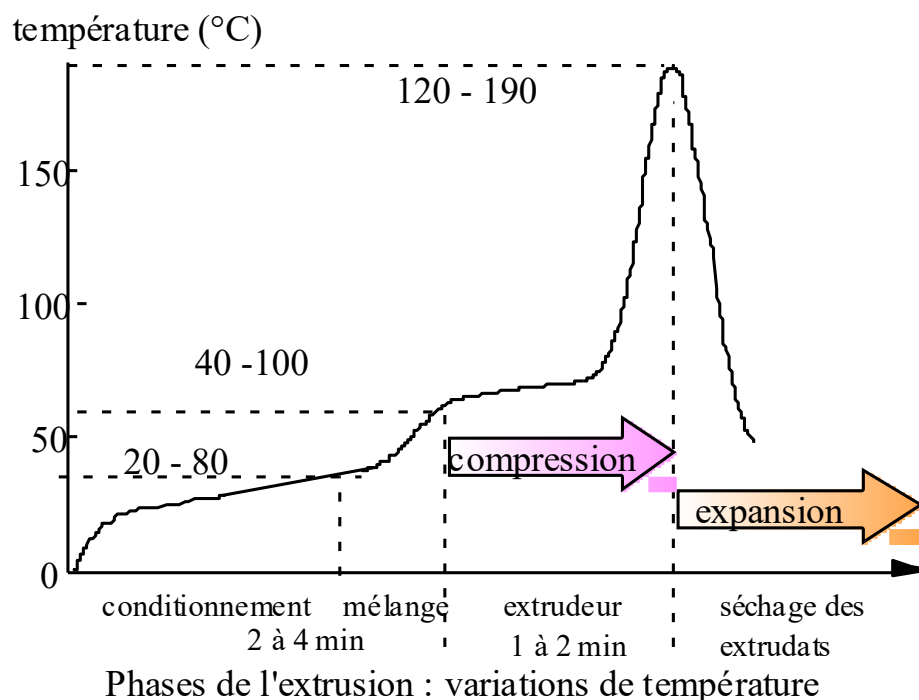


Figure 126. Séquence des opérations de cuisson extrusion

Ces structures donnent après réhydratation des produits spongieux, élastiques, stables à la stérilisation, utilisables dans les boulettes de viande, les quenelles, certaines charcuteries ou pâtisseries. La cuisson-extrusion thermoplastique s'applique bien aux produits céréaliers (pain plat, amidon texturé...).

c) Procédé en milieu hydraté

Pour des teneurs en eau élevée (45 à 70 p.cent), la thermocoagulation provoque la formation de films ou des gels hydratés non expansés. De nombreuses applications sont apparues récemment pour valoriser les protéines du lactosérum, du sang, de viande et poisson séparées mécaniquement...

Pour obtenir des textures homogènes, par émulsification et gélification de protéines laitières en continu, l'extrudeur est équipé d'une filière longue refroidie dans sa phase terminale; on peut ainsi préparer à partir de caséinate de calcium et d'huile de beurre des analogues de fromage; plusieurs

additifs (sels complexants du calcium tels que citrate et phosphate de sodium, liants...) sont toutefois nécessaires pour obtenir une texture homogène et stable.

C'est sur ce même principe de cuisson-extrusion en milieu hydraté que sont basées les techniques de fabrication d'analogues de viandes (restructuration de viandes de volaille séparées mécaniquement basée sur deux thermocoagulations à températures différentes) d'analogues de chair de crabe (thermocoagulation de chair de poisson laminée suivie d'un découpage de lanières enroulées et réassociées). Ici encore, le but est de valoriser des poissons peu consommés directement (tacaud, chinchard, sardine...).

La cuisson-extrusion de mélanges protéiques est en plein développement de façon à obtenir une grande diversité de textures : caséinates/protéines de lactosérum, blanc d'oeuf/protéines végétales.

L'association de polyosides gélifiants (alginates, amidon) est également très utilisée ; ces glycanes ont un effet texturant et ils facilitent le transfert des protéines dans l'extrudeur, surtout à haute température, avec toutefois le risque (ou l'avantage) de réactions de Maillard.

Notons enfin, que les cuiseurs-extrudeurs peuvent être utilisés comme des réacteurs et servir par exemple à la solubilisation de protéine en protéinate par neutralisation. C'est le cas de la confection de caséinates à partir de caséine acide (pH 4,6) insoluble.

XIX.2.3. Autres traitements thermiques de texturation

a) Thermocoagulation des protéines de soja

C'est le traitement de base de la confection du tofu (cf chapitre X.5.2 page43). La confection d'un lait de soja passe par le trempage de grains de soja durant 10h dans l'eau puis broyage, cuisson et filtration (lait à 5 à 6 p.cent de matière sèche); après ajout d'une suspension de sulfate de calcium il se forme un gel hydraté (caillé) emprisonnant les lipides. Le lavage du caillé suivi de son égouttage permet d'éliminer la plupart des glucides indigestibles. Le produit obtenu contient 88 p.cent d'eau, 6 p.cent de protéines et 3 p.cent de lipides et est utilisé dans de nombreuses préparations culinaires d'origine asiatique. Une variante de ce procédé (fabrication du Yuba chinois) consiste à chauffer le lait de soja; le film protéique se formant en surface est récupéré puis séché à l'air. Contenant 10 p.cent d'eau, 52 p.cent de protéines et 24 p.cent de lipides, ces films peuvent être réhydratés et servent d'enveloppe ou de conditionnement comestible.

b) Thermocoagulation par la vapeur sous pression

Elle est basée sur le traitement d'une farine hydratée à 20 p.cent à la vapeur sous pression ; après dépression à la pression atmosphérique, il se produit un gonflement et une volatilisation des arômes.

c) "Thermogélification" des fromages fondus (figure 127)

Le traitement thermomécanique associé à l'ajout de sel de fonte permet de dissocier le complexe de para-phosphocaseinate de Ca contenu dans la matière première (Cheddar ou Emmental) et d'émulsifier la phase aqueuse contenant le phosphocaseinate dissocié, donc plus tensio-actif, avec la phase lipidique.

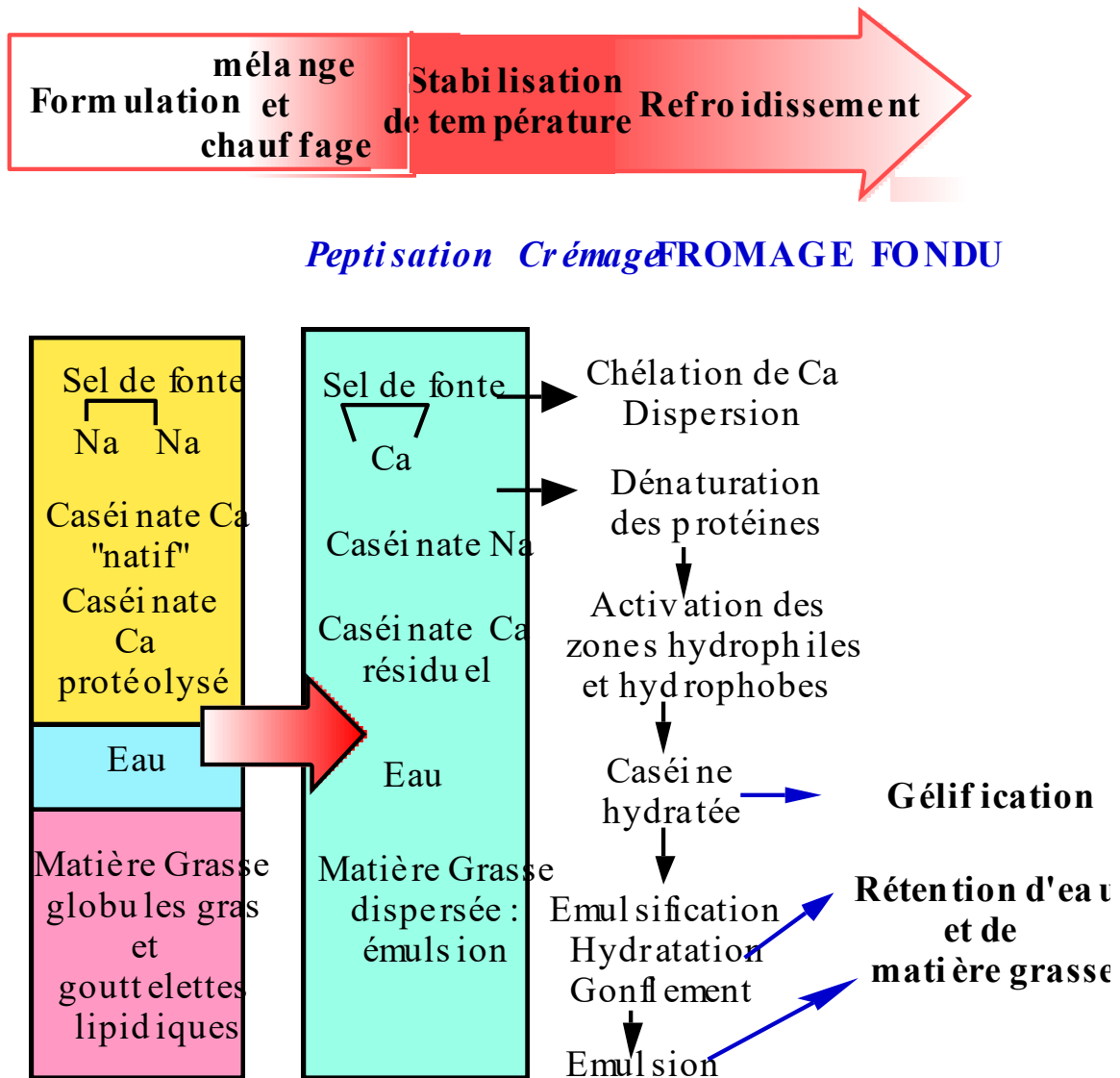


Figure 127. Représentation schématique du processus de fonte du fromage

La texturation n'intervient qu'au cours du refroidissement qui s'opère dans un moule; la texture dépend étroitement d'un traitement thermique supplémentaire (80°C-20 min.) après la phase de dissociation/émulsification (105 à 110°C plusieurs minutes ou dizaines de minutes). Elle dépend aussi de la vitesse de refroidissement et de l'incorporation d'une petite partie de fromage déjà fondu plusieurs fois (réemploi). La représentation schématique résume les principales réactions ayant lieu lors des phases de peptisation, crémage et refroidissement.

XIX.2.4. Cryotexturation

Une de ces techniques s'applique par congélation à -5°C durant plusieurs heures, au caillé de lait de soja lavé et broyé. Après décongélation, l'eau est éliminée par pressage; on obtient une texture spongieuse exempte de glucides indigestibles. Les légendes de la figure 128 résument les modifications observées au cours des différentes étapes.

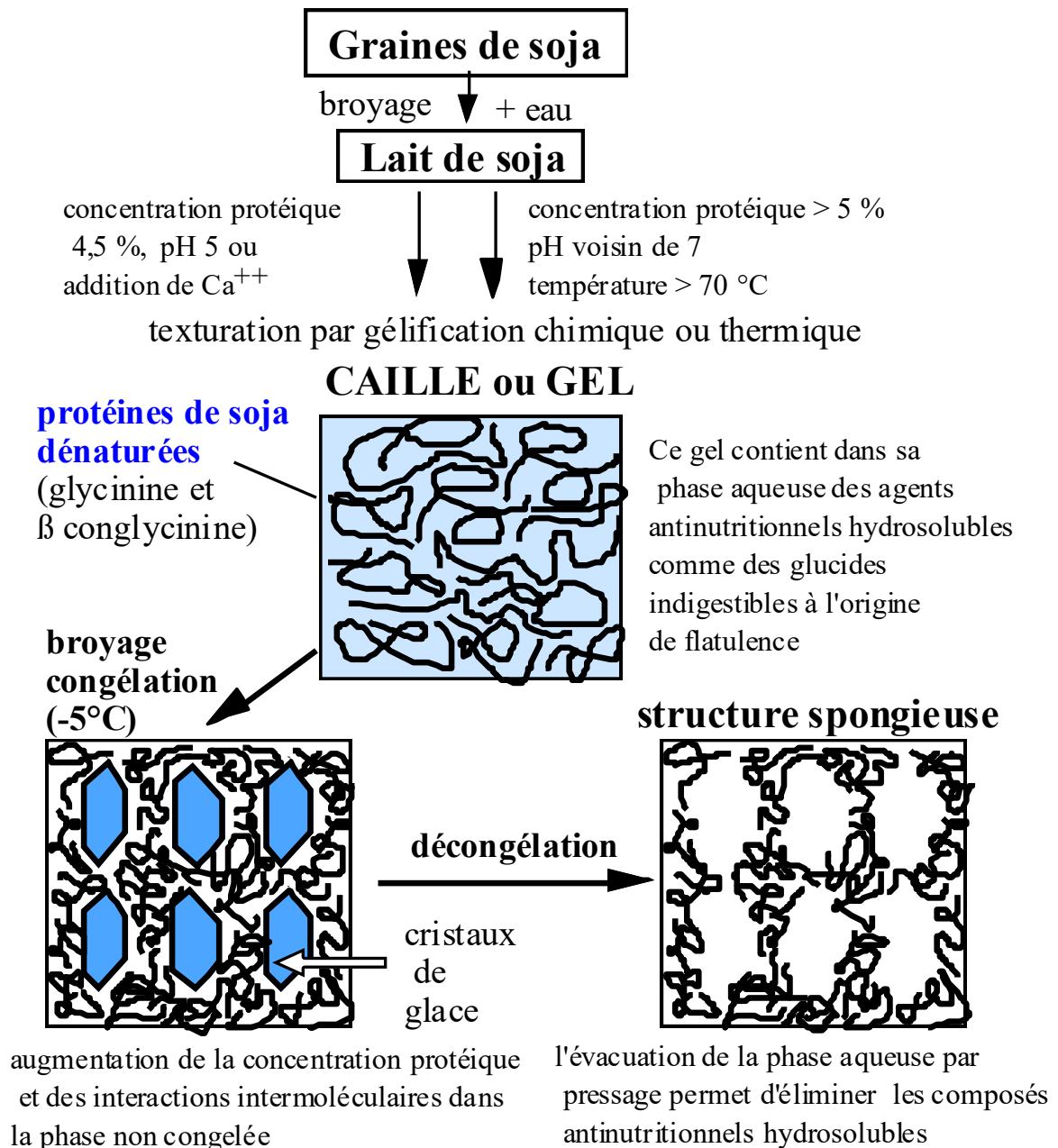


Figure 128. Schéma de la cryotexturation de protéines de soja

Un procédé récent consiste à étaler une pâte protéique à 66 p.cent d'eau sous forme d'une couche mince (4 à 5 mm) sur une plaque refroidie à -20°C. Un système multicouche est obtenu par accumulations successives de couches préalablement plissées. Après pression et congélation, un traitement thermique microonde est appliqué.

XIX.3. TRAITEMENTS DE TEXTURATION PAR LES HAUTES PRESSIONS

Ce procédé a été développé récemment et ses applications sont potentiellement innombrables puisqu'il permet de stériliser ou de pasteuriser des aliments à froid sans perte de valeur nutritionnelle et sans altération des qualités organoleptiques.

Des pressions voisines d'une centaine de bars appliquées à une poudre conduisent à une déformation des particules avec augmentation de leur surface de contact. Cette opération appelée compactage est schématisée dans la figure 129.

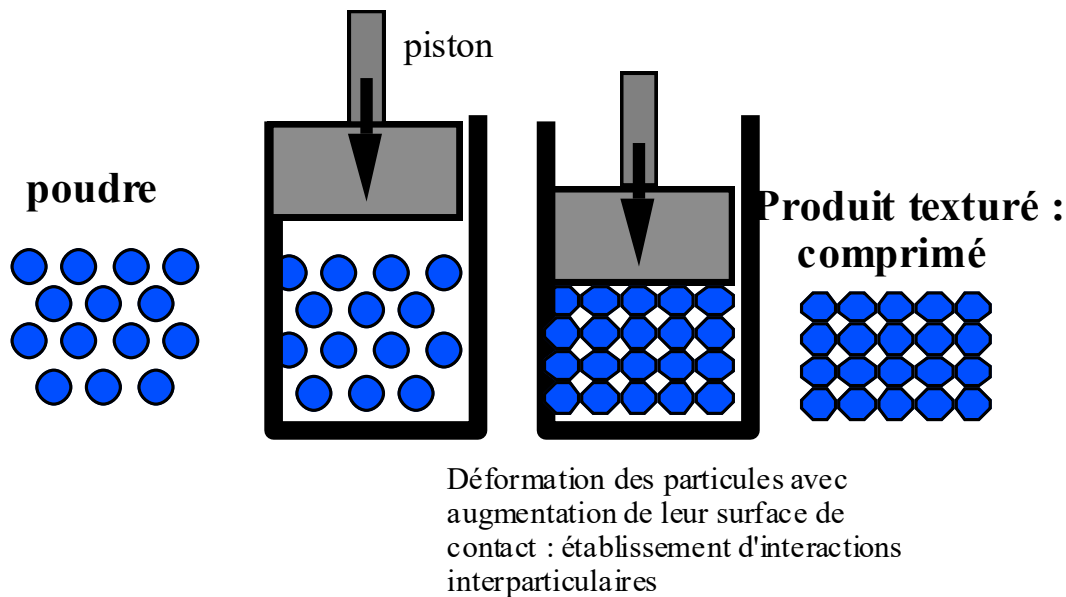


Figure 129. Procédé de compactage : texturation sans changement apparent de structure interne des "unités" de base

L'application de **très hautes pressions** (jusqu'à 5 MPa) aux cellules microbiennes modifie les équilibres osmotiques surtout si le choc s'effectue par des montées en pression rapides. L'activité des enzymes peut elle-même être modifiée en raison de l'altération de la conformation des protéines. C'est pour cette même raison que les propriétés technofonctionnelles des polymères sont modifiées; c'est particulièrement vrai pour les pectines de jus de fruits ou de confitures qui s'associent en fibres.

L'effet dénaturant des hautes pressions se manifeste par une inactivation des enzymes et surtout par une baisse de solubilité et/ou une gélification.

Les mécanismes impliqués concernent plus des échanges de ponts disulfure dans la thermogélification que dans la gélification sous haute pression. En effet, les gels obtenus par thermogélification sont plus fermes, plus cassants et moins visqueux. Les effets diffèrent selon la nature des protéines et la pression appliquée; ainsi, pour un traitement de 30 min, la gélification nécessite une pression minimale de 2 à 3 MPa pour les protéines myofibrillaires de poisson, 4 à 7 MPa pour les protéines du blanc et du jaune d'oeuf. L'ajout de sorbitol ou de glucides réduit l'effet coagulant alors que le chlorure de sodium semble avoir un effet opposé.

Plusieurs types de texturation peuvent être envisagés : restructuration des chairs de poisson ou de viande séparées mécaniquement, confection de fibres à partir d'isolat protéique de soja. L'intérêt de cette technique réside dans la possibilité de procéder à froid (0°C) sous emballage souple en provoquant une réduction de la charge microbienne sans perte d'arômes et altération de la couleur (figure 130).

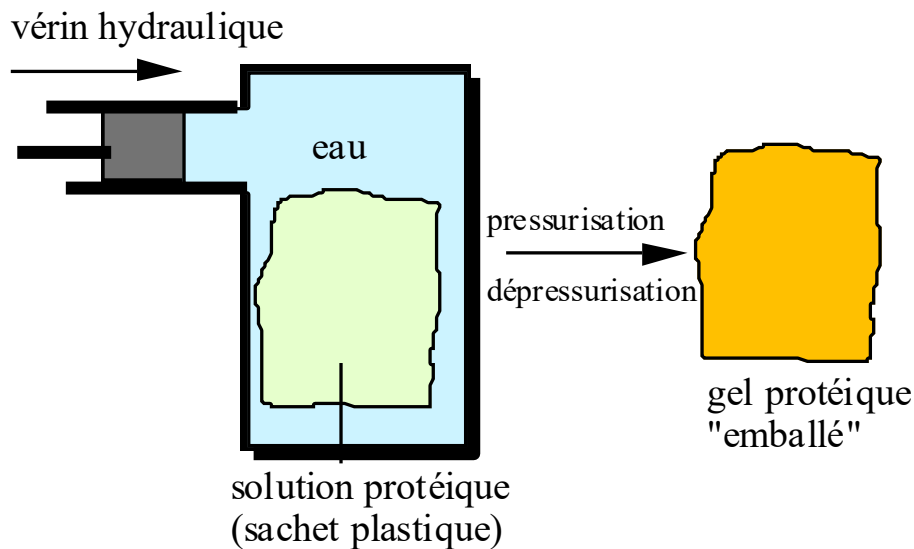


Figure 130. Schéma d'un système de traitement sous très haute pression (2 à 6 MPa)

D'autres applications sont proposées: accélération de la coagulation par la présure du lait reconstitué à partir de poudre, accroissement de la sensibilité des protéines globulaires à la protéolyse en raison d'un déplissement partiel des molécules contenant peu de ponts disulfure (cas de la β -lactoglobuline).

XIX.4. TRAITEMENTS DE TEXTURATION PAR VOIE CHIMIQUE

XIX.4.1. Texturation des protéines par oxydation

L'une des technologies de texturation basée sur l'oxydation, et la plus anciennement connue, est la confection de la pâte à pain.

Le **gluten**, fraction protéique insoluble de la farine de céréales panifiables, peut former après hydratation et pétrissage mécanique un pâton aux propriétés viscoélastiques .

Cette texturation est surtout due à l'oxydation de nombreux groupes thiols en ponts disulfure intermoléculaires, il en résulte un réseau finement réticulé de gluténines qui emprisonnent des gliadines fortement hydratées; ainsi, on a longtemps considéré que les gluténines réticulées jouaient surtout un rôle d'élasticité alors que les gliadines hydratées sont épaississantes. Cependant, les récentes connaissances structurales des gliadines montrent que leur conformation en hélices lâches, due à la répétition régulière de séquences incluant des résidus de proline, de glycine et de valine, serait aussi responsable des propriétés d'élasticité.

Ces réactions d'oxydation peuvent être accélérées, non seulement par l'incorporation d'oxygène de l'air au cours du pétrissage, mais aussi par la présence de groupes superoxyde en relation avec l'oxydation d'acides gras polyinsaturés.

L'ajout de farine de fève riche en lipoxygénase accélère également l'oxydation des ponts disulfure; la farine de soja beaucoup plus riche en lipoxygénase est préférée car sa présence n'altère pas le goût.

De même, l'action bénéfique de l'acide ascorbique serait due à la réduction du groupe thiol du glutathion qui lui-même freine la formation souhaitable de ponts disulfure.

Dans la formation de pâte à pain d'autres liaisons sont également impliquées: au cours de l'hydratation, des liaisons hydrogène s'établissent entre les groupes amide de la glutamine et l'asparagine et des liaisons hydrophobes proviennent de l'association des chaînes latérales apolaires très nombreuses des résidus Phe, Tyr, Ile, Leu et Val.

XIX.4.2. Texturation des protéines par réticulation chimique ou enzymatique

(cf chapitre XIX - réticulation)

La réticulation peut s'obtenir par la formation de liaisons électrostatiques. Ainsi, dans des conditions de pH permettant l'ionisation des groupements carboxyliques des chaînes latérales des résidus d'acides glutamique et aspartique, l'addition d'ions bivalents à une solution protéique se traduit par la formation de ponts ioniques avec comme conséquence soit la formation d'agrégats, soit une gélification. Par ailleurs, la succinylation contribue à accroître le nombre de charges négatives (un groupe carboxylique est placé à l'extrémité d'une chaîne ϵ aminée de la lysine) ; il en résulte un accroissement de liaisons ioniques et d'interactions hydrophobes qui, si elles s'installent entre macromolécules, contribueront à la texturation.

La formation de ponts covalents (par le glutaraldéhyde ou le formol par exemple ou encore par phosphorylation chimique) reste limitée à la fabrication de gels ou de films à usage non alimentaire.

Des enzymes tels que la transglutaminase peuvent aussi réticuler les protéines en créant des liaisons isopeptidiques entre les chaînes latérales de la glutamine et la lysine.

XIX.4.3. Texturation des protéines par modification du pH

Dans le paragraphe précédent, nous avons mentionné le cas de la formation d'un gel après une action enzymatique. Le même modèle, à savoir les micelles de caséine, peut conduire à un coagulum totalement différent s'il est obtenu par acidification.

Trois points essentiels concernent la gélification acide :

- la vitesse d'acidification
- la présence d'électrolytes (ions)
- et le traitement thermique préalable.

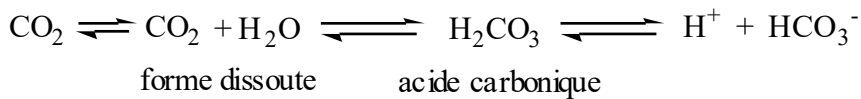
Dans le cas du lait l'"acidification brutale", par addition d'un acide minéral ou organique, entraîne à température ambiante une floculation des caséines à pH 4,6 sous la forme d'un précipité plus ou moins granuleux qui se sépare du lactosérum. En revanche, une acidification progressive, obtenue soit par fermentation lactique, soit par hydrolyse de la δ -gluconolactone en acide gluconique, conduit à la formation d'un coagulum lisse, homogène, qui occupe le volume initial du lait.

L'abaissement du pH a pour effet de faire régresser l'ionisation des fonctions acides (acide aminé C terminal, Glu et Asp) des caséines. Cette régression d'ionisation provoque une réduction du potentiel de surface et a pour conséquence de diminuer le pouvoir séquestrant des caséines α_s et β et d'augmenter la solubilité des sels calciques dans l'eau (Darling et Dickson, 1979). Il en résulte un déplacement progressif du calcium et du phosphate inorganique de la micelle vers la phase aqueuse, donc une déminéralisation de la micelle qui devient totale à pH inférieur à 5,0.

Au cours de l'acidification, il se produit une profonde désorganisation de la micelle accompagnée d'une modification de la structure quaternaire des caséines. A l'approche du pHi, il y a neutralisation de la charge et réduction importante de l'hydratation des protéines, ce qui entraîne leur insolubilisation. Le coagulum ainsi obtenu est le résultat de la formation d'un réseau protéique insoluble. Les liaisons intermoléculaires intervenant dans la formation du réseau sont de nature électrostatique et hydrophobe. Ceci explique la grande fragilité du coagulum lactique.

XIX.4.4. Texturation par les gaz sous pression

Quand une solution protéique est soumise à un traitement par de l'anhydride carbonique sous des pressions de plusieurs bars, il se produit des modifications du milieu qui aboutissent à des dénaturations souvent associées à des précipitations ou des gélifications selon les conditions. Le gaz se dissout d'abord dans la phase aqueuse au niveau de laquelle il diminue la constante diélectrique.



Il forme ensuite de l'acide carbonique par combinaison avec l'eau, cet acide se dissociant alors en ion hydrogénocarbonate avec libération d'un proton. Le pH du milieu est d'autant plus abaissé que la pression en gaz est élevée. Il est ainsi possible dans ces conditions de dénaturer des protéines; un gel peut être obtenu en fonction de la nature de la protéine, de sa concentration et de la température. Par dépressurisation douce, afin d'éviter que le phénomène n'engendre la formation de mousse, les équilibres chimiques permettent au gaz de s'éliminer; le pH remonte alors à une valeur qui est voisine de sa valeur initiale. Si un gel a été préalablement formé, son pH final pourra être élevé alors qu'il a été obtenu par voie acide.

Il est envisageable de procéder en continu et sans pompe à la texturation de solutions protéiques, l'anhydride carbonique sous pression jouant alors un rôle "moteur" en phase gazeuse et un rôle réactif en phase liquide (figure 131).

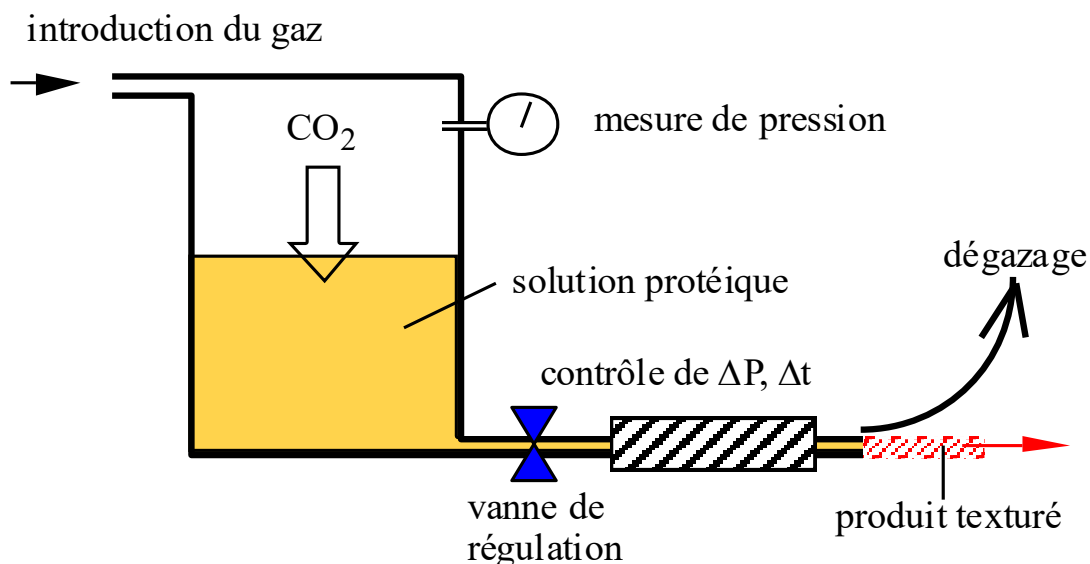


Figure 131. Schéma de la texturation de protéines par l'anhydride carbonique sous pression

Une bonne maîtrise de la perte de charge permet un dégazage non destructurant. Le pH final du produit texturé est alors sensiblement égal à celui de la solution avant carbonatation et la texture obtenue dépend de nombreux facteurs parmi lesquels la nature de la protéine, sa concentration, la force ionique et la nature des ions de la solution, la température et le temps de séjour jouent un rôle essentiel.

XIX. LES M.P.V. ET NOS ALIMENTS

Au cours de ces dernières années, les Matières Protéiques Végétales (**M.P.V.**) sont devenues des ingrédients à part entière des IAA et des industries de la diététique. Ceci résulte du fait que la qualité des protéines végétales s'est considérablement accrue tant au niveau des oléagineux (soja, tournesol, colza) qu'au niveau des protéagineux (pois, fèves, lupin) et des céréales (blé, maïs). Les progrès de la génétique, l'apparition d'OGM, permettent de disposer aujourd'hui de graines à la composition stable et maîtrisée. Par ailleurs, les procédés technologiques liés à la transformation de ces graines

sont fiables depuis leur mise au point dans les laboratoires puis après les essais-pilotes avant de passer au stade industriel. La qualité nutritionnelle et la sécurité alimentaire des MPV sont actuellement des impératifs pour tout industriel de ce secteur d'activité. Il faut encore signaler que nos connaissances sur les caractéristiques et les propriétés de ces produits végétaux ont considérablement progressé au cours des deux dernières décennies. Les applications se sont multipliées et sont beaucoup mieux argumentées et justifiées.

Les propriétés nutritionnelles et les propriétés fonctionnelles des protéines végétales sont aujourd'hui mieux connues et très appréciées. Enfin, et c'est un argument très important, les MPV sont très disponibles et ont un rapport qualité / prix excellent.

Il faut signaler enfin que la généralisation de l'automatisation et de l'informatique ainsi que le développement des capteurs en lignes permettent la maîtrise sans faille des productions.

Le Groupe d'Etudes et de Promotion des Protéines Végétales (**GEPV**) observe une augmentation régulière et très forte du nombre de produits dont la formulation fait appel aux MPV.

XIX.1. LES MATIERES VEGETALES PROTEIQUES

XIX.1.1. Les normes

Le Codex Alimentarius FAO / OMS (1989) définit les MVP ainsi : *produits alimentaires obtenus à partir d'oléagineux, de légumineuses ou de céréales par une réduction ou une élimination de certains des principaux constituants non protéiques de manière à obtenir une teneur en protéines (N x 6,25) de 40% ou plus; cette valeur étant calculée sur sec.*

La plupart des Etats (CEE en particulier) définissent les MPV pour l'alimentation humaine comme des ingrédients ou des adjuvants alimentaires dont la teneur en protéines (N x 6,25) est d'au moins 50% par rapport à la matière sèche.

Les farines (protéines $\geq$ 50% MS), les concentrés (protéines $\geq$ 65% MS) et les isolés (protéines $\geq$ 90% MS) correspondent aux 3 classes de MPV. Ils se présentent sous forme de poudres (farines) ou sous forme texturée (flocons, granulés, particules).

Il existe trois produits qui sont assimilés aux MPV qui sont les farines de soja non délipidées (full fat), les farines non délipidées lécithinées et le gluten de blé dont la teneur en protéines est d'environ 85%.

Les **normes** FAO / OMS 1989 concernent le **gluten de blé** (STAN 163/1987), les **M.P.V.** (STAN174/1989) et les **matières protéiques de soja** (STAN 175/1989).

Ces produits ne doivent pas contenir de **microorganismes** en quantité représentant un danger pour la santé. Les principales analyses de routine sont celles de la FAMT, des coliformes, d'*Escherichia coli*, des ASR, des staphylocoques pathogènes, des *Salmonella*, des levures et moisissures, analyses selon l'arrêté du 21 décembre 1979 - JO 19/02/80. Exprimés en microorganismes / g elles sont les suivantes:

MPV	FAMT	coliformes		E.coli	S.aureus	ASR	Salmonella	levures	moisissures
		30°C	44°C						
farines soja	<1000	<3	<3	absence	<100	10	absence	<10	80
concentrés	<8000	<3	<3	absence	<100	<10	absence	<10	<20
isolés	<5000	<3	<3	absence	<100	<10	absence	<10	<10
farines grasses									
crues	600 000	40	40	10	<100	<10	absence	<10	1200
cuites	6 000	40	15	<3	<100	<10	absence	<10	3 000
concentrés féverole	<10	<3	<3	<3	<100	<10	absence	<10	<10

Les détermination des teneurs en **Protéines** (AOAC 2 057 puis AFNOR NFV 18-100), **Eau** (AOAC 14 002 et 14 003 puis AFNOR V03-903), **Cendres** (ISO 21 71 méthode B), **Lipides** (AFNOR V03-905) et **Cellulose** (Weende AFNOR V03-040) sont codifiées.

Il est procédé à la recherche et au dosage des contaminants. Quelques méthodes et données sont indiquées ci-après : l'**hexane** (NFISO 8892) < 1 ppm, les **nitrate**s (AFNOR NFV04-410) <50 ppm, les **nitrite**s (AFNOR NFV04-409) < 50 ppm, le **fer** (absorption atomique) 10-250 ppm, les **facteurs anti-tryptiques** (AOCS Ba 12 75 puis BIPEA) <8 TUI/ mg, les **aflatoxines B1, B2, G1, G2** (AFNOR NFV18-200) <5 ppb. Des éléments comme le **plomb** (<100 ppb), le **cadmium** (<100 ppb), l'**arsenic** (<50 ppb), l'**antimoine** (<10 ppb), l'**aluminium** (<100 ppm), le mercure (<500 ppb) sont dosés par absorption atomique.

XIX.1.2. Valeur nutritionnelle

Elle repose sur la détermination d'indices (CEP, UPN, VB, CUD, Indice Chimique, Antinutritionnels et Toxiques, Allergènes etc).

L'indice **Di-Sco** est un index simple et fiable recommandé par la FAO / OMS.

$$\text{Indice DI-SCO} = \text{Digestibilité réelle} \times \text{indice chimique}$$

Cet indice est de 99 pour le concentré de soja, de 93 pour le concentré de colza, de 73 pour le concentré de pois, de 68 pour le pois entier, de 52 pour la lentille, de 47 pour la fève et de 71 pour le pois-chiche.

Les effets hypocholestérolémiants sont reconnus à la plupart des MPV.

XIX.2. NUTRI-FONCTIONNALITE DES MPV

Les principales applications des MPV sont indiquées dans le tableau 51.

Tableau 51. Intérêts fonctionnels et nutritionnels des applications des MPV

Type de MPV	Intérêt fonctionnel	Intérêt nutritionnel	Applications
Farine	maîtrise des transferts d'eau apport enzymatique	enrichissement protéique	panification, pâtisserie, viennoiserie panification
Farine texturée	fixation d'eau (2,5 / 1)	allègement en M.Grasse apport protéique végétal	vianes hachées farces, plats cuisinés
Concentré	maîtrise des transferts d'eau fixation d'eau et des jus de cuisson	enrichissement protéique	panification, pâtisserie, viennoiserie vianes, charcuterie, salaisons produits diététiques et de la forme
Concentré texturé	fixation d'eau (3,5 / 1)	allègement en M.Grasse apport protéique	préparations à base de vianes farces, plats cuisinés
Concentré fonctionnel	liaison, émulsion, texture	allègement en M.Grasse	préparations à base de vianes poissons, légumes, charcuteries, sauces, salaisons
	dispersibilité	apport protéique	produits diététiques et de la forme
Isolé (isolat)	liaison, émulsion, texture	allègement en M.Grasse	préparations à base de vianes poissons, légumes, charcuteries, sauces, salaisons
	dispersibilité dispersibilité	apport protéique apport protéique digestibilité apport protéique	panification, pâtisserie, viennoiserie alimentation infantile produits diététiques et de la forme

Les MPV seront surtout utilisées comme des PAI (Produits alimentaires Intermédiaires). Elles ne nécessitent pas d'investissements importants et permettent de répondre aux modes de marché par l'élaboration de nouveaux concepts de produits (alimentation allégée, équilibrée, enrichie, santé, etc).

XIX.3. UTILISATIONS DES MPV DANS LES IAA

Les préparations protéiques purifiées (isolats et concentrats) sont de plus en plus utilisés pour leurs propriétés fonctionnelles. Elles confèrent aux produits dans lesquels elles sont incorporées certaines de leurs propriétés. Les produits de charcuterie ou de boucherie se prêtent bien à cet incorporation (pâtés, saucisses de Strasbourg, raviolis, jambons, saucisses, hachis). De nombreux autres aliments (confiserie, pâtisserie, produit de la panification, soupes, sauces etc) sont susceptibles de voir leur qualité améliorée par addition de protéines (rétention d'eau, émulsification, etc).

XIX.3.1. Industrie de la viande et dérivés.

a) Produits à base de viande.

Il existe un code des usages du Syndicat de l'Industrie de la Viande (SNIV) et du Centre Technique de la Viande et des Produits Carnés (CETEVIC). La limite d'incorporation des MPV est égale à 30 % de la teneur totale en protéines lorsque la dénomination du produit inclut « à base de viande » ou « produits carnés ».

Ce sont les préparations à base de viande hachée, fraîches ou surgelées, qui correspondent aujourd'hui aux potentialités les plus importantes d'utilisation des MPV. Ce sont surtout les protéines végétales texturées qui connaissent le plus grand essor. Après réhydratation, la texture est voisine de celle de la viande très tendre ou hachée. Elles augmentent la valeur « protéique » en abaissant le taux de lipides et contribuent au moelleux et à la jutosité.

Les MPV en poudre sont employées comme agents de liaison, de gélification ou pour leur aptitude à la coagulation à la cuisson. Elles sont utilisées dans la mée à laquelle on rajoute 5 à 6 parts d'eau ou sous forme de gel protéique fabriqué au préalable.

La comparaison viande hachée / hamburger enrichi aux MPV est indiquée dans le tableau 52 pour un taux d'addition de 20 % de MPV hydratées par rapport à la matière sèche.

Tableau 52. Comparaison viande hachée / viande hachée enrichie en protéines végétales (en % MF)

	Viande hachée pur bœuf	Viande hachée enrichie en protéines végétales
protéines animales	16	11,5
protéines végétales	0	5
matière grasse	20	10
teneur en eau	67	60
joules	1020 kJ	650 kJ

Par ailleurs, le rendement technologique (perte de poids après cuisson) est supérieur quand des MPV sont présentes, en raison de leur aptitude à bien retenir les jus de cuisson.

b) Produits de charcuterie.

Pour tout renseignement, se référer au Code des usages de la Salaison, de la Charcuterie, et des Conserves de Viandes (CTSCCV).

Ce sont des MPV (concentrats ou isolats) sous forme pulvérulente qui employées dans les produits de charcuteries cuites en raison de leurs propriétés liantes et émulsifiantes. La préparation se fait en mélangeant soit 1 part de MPV et 6 parts d'eau, soit 1 part de MPV + 6 parts d'eau froide + 6 parts de gras froid, le mélange étant réalisé au moyen de cutter (Stephan) à grande vitesse pendant une dizaine de minutes au maximum.

Pour les émulsions grasses préparées à chaud (saucisse de Strasbourg), la matière grasse chauffée à 75°C est additionnée par saupoudrage de MPV et on ajoute immédiatement l'eau chaude dans les mêmes proportions que la matière grasse. Le salage est réalisé en fin d'émulsion. Les MPV jouent ici le rôle d'agents émulsifiants (en % de la formule, on a alors : maigre de bœuf 35, gorges et gras de porc 35, glace neige 24, MPV 2, sel / sucre / épices / aromates / additifs 4). Les MPV confèrent au produit un moelleux et un juteux recherchés.

Les MPV sont aussi employées dans les saumures de malaxage et d'injection pour la fabrication de produits comme les rôtis cuits de volailles.

XIX.3.2. Industrie céréalière

L'utilisation des MPV dans l'industrie céréalière est commune et ancienne. Le gluten est irremplaçable en panification (levée - élasticité). Les farines de fève et de soja crues sont employées depuis fort longtemps en boulangerie pour leurs activités lipoxygénasiques.

L'incorporation de 20 % de farine de soja à la formule de pain de mie apporte une nette amélioration de la qualité nutritionnelle du produit: la teneur en protéines passe de 8% à 17% et l'équilibre des acides aminés est amélioré (apport de lysine par le soja).

Des pains, biscuits, biscottes enrichis en MPV existent aujourd'hui et connaissent un grand développement aux USA.

Tous les produits céréaliers sont à même de bénéficier d'améliorations de leurs propriétés fonctionnelles par incorporation de certaines protéines végétales (cf le livre « Le noble Art des Protéines » publié par le GEPV en 1990).

XIX.3.3. Produits divers

Pour les formulateurs des IAA, les MPV présentent des potentialités multiples qui associent propriétés fonctionnelles et nutritionnelles.

Par exemple une crème glacée 100% végétale est obtenue selon la démarche suivante :

Mélanger 30 g de concentré de soja et 600 ml d'eau à 40°C. Augmenter la température à 65°C et ajouter 120 g de saccharose, 130 g de sirop de glucose et 5 g d'émulsifiant. Ajouter 100 g d'huile de palme hydrogénée à 65°C et 25 g de poudre de cacao. Mélanger. Réchauffer à 78°C et homogénéiser à 150 kp/cm². Refroidir à 5°C. Maintenir 4 h à 5°C et congeler à -40°C dans un tunnel. Conserver à -18°C.

Il est possible de fabriquer des produits « poisson » enrichis en MPV. Par exemple prendre 800 g de filet de morue hachée à 10 mm et mélanger avec 50 g de concentrat de soja texturé. Ajouter 5 g de sel et 0,5 g de poivre et doucement 180 ml d'eau. Mettre en forme et cuire.

XIX.3.4. Produits diététiques, de régime, de forme etc

Les MPV sont des ingrédients de choix pour les produits diététiques, de régime, de forme, etc. Elles présentent les avantages suivants :

- apport élevé en protéines (jusqu'à 95 % de la MS) bien équilibrées sauf pour les nourrissons.
- teneur très faible en lipides (moins de 1 %). Bien adaptées aux aliments hypocaloriques. Elles peuvent servir de support aux aliments riches en acides gras poly-insaturés ($\omega 3$ etc).
- absence de dérivés animaux (régimes végétariens et végétaliens). Absence de risque de PRION.
- par leur hypoallergénicité, elles sont des ingrédients de base des laits infantiles végétaux prescrits aux enfants allergiques au lait de vache.
- leur éventuelle association avec des fibres et leur composition en minéraux permettent de réguler ces nutriments dans les aliments de régimes hyposodés, hypoglucidiques, riches en fibre etc.

Les produits de la forme incluent souvent des MPV. Parmi de très nombreuses applications on peut citer :

- les produits hypocaloriques (ou minceur) : petits déjeuners, potages, barres céréalières, goûters, desserts, etc.
- les biscuits coupe-faim à base de protéines de soja.
- des spécialités de l'effort intense (hyperprotidiques).
- des spécialités pour végétariens.

XX. INFLUENCE DE TRAITEMENTS TECHNOLOGIQUES SUR LA VALEUR NUTRITIONNELLE DES PROTEINES ALIMENTAIRES

XX.1. INTRODUCTION

Les effets des traitements culinaires et/ou technologiques sur la valeur nutritionnelle des protéines alimentaires ont été très étudiés au cours de ces dernières décennies.

Rappelons brièvement que les buts principaux des nombreux traitements technologiques appliqués à nos aliments sont d'atteindre un goût, une texture ou une saveur recherchés (appétence), d'assurer leur conservation, de détruire les microorganismes ou d'inactiver les composés toxiques qu'ils peuvent renfermer, de fractionner des composants de matières premières, ou encore de modifier intentionnellement un composant pour en améliorer les propriétés ou pour développer des produits nouveaux. Ces traitements permettent ainsi de disposer de façon quasi permanente d'aliments stables et de bonne qualité, mais aussi de permettre la création d'aliments nouveaux.

Très schématiquement rappelons encore que les traitements les plus fréquemment appliqués à nos aliments sont:

- la **chaleur** (cuissons dans l'eau, la vapeur, l'huile, l'air, au contact d'une surface chaude, microondes, blanchiment, pasteurisation, stérilisation, champs électriques pulsés, chauffage ohmique, etc),

- les **variations de l'activité de l'eau** (séchage, additions de solutés),
- le **froid**,
- l'**irradiation** de nature électromagnétique (UV, X, γ , micro-ondes) électronique ou ultrasonique, les **variations de pH** (acidification, alcalinisation),
- les **traitements mécaniques** (broyage, texturation, homogénéisation, filage, battage) ou encore
- l'**addition de composés divers** comme les additifs (figure 133).

Les **interactions des protéines avec d'autres composants** de l'aliment peuvent, dans certaines conditions, provoquer des modifications défavorables.

Les protéines contenues dans les aliments peuvent par ailleurs être soumises à des **modifications physiques, enzymatiques ou chimiques orientées** (extraction et fractionnement, hydrolyse, resynthèse, acylation, désamidation, phosphorylation, succinylation, greffages, etc.) dont le but principal est d'en améliorer une ou plusieurs des propriétés physico-chimiques ou nutritionnelles.

Notion de valeur nutritionnelle d'une protéine. Il est classiquement admis que la fonction nutritionnelle principale des protéines alimentaires est d'apporter à l'organisme des acides aminés et l'azote nécessaires aux synthèses. La notion de valeur nutritionnelle est plus large ; ainsi, pour posséder une bonne valeur nutritionnelle, il est nécessaire que les protéines alimentaires présentent :

- de bonnes qualités organoleptiques .

Ces qualités conditionnent l'appétence et sont modifiables par certains traitements technologiques. Les protéines contribuent au goût et surtout à la texture du produit. De nombreuses molécules protéiques à activité enzymatique sont susceptibles de modifier souvent très défavorablement certaines des propriétés organoleptiques de l'aliment (lipases, lipoxygénases, polyphénoloxydase, etc).

- une non toxicité .

Il existe des protéines toxiques (toxines bactériennes, venins etc.) ou antinutritionnelles (facteurs antitrypsiques, hémagglutinines, etc) dont la "détoxification" peut être obtenue par des traitements adaptés. Par ailleurs, les protéines peuvent subir au cours des traitements technologiques des modifications se traduisant par une diminution de leur valeur nutritionnelle ou par l'apparition de dérivés toxiques dont le devenir dans l'organisme est qualifié de transit métabolique.

- une composition équilibrée en acides aminés : besoins qualitatifs (cf chapitre II page 2)

Il est important que la protéine ait une composition correspondante aux besoins, en particulier en acides aminés indispensables. Il est très important de suivre leur **disponibilité** au cours des traitements technologiques et plus particulièrement celle de ceux qui sont souvent **limitants** et très réactifs par leur chaîne latérale (lys , cys , met , trp , thr surtout).

- un apport satisfaisant : besoins quantitatifs

Ces besoins quantitatifs varient en fonction de nombreux paramètres tels que l'âge, l'état physiologique, etc.

- une digestibilité et une absorption satisfaisantes

Il existe des protéines pas ou peu digestibles (kératines, etc). La digestibilité des protéines est surtout modifiée par des changements de conformation, par la formation de ponts covalents, par isomérisation ou encore par des modifications des chaînes latérales des résidus d'acides aminés

reconnus par les protéases comme sites d'hydrolyse. Il faut donc s'assurer que les peptides et acides aminés libérés après digestion sont bien absorbés pour être normalement utilisables *in vivo*.

TRAITEMENT APPLIQUE A L'ALIMENT		INCIDENCE PRINCIPALE SUR LES PROTEINES
TRAITEMENTS PHYSIQUES	fractionnement (Ultra-filtration , centrifugation etc.) traitements mécaniques (hautes pressions , forces de cisaillement) irradiation électromagnétique ultra-violet g micro-ondes irradiation électronique diminution de l'activité de l'eau (deshydratation , addition de solutés) froid chaleur	variation de la composition en acides aminés selon l'intensité : •changements de conformation (dénaturation , inactivation de protéines toxiques ou à effets anti-nutritionnels etc.) •modifications de la structure primaire (désulfuration , désamidation , formation de dérivés , etc.)
REACTIONS D'ORIGINE CHIMIQUE et/ou ENZYMATIQUE	Interactions avec des composants de l'aliment protéines lysinoalanine , lanthionine , carbolines etc lipides (oxydés)..... oxydations , glucides (réducteurs) réaction de Maillard composants d'arômes rétention polyphénols condensation avec la lysine ,oxydations sels changement de conformation pigments fixations , modifications de couleur	
	Réaction avec des composés chimiques et additifs divers acides hydrolyses , destructions d'acides aminés bases isomérisation , formation de dérivés , etc sels (NaCl , nitrites etc)..... changements de conformation agents oxydants (peroxydes , hypochlorites)... formations de dérivés nitrosés agents réducteurs oxydation de MET , CYS , TRP solvants formation de dérivés S-sulfonés conservateurs effets variables selon leur nature colorants adsorption réactifs chimiques spécifiques surtout au niveau deLYS , GLN , ASN , GLU , PRO , SER , THR , CYS , MET ,TYR	
	Réactions enzymatiques protéolyse resynthèse transacylation	modifications spécifiques de la structure primaire

Figure 133. Les principaux traitements technologiques appliqués à nos aliments et leurs incidences sur les protéines.

Le plus souvent, les divers traitements auxquels sont soumis nos aliments ont des effets bénéfiques sur la valeur nutritionnelle. Ainsi la cuisson de quelques protéines végétales ou animales provoque souvent une augmentation de leur digestibilité par le démasquage de sites d'hydrolyse consécutif à des réactions de dénaturation (figure 134).

Les changements de conformation des protéines se traduisent aussi par des variations de leur antigénicité et de certaines de leurs éventuelles propriétés biologiques (toxiques, enzymatiques etc) et/ou fonctionnelles.

Malheureusement certains traitements ont des effets défavorables qui ne présentent qu'une importance minime s'ils n'affectent qu'une faible proportion de résidus d'acides aminés, s'ils interviennent sur une acide aminé indispensable qui ne constitue pas le facteur limitant de la protéine ou si la protéine alimentaire qui les a subis ne contribue que faiblement à l'apport protéique du régime.

Parmi les nombreuses réactions aux conséquences nutritionnelles ou toxicologiques défavorables susceptibles de se produire au cours de certains traitements technologiques appliqués à nos aliments, ce sont celles qui affectent la structure primaire des protéines qui ont les plus effets les plus importants (hydrolyses, isomérisation, destruction ou modifications de certaines chaînes latérales de résidus d'acides aminés). Les modifications chimiques les plus fréquemment observées se produisent avec les groupements les plus réactifs des chaînes latérales des résidus d'acides aminés ; il s'agit le plus souvent d'oxydations, de réductions ou encore de substitutions nucléophiles et électrophiles. Les dérivés formés diminuent généralement la valeur nutritionnelle de la protéine, certains dérivés étant même toxiques.

Les principales modifications qui affectent des groupements fonctionnels des chaînes latérales se traduisent par des réactions chimiques de condensation entre protéines et autres composants alimentaires (réactions protéines-protéines, réactions protéines-autres constituants tels que glucides, lipides, sels minéraux, polyphénols, pigments) ou encore par des réactions chimiques entre protéines et additifs ou contaminants alimentaires comme les nitrites, les sulfites, les oxydants, les solvants, etc.

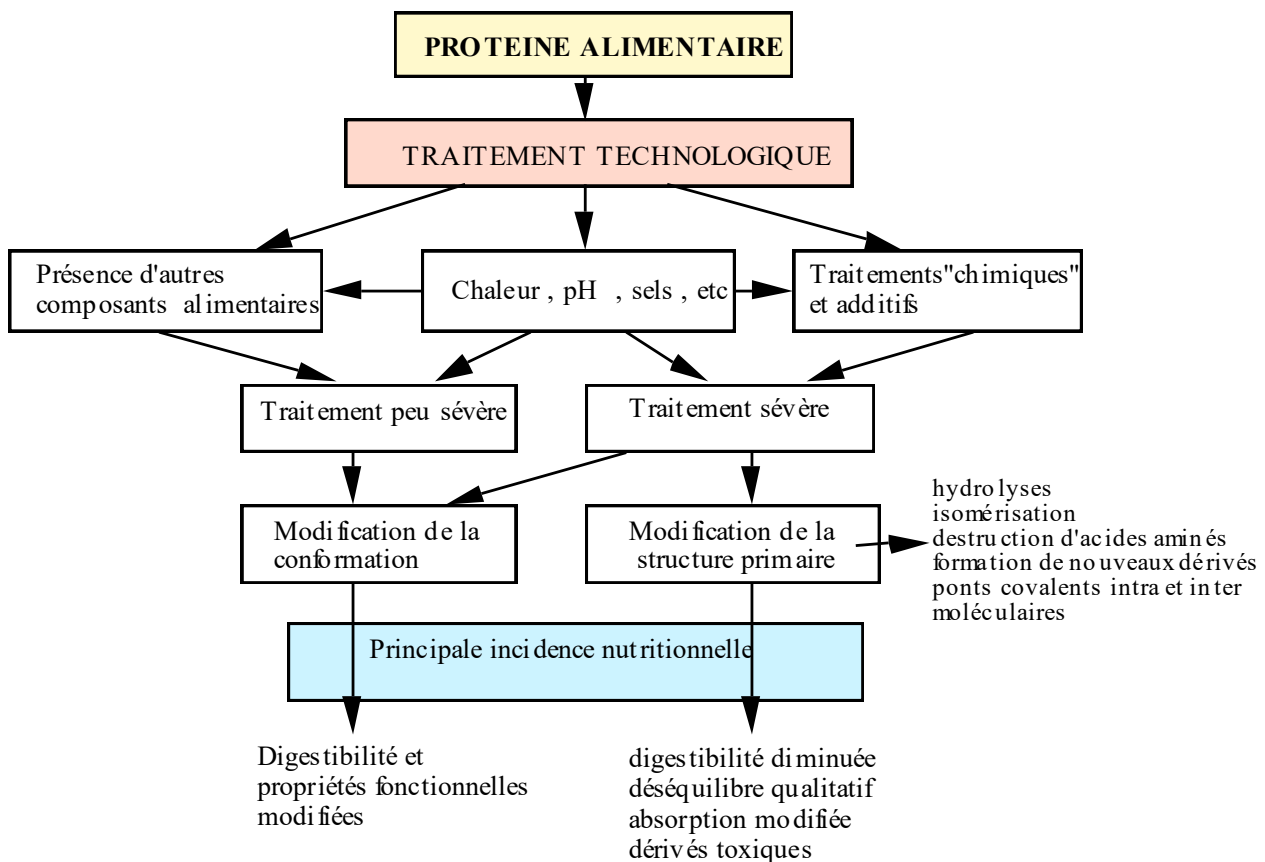


Figure 134. Traitements technologiques et incidences sur la valeur nutritionnelle des protéines

Certaines modifications chimiques ou biochimiques sont volontaires et orientées (modifications de propriétés fonctionnelles, amélioration de la valeur nutritionnelle, protéolyse, resynthèse, transamination).

Les réactions chimiques mises en jeu au cours des traitements technologiques sont généralement accélérées par la température et dépendent étroitement de paramètres physico-chimiques tels que le pH ou encore l'activité de l'eau.

Rappelons enfin que des modifications défavorables à la qualité nutritionnelle des protéines sont susceptibles de se produire "naturellement" et "spontanément" dans certains produits alimentaires.

Les résidus d'acides aminés indispensables dont la réactivité de la chaîne latérale est telle qu'ils se retrouvent généralement impliqués dans des modifications souvent irréversibles des protéines sont surtout la lysine, les acides aminés soufrés, le tryptophane et la thréonine, et parmi les autres résidus la glutamine, l'asparagine et la phosphosérine. La réactivité des groupements fonctionnels des chaînes latérales de ces acides aminés en fonction des traitements technologiques est schématisée sur la figure 135.

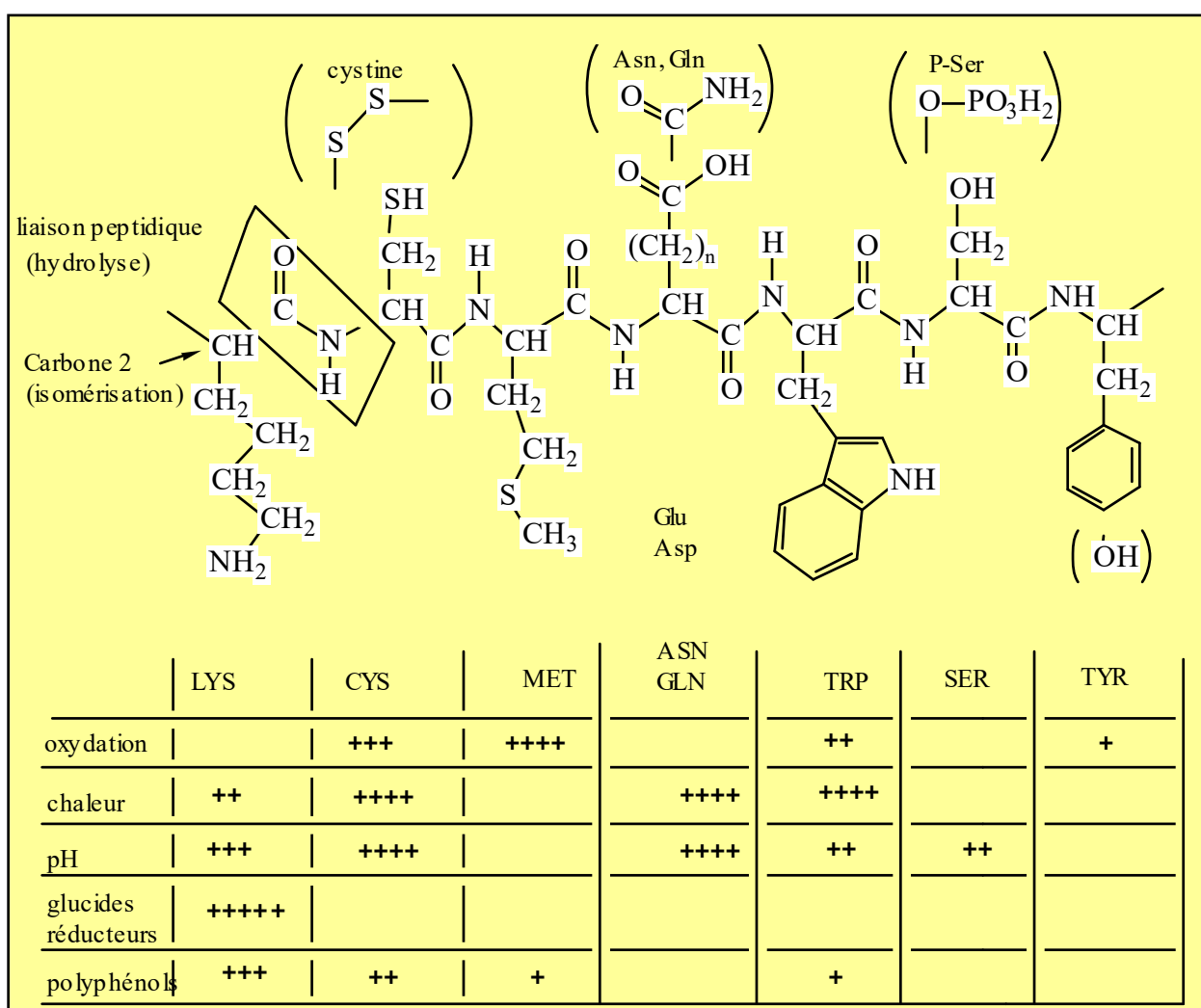


Figure 135. Les principaux "sites" protéiques impliqués dans les modifications résultant de divers traitements technologiques.

XX.2. DENATURATION DES PROTEINES

Les traitements thermiques, essentiellement la chaleur mais aussi le froid avec la congélation, les traitements mécaniques et/ou réalisés sous des pressions élevées, la deshydratation, le traitement par certains solvants et des variations de pH provoquent des changements de conformation dont l'effet le plus visible sur les protéines globulaires est une diminution de la solubilité. Aucune liaison covalente de la chaîne polypeptidique n'est rompue et la structure primaire n'est pas affectée (figure 136). Au point de vue thermodynamique il s'agit d'un changement d'un état ordonné à un état désordonné avec augmentation d'entropie.

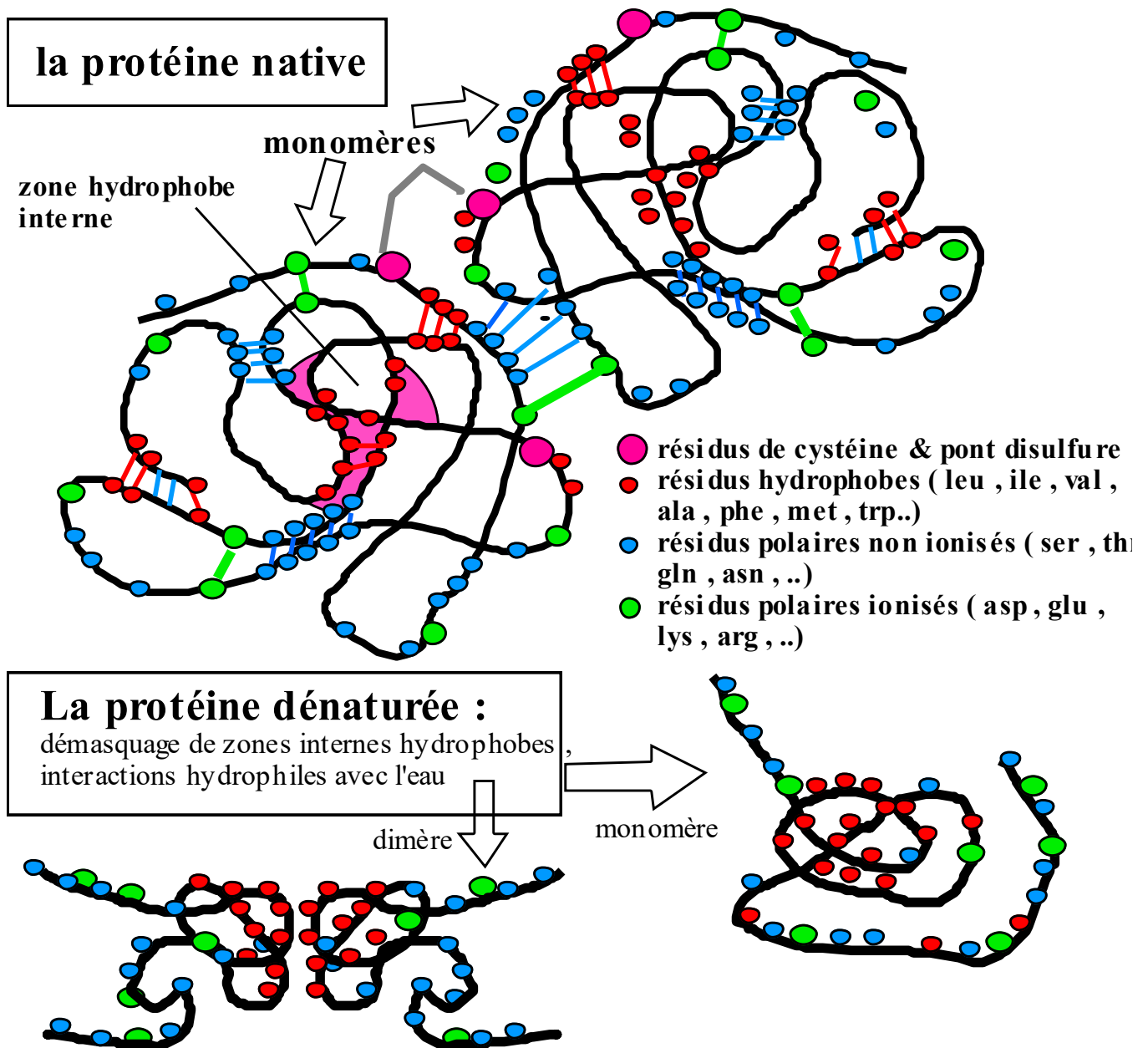


Figure 136. Schéma de la dénaturation des protéines sous l'effet de la chaleur.

En milieu aqueux, la **chaleur** provoque des modifications au niveau de liaisons chimiques de faible énergie et surtout des ruptures de liaisons hydrogène intramoléculaires impliquées dans la stabilisation spatiale de la macromolécule (figure 137).

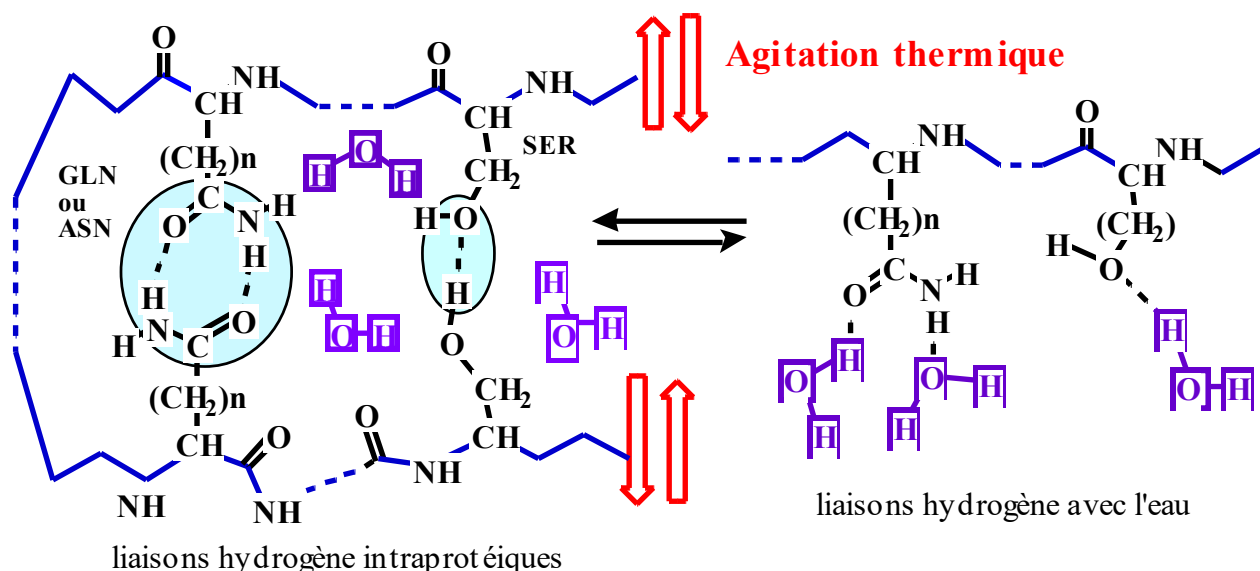


Figure 137. Effets des traitements thermiques en milieu aqueux sur les liaisons hydrogène et donc sur la conformation des protéines.

Dans ces conditions, les interactions hydrophobes sont renforcées. Si ces groupements hydrophobes sont localisés dans la partie "centrale" de la molécule native, leur démasquage se traduit par une diminution de la solubilité et, si des interactions hydrophobes protéine - protéine s'établissent, par une agrégation souvent suivie d'une précipitation. Si enfin la molécule native présente une distribution spatiale "homogène" de ses groupements hydrophiles et hydrophobes, la chaleur contribuera à une dénaturation avec destruction de liaisons hydrogène et au renforcement de liaisons hydrophobes intramoléculaires sans que la solubilité n'en soit pour autant profondément affectée. Si le traitement thermique est modéré, le démasquage et donc l'accessibilité aux sites d'hydrolyse des protéases conduit à une amélioration de la digestibilité de la macromolécule (figure 138). Cependant, si le niveau de dénaturation atteint est important, des effets défavorables sur la digestibilité et sur le coefficient d'efficacité protéique peuvent apparaître.

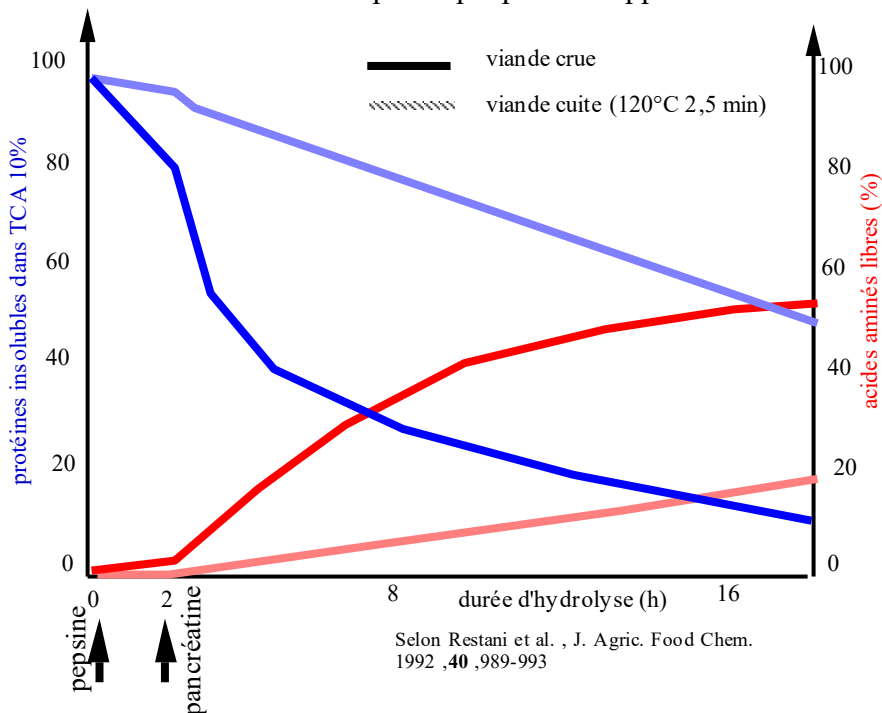


Figure 138. Digestibilité in vitro de la viande crue et cuite.

Les traitements thermiques appliqués aux produits alimentaires diffèrent essentiellement par le niveau de température atteint, l'activité de l'eau et le temps. Le positionnement de ces traitements par rapport aux paramètres température et activité de l'eau sont schématisés sur la figure 139.

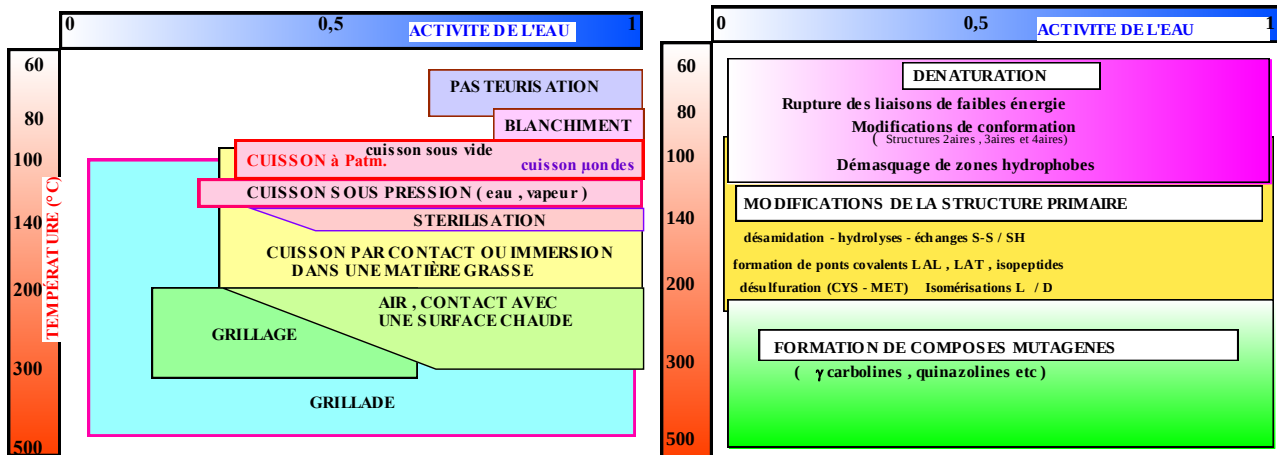


Figure 139. Traitements thermiques appliqués aux aliments (t° , aw) et incidences.

Ainsi les glycinines du soja, le collagène, l'ovalbumine etc. sont plus facilement digestibles après un traitement thermique modéré en milieu aqueux. Au niveau d'un aliment, cette amélioration de digestibilité résulte aussi d'un effet direct de fragilisation des structures cellulaires favorisant l'accessibilité des protéines aux protéases.

La dénaturation par le **froid**, si elle résulte en partie du renforcement des liaisons hydrogène et une diminution des interactions hydrophobe, est surtout la conséquence de l'augmentation de la force ionique dans l'environnement aqueux non cristallisé de la protéine. Ses effets sur la valeur nutritionnelle sont souvent insignifiants et ce sont d'abord des variations de digestibilité qui sont observées.

La dénaturation des protéines au contact des **solvants** apolaires utilisés pour extraire les lipides (hexane), des pigments chlorophylliens et hémiques (acétone), les glucides solubles, les phospholipides, l'eau et certains sels minéraux (éthanol, isopropanol) ne se traduit généralement que par des variations de structure secondaire et de digestibilité.

Les **traitements mécaniques** et/ou réalisés sous des **pressions élevées**, le traitement par des **gaz** sous des pressions élevées se traduisent par des changements de conformation des protéines dont l'importance est fonction de l'intensité et du temps d'application. Leurs conséquences les plus nettes au niveau des protéines se situent au niveau de certaines propriétés physico-chimiques ou fonctionnelles et au plan nutritionnel c'est d'abord la digestibilité qui est modifiée.

Le **blanchiment**, la **cuisson** dans l'eau, la cuisson microondes, le traitement par des gaz permettent ainsi de dénaturer des molécules protéiques dont les activités enzymatiques induisent la formation de composés toxiques ou des modifications défavorables au niveau des qualités organoleptiques. Il est ainsi possible de signaler les inactivations d'enzymes à l'origine de détériorations comme la catalase, la peroxydase, la lipase, la lipoxygénase, la polyphénoloxydase, les protéases etc. ou encore d'enzymes dont l'activité catalytique génère des produits toxiques (myrosinase du colza par exemple). Les cinétiques d'inactivation ont, pour la plupart de ces réactions, un ordre apparent égal à 1.

Appliqués à certains de nos aliments, les traitements technologiques "dénaturants" permettent d'inactiver des molécules protéiques toxiques (certaines toxines bactériennes, toxines végétales comme la ricine D etc) ou à effet antinutritionnel (inhibiteurs des protéases, hémagglutinines) qu'ils sont susceptibles de contenir. Les graines de certaines légumineuses comme le soja, l'arachide, le pois, le haricot ou encore la fève, de nombreuses plantes vertes (luzerne) et certaines graines de

céréales contiennent ainsi des inhibiteurs qui, en se combinant de façon quasi irréversible avec des protéases *in vivo*, inhibent nettement les phénomènes de digestion, et par voie de conséquence diminuent la valeur nutritionnelle des protéines ingérées. Ainsi, les inhibiteurs de la trypsine (de Kunitz, de Bowman) et de la chymotrypsine présents dans les graines de soja provoquent chez la plupart des espèces animales des réductions de croissance et des perturbations physiologiques au niveau pancréatique (hypertrophie, modifications de la sécrétion). La réduction de croissance liée à leur ingestion résulterait en partie d'une perte en acides aminés indispensables par formation d'un complexe "non-digestible" trypsine-inhibiteur dont la non absorption des acides aminés soufrés qu'il contient serait à l'origine d'une déficience pour l'organisme. Les phytohémagglutinines ou lectines présentes dans des graines de légumineuses (haricot, fève) constituent un second groupe de protéines responsables d'effets antinutritionnels ou toxiques. Ces molécules forment des complexes avec les parties osidiques de nombreux produits naturels et sont partiellement responsables de la faible valeur nutritionnelle des protéines végétales natives auxquelles elles sont associées. Ces inhibiteurs agiraient à la surface des entérocytes en se complexant avec des polysides membranaires et perturberaient, entre autres, les activités transférases.

Ces inhibiteurs sont inactivés par des traitements thermiques réalisés en milieu aqueux comme la cuisson dans l'eau ou la stérilisation. RACKIS (1974) montre, chez le rat, que le coefficient d'efficacité protéique de la farine de soja augmente d'environ 1,5 à 2,8 après 10 minutes d'un traitement thermique à 100°C en milieu humide tandis que dans le même temps, l'activité anti-trypsique de la farine diminue d'environ 80 % (figure 140).

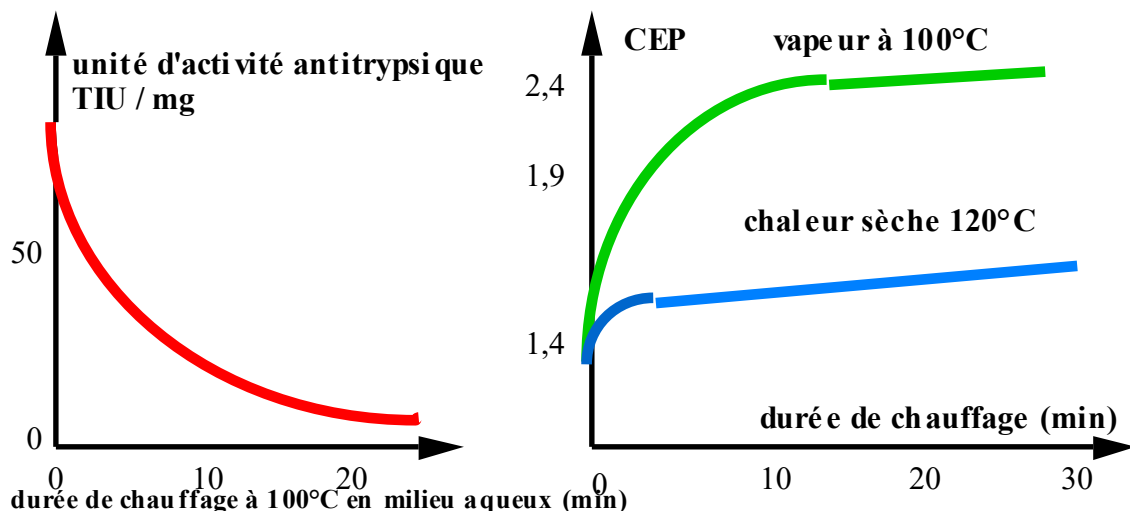


Figure 140. Traitements thermiques et valeur nutritionnelle des protéines de soja.

Les inhibiteurs tryptiques contenus dans des graines comme le riz, le blé ou encore l'avoine sont également inactivés après cuisson.

XX.3. MODIFICATIONS DE LA VALEUR NUTRITIVE PAR FRACTIONNEMENT

L'isolement et la purification des protéines à partir de leur environnement naturel (lait, viande, graines, feuilles etc.) permet d'obtenir des fractions plus ou moins riches en protéines (farine, concentrat, isolat). Ces fractions ont souvent une composition en acides aminés différentes de celle de la matière première en raison d'une perte, en cours de préparation, de protéines dont les propriétés particulières ne permettent pas la récupération dans les conditions adoptées (solubilité, pHi, température, concentration en sels etc).

WOLF (1970) montre ainsi que la teneur en certains acides aminés indispensables des concentrats et isolats de soja est inférieure à celle de la farine délipidée et HACKLER et al. (1963) constatent que

la coefficient d'efficacité protéique de la fraction soluble dans l'eau de la farine de soja (2,11) est inférieur à celui de la fraction protéique insoluble (2,71) généralement considérée comme un déchet. Dans ce dernier cas, il est probable que des protéines à activité antinutritionnelle se retrouvent dans la fraction soluble.

Il est donc important de s'assurer de la composition d'abord et de la valeur nutritionnelle ensuite, des différentes fractions protéiques obtenues à partir d'une matière première donnée.

XX.4. MODIFICATIONS DES PROTEINES PAR LES MICROORGANISMES

Dans les produits alimentaires fermentés, les protéines présentes sont souvent hydrolysées par les microorganismes et les acides aminés ainsi libérés utilisés dans le métabolisme microbien. Il est courant que les protéines microbiennes synthétisées aient une valeur nutritionnelle inférieure à celle des protéines "substrat" initialement présentes. Par ailleurs, si les processus fermentaires sont continus et avec des successions de flores, les protéines d'origine non microbienne subissent des modifications conduisant à leur "minéralisation", c'est à dire des désaminations, des décarboxylations etc. avec formation d'eau, d'ammoniac et d'anhydride carbonique.

L'utilisation de germes peu protéolytiques permet d'augmenter la digestibilité des protéines mais aussi d'éliminer de certains produits fermentés des composés toxiques ou antinutritionnels (stachyose, raffinose, verbascose, thioglycosides, etc), la valeur nutritionnelle du produit étant alors améliorée.

XX.5. MODIFICATIONS DES PROTEINES EN ABSENCE DE TOUT AUTRE COMPOSE

XX.5.1. Modifications de la liaison peptidique

Certains traitements technologiques peuvent engendrer une hydrolyse au niveau de la liaison peptidique. La liaison peptidique est hydrolysable en milieu aqueux par des protéases dont la spécificité est liée à la nature de la chaîne latérale des acides aminés. Une telle hydrolyse qui ne modifie pas la composition améliore généralement la digestibilité. Elle est pratiquée sur des protéines destinées à l'alimentation parentérale ou à des aliments diététiques.

L'hydrolyse catalysée par des acides ou par des bases a une vitesse qui augmente avec la température. L'hydrolyse catalysée par l'acide chlorhydrique est couramment utilisée pour l'analyse des acides aminés. La vitesse de libération est variable selon de la nature des acides aminés (rapide pour la sérine, la thréonine, l'acide glutamique et très lente avec la leucine, l'isoleucine et la valine) et certains acides aminés sont détruits (tryptophane, glutamine, asparagine). Des hydrolysats acides de protéines végétales sont utilisés pour leurs qualités organoleptiques (goût de viande).

Une hydrolyse partielle peut intervenir au cours d'un traitement en milieu alcalin. De tels traitements sont pratiqués dans les technologies de préparation et de purification de concentrés protéiques de graines de légumineuses, de poisson, de plumes ou encore de poils, dans la réalisation de collodions protéiques aptes au filage, pour faciliter le pelage de grains, de légumes ou de fruits ou encore pour détoxifier des produits végétaux contaminés par des toxines fongiques.

XX.5.2. Isomérisation

Des modifications liées à certains traitements technologiques sont susceptibles d'affecter la conformation du **carbone α** des protéines. Ce carbone α existe sous forme L dans les protéines natives. Sous l'effet de la chaleur et plus particulièrement en milieu alcalin, une isomérisation L $\rightarrow$ D peut se produire (figure 141). La cinétique de l'isomérisation dépend de nombreux facteurs en particulier de la nature de la protéine, de la concentration en alcali, de la température mais aussi de la nature du résidu d'acide aminé. Ainsi l'acide aspartique, la phénylalanine, la sérine et l'acide glutamique sont particulièrement sensibles à l'isomérisation mais des résidus d'acides aminés indispensables peuvent être affectés et la racémisation peut même être obtenue. La réaction

d'isomérisation qui ne se produit que sur des résidus d'acides aminés est concurrencée par la réaction d'hydrolyse.

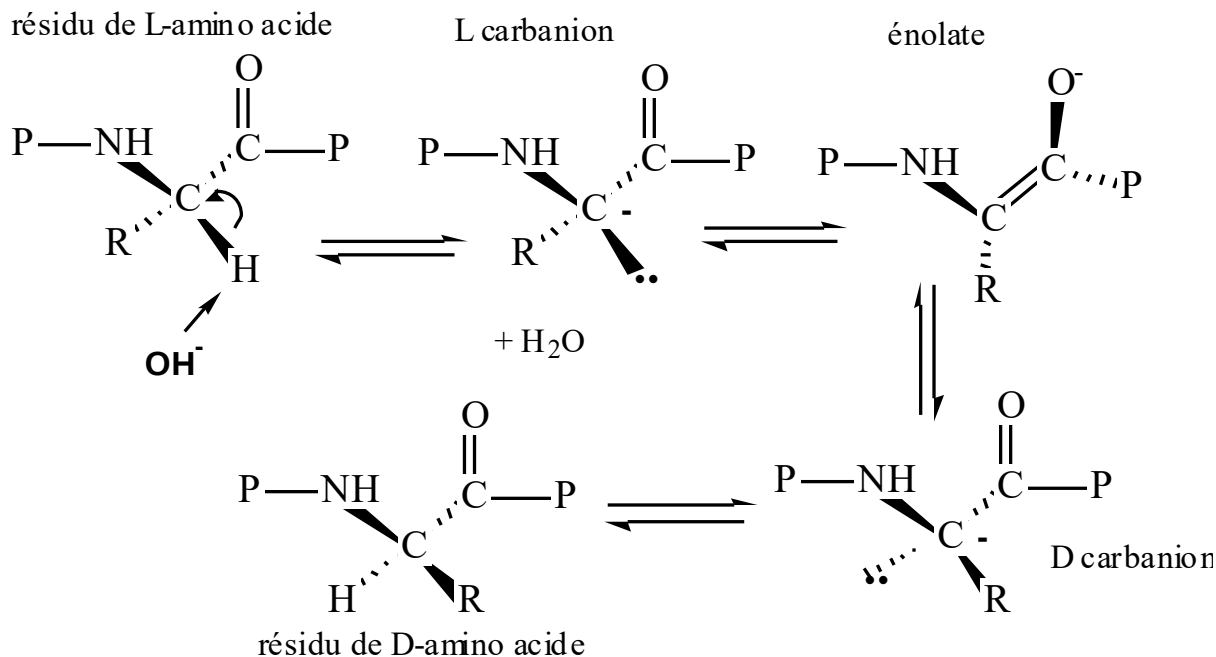


Figure 141. Schéma réactionnel de l'isomérisation de résidus d'acides aminés en milieu alcalin.

La formation de résidus D d'amino acide a plusieurs conséquences. La première est une diminution de la digestibilité si ce résidu est un site de protéolyse, la protéase étant stéréospécifique. La deuxième est que même libérés, la plupart des acides aminés D n'ont pas de valeur nutritionnelle. Il peut se produire des isomérisations à partir d'autres atomes de carbone asymétriques. Ainsi, l'isoleucine peut s'isomériser en allo isoleucine et la thréonine en allo thréonine.

XX.5.3. Modifications des chaînes latérales des résidus d'acides aminés

La stabilité des chaînes latérales des résidus d'acides aminés varie en fonction de leur structure. Il est évident que les acides aminés à chaîne latérale aliphatique (alanine, valine, leucine, isoleucine) ont une réactivité minimale et ne subissent pratiquement pas de modification au cours des traitements technologiques.

Par contre certains résidus d'acides aminés subissent dans ces conditions et en absence de tout autre composant de nature chimique, des modifications qui sont fonction de la nature du groupement fonctionnel de leur chaîne latérale. Les dérivés formés sont quelquefois très réactifs et des condensations intra et interprotéiques peuvent alors intervenir.

Parmi les résidus affectés directement au cours de traitements technologiques il faut signaler :

- la **glutamine** et l'**asparagine** qui subissent sous l'effet de la chaleur et en milieu acide ou alcalin une désamidation dont l'effet significatif sur la valeur nutritionnelle est lié à la formation ultérieure de ponts covalents. La désamidation peut également intervenir au cours d'une protéolyse.

Il peut se former à partir des résidus gln N-terminaux de l'acide pyroglutamique et à partir de l'asn des dérivés cycliques « imides » (figure 142).

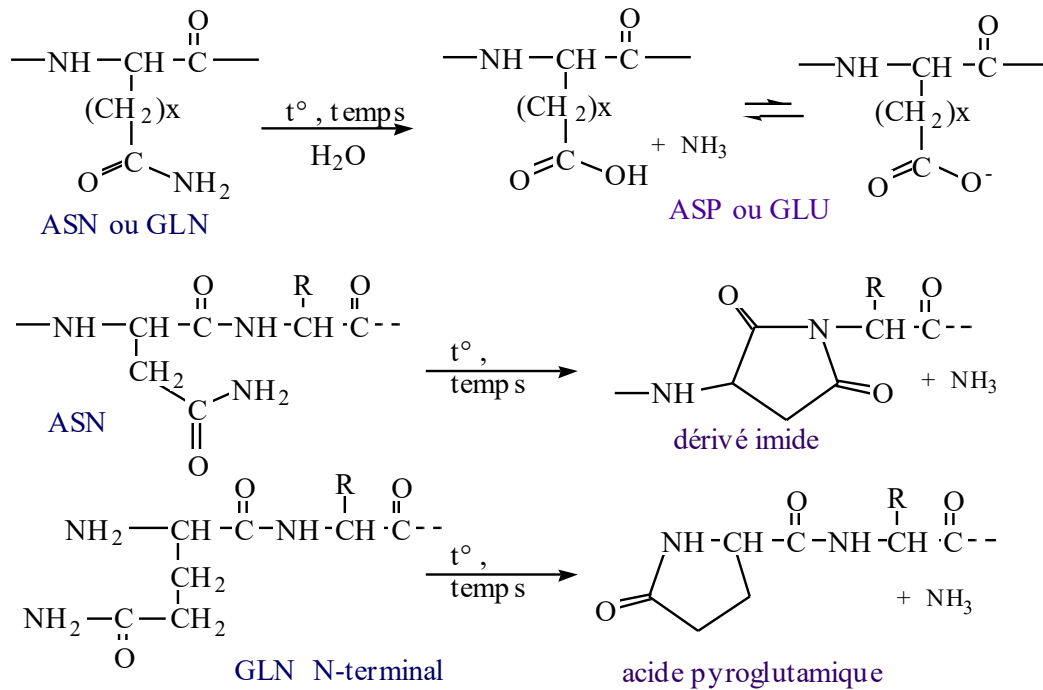


Figure 142. Effets de la chaleur sur les résidus de glutamine et d'asparagine.

- la **cystéine** et la **cystine** qui sont sujettes à une désulfuration sous l'effet de la chaleur. Les composés soufrés qui apparaissent dans ces conditions (sulfure d'hydrogène, diméthyl sulfure, diméthyl disulfure etc.) contribuent à l'arôme et au goût des aliments protéiques cuits. Cette désulfuration accélérée en milieu alcalin se traduit par la formation de déhydroalanine dont la réactivité est à l'origine de la formation de ponts covalents (figure 143).

- la **phosphothréonine** et la **phosphosérine** qui en milieu alcalin se déphosphorylent et donnent des résidus de déhydroalanine ou de méthyldéhydroalanine (figure 143).

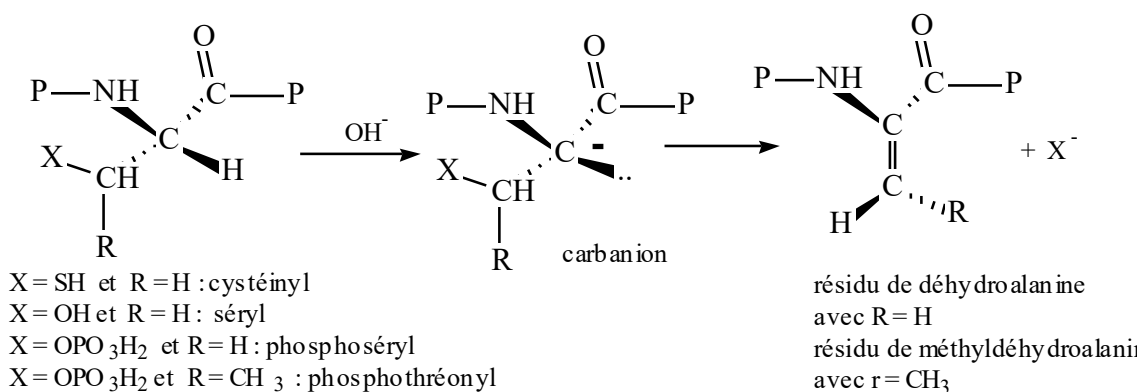


Figure 143. Destruction de chaînes latérales de résidus d'acides aminés avec formation de déhydroalanine

- l' **arginine** dont le groupement guanidique de sa chaîne latérale est sensible aux traitements thermiques et plus particulièrement en milieu alcalin. Il se forme des résidus de citrulline ou d'ornithine avec dans ce dernier cas, libération d'urée.

- le **tryptophane** qui est détruit au cours des traitements thermiques réalisés en présence d'oxygène et en milieu aqueux. Dans les conditions de traitement employées pour nos aliments, cette destruction n'affecte cependant pas de façon significative la teneur en tryptophane des protéines.

Néanmoins, aux températures élevées (300°C et plus) atteintes par exemple au cours du grillage de produits riches en protéines comme les viandes ou les poissons, il se forme, à partir de cet acide aminé, des dérivés carboniliques (figure 144) dont le pouvoir mutagène mesuré par le test Ames-*Salmonella* est très élevé (SUGIMURA et al., 1977).

De très nombreux travaux sont actuellement réalisés sur ces composés mutagènes et comme on attribue à environ 50 % des cancers humains une origine alimentaire (BARNES et al., 1983), il faut veiller à ce que ces substances ne soient pas présentes dans nos aliments.

Le pouvoir mutagène estimé par le test AMES-Salmonella TA 98 (AMES et al., 1975) des dérivés du tryptophane identifiés dans les pyrolysats de protéines ou de l'acide aminé libre est respectivement égal à 104 000, 39 000, 300 et 200 révertants / μg pour Trp-P-2, Trp-P-1, A α C et MeA α C. Les rendements de formation dans les produits soumis à ces traitements thermiques intenses est voisin de 10 à 50 ng / g pour Trp-P-1, Trp-P-2 ou MeA α C et atteint 100 à 4000 ng / g pour A α C. Les β carbolines qui sont les composés les plus abondamment formés au cours de ces traitements ne possèdent pas de pouvoir mutagène propre, mais potentialisent celui d'autres composés.

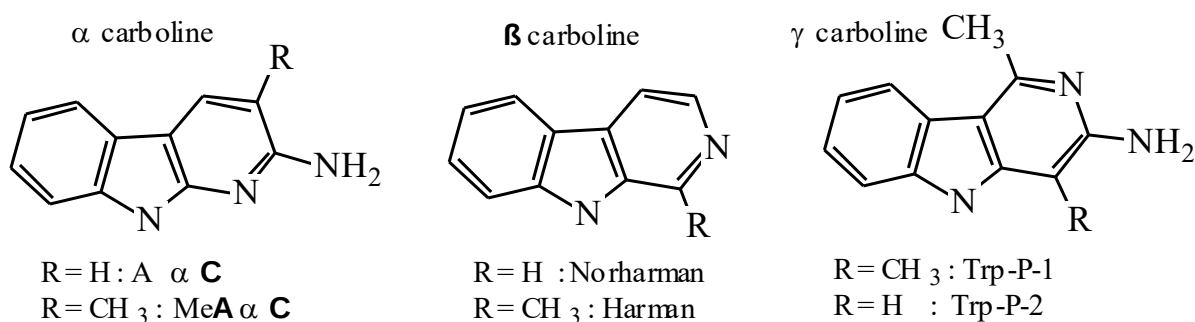


Figure 144. Principaux dérivés carboniliques formés au cours des traitements thermiques sévères à partir de tryptophane libre ou protéique .

Des composés mutagènes sont formés à partir des produits protéiques au cours de traitements thermiques réalisés en milieu aqueux. Si, dans les conditions normalement utilisées dans les opérations de cuisson (ébullition, microondes) ou de stabilisation (pasteurisation, stérilisation) leur quantité peut être considérée comme négligeable, il n'en reste pas moins qu'il faut veiller à ce que la formation de ces composés cancérigènes potentiels soit ramenée au niveau le plus bas possible.

-• l' **acide glutamique** qui est transformé, au cours de traitements thermiques sévères, en dérivés Glu-P-1 et Glu-P-2 (figure 145) dont le pouvoir mutagène évalué par le nombre de révertants de *Salmonella* TA 98 est respectivement égal à 49 000 et 1 900 / μg .

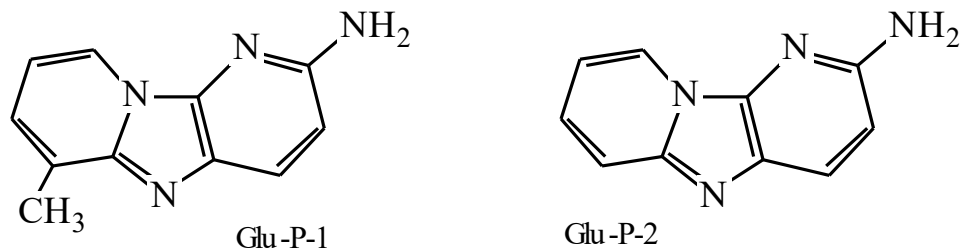


figure 145. Dérivés mutagènes identifiés dans un pyrolysats d'acide glutamique

XX.5.4. Interactions protéines - protéines

Des interactions protéines - protéines apparaissent surtout au cours de traitements thermiques, en milieu alcalin pour certaines, par formation de ponts covalents (figure 146).

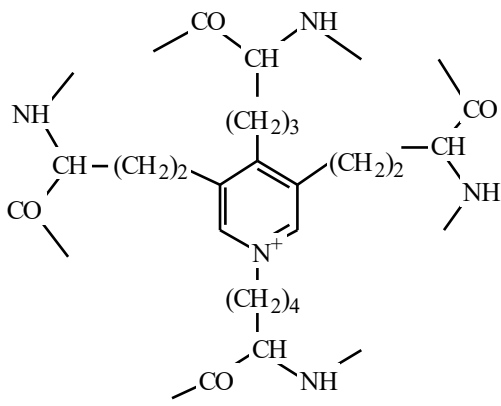
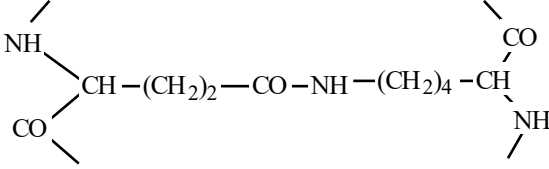
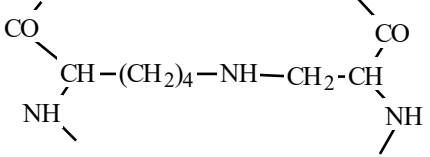
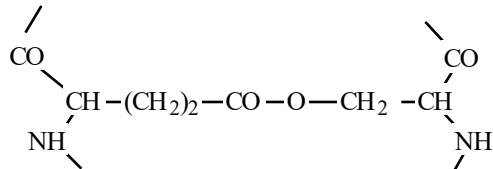
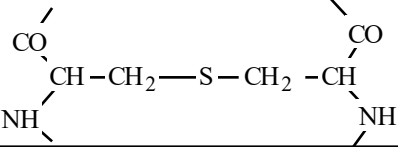
NATURE DU PONT COVALENT	ACIDES AMINES ET TRAITEMENTS IMPLIQUES	STRUCTURE
desmosine (et isodesmosine)	lysine pont naturel présent dans le collagène et l'élastine	
ϵ N (γ glutamyl) lysine (ϵ N (β aspartyl) lysine)	naturel dans le collagène et la kératine Formé par la transglutaminase ou par traitement thermique à partir de lysine et de glutamine	
lysinoalanine (et ornithinoalanine ou lysinométhylalanine)	formé au cours des traitements thermiques et en milieu alcalin à partir de cystine (P-sérine) et de lysine	
ester	naturel ou formé au cours des traitements thermiques à partir de sérine et d'acide glutamique ou aspartique	
lanthionine	naturel dans la laine formé au cours des traitements thermiques en milieu alcalin à partir de cystéine	

Figure 146. Ponts covalents naturels ou formés au cours de traitements technologiques dans les protéines alimentaires.

En effet, certaines des réactions chimiques affectant les chaînes latérales des résidus d'acides aminés génèrent des dérivés très réactifs aptes à se condenser avec des groupements fonctionnels de chaînes latérales d'autres acides aminés. Il apparaît alors des ponts covalents intra ou intermoléculaires dont les conséquences sur la valeur nutritionnelles se situent d'abord au niveau de la digestibilité mais aussi au niveau de la disponibilité des résidus d'acides impliqués.

Certaines des molécules constitutives de ces ponts présentent parfois des effets antinutritionnels voire toxiques. Rappelons ici que des ponts covalents naturels existent dans certaines protéines peu ou pas digestibles comme le collagène, la kératine ou encore l'élastine. Les principaux ponts covalents naturels ou induits par des traitements technologiques sont schématisés sur la figure 146.

a) Ponts isopeptidiques

Les ponts covalents isopeptidiques du type ϵ N-(γ -glutamyl)-lysyl ou ϵ N-(β -aspartyl)-lysyl résultent d'une condensation entre résidus de glutamine ou d'asparagine et de lysine (figure 147). Ces ponts se forment au cours de traitements thermiques sévères par transamination. La désamination des amides conduit parallèlement à la formation d'ammoniac. Jusqu'à 15 % des résidus de lysine d'une protéine peuvent ainsi être impliqués dans la réaction. La formation de tels ponts peut être catalysée par une transglutaminase.

La formation de tels ponts diminue la digestibilité de la protéine dans laquelle ils se sont formés ainsi que le coefficient d'efficacité protéique et la valeur biologique. La disponibilité nutritionnelle de la plupart des acides aminés est abaissée. *In vivo*, ces ponts empêchent, par gêne stérique, les protéases d'atteindre leur site d'hydrolyse et retardent la digestion des protéines. MAURON (1970) puis FINOT et al. (1978) ont montré que l' ϵ N-(γ -glutamyl)-lysine est utilisable comme source de lysine chez le rat et le poulet tandis que l' ϵ N-(β -aspartyl)-lysine ne l'est pas. Il est donc probable que l' ϵ N-(γ -glutamyl)-lysyl formé dans les protéines puisse être libéré puis absorbé et que la lysine qu'il contient soit biologiquement disponible. Des peptidases rénales sont par ailleurs capables d'hydrolyser la liaison isopeptidique.

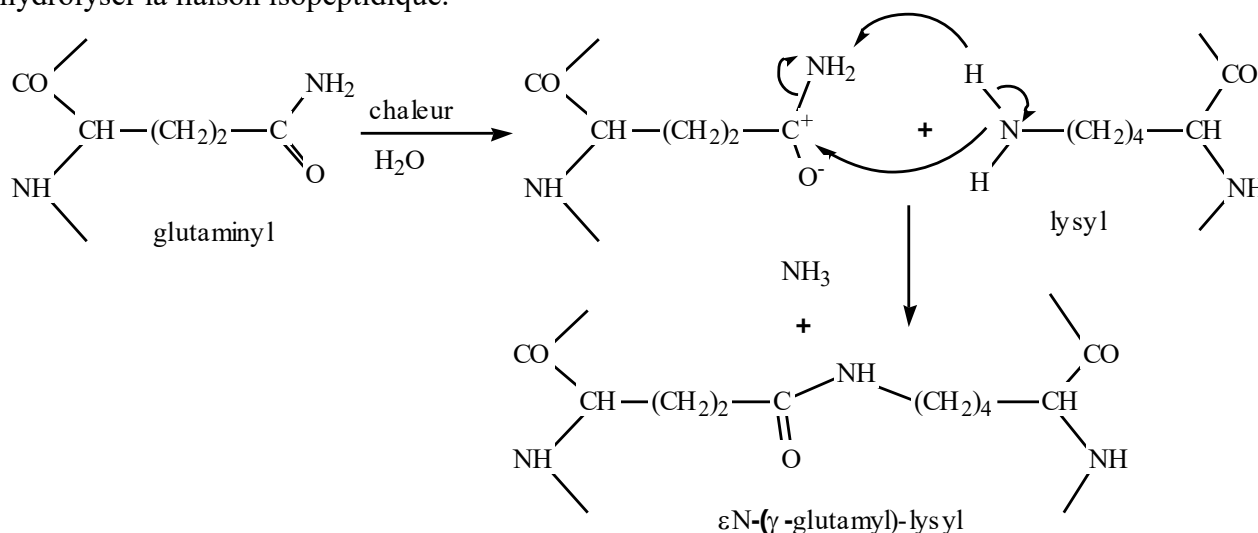


Figure 147. Formation de ponts covalents isopeptidiques du type ϵ N-(γ -glutamyl)-lysyl

b) Ponts covalents du type lysinoalanine ou ornithinoalanine ou lysinométhylalanine

Les ponts covalents du type lysinoalanine ou ornithinoalanine ou lysinométhylalanine se forment respectivement par condensation entre les groupements ϵ NH₂ des résidus de lysine, δ NH₂ des résidus d'ornithine et des résidus de déhydroalanine ou de méthyl-déhydroalanine (figures 146, 147 et 148). La formation de ces acides aminés intra ou intermoléculaires dans les protéines alimentaires et leurs conséquences nutritionnelles et toxicologiques ont fait l'objet de nombreux travaux et des revues leur ont été consacrées.

Les conditions de formation de lysinoalanine dans les protéines alimentaires sont bien connues. Chaque protéine possède ainsi un nombre de sites potentiels de formation de cet acide aminé, les séquences lysyl - déhydroalanyl ou déhydroalanyl - lysyl étant très favorables. Les principaux autres paramètres de cette formation sont le pH, la nature de l'alcali, la température et la durée du traitement. En raison de la configuration sp² du carbone α de la déhydroalanine, la lysinoalanine existe sous forme de deux diastéréoisomères (LD et LL) si la lysine n'a pas subi d'isomérisation.

Certains composés comme la cystéine, l'acide ascorbique, le glucose inhibent plus ou moins la formation de lysinoalanine au cours des traitements thermiques en milieu alcalin.

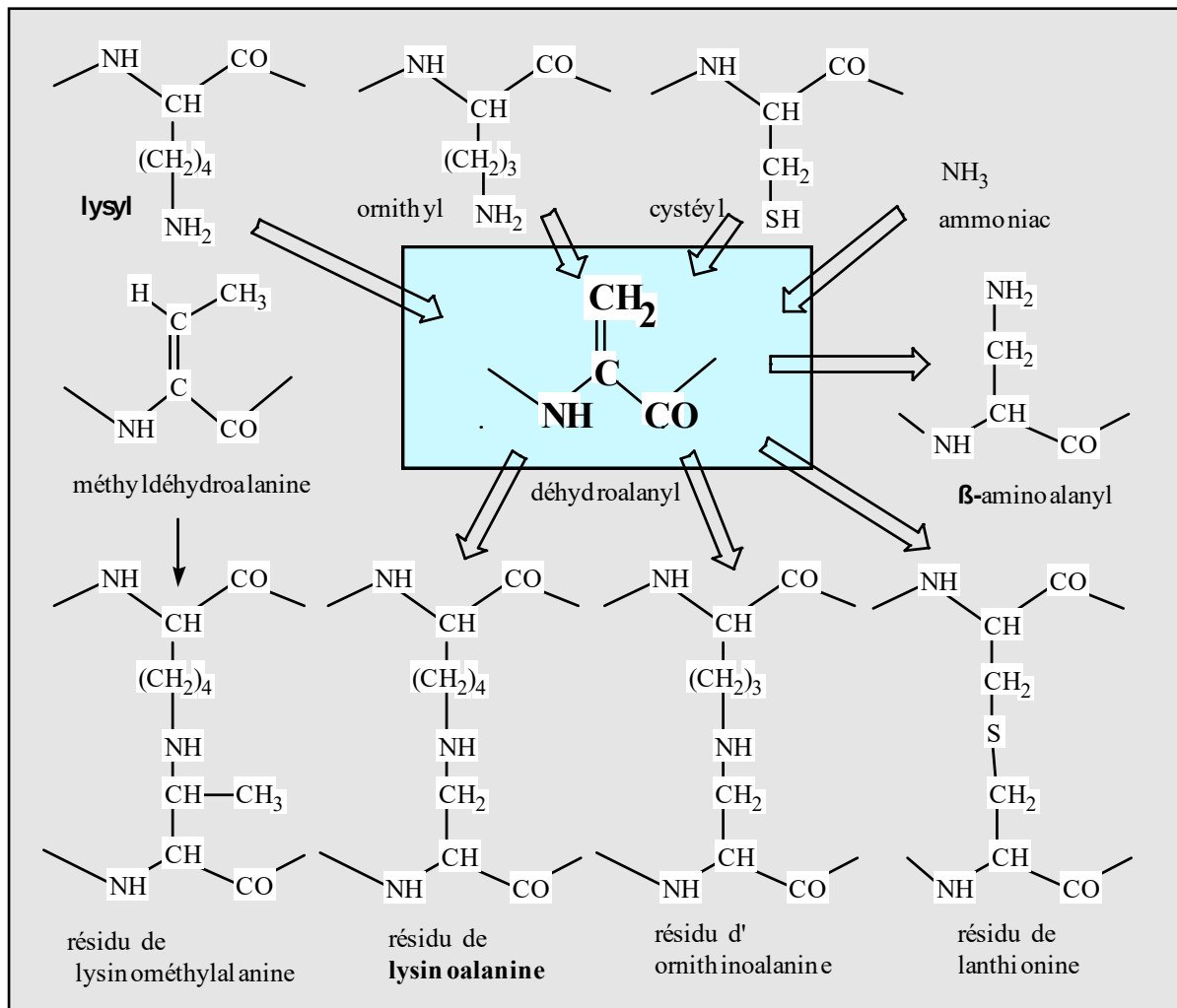


Figure 148. Formation de ponts covalents de type lysinoalanine, lysinométhylalanine, ornithinoalanine et lanthionine dans les protéines soumises à des traitements alcalins et/ou thermiques.

Les principaux aliments dans lesquels des taux importants de lysinoalanine ont été mesurés sont les tortillas préparées à partir de maïs, les extraits de levure, les concentrés protéiques de poisson, les caséinates et les aliments soumis à des traitements thermiques. Dans ce dernier cas, la teneur en lysinoalanine est souvent comprise entre 10 et 100 mg / 100 g de protéine et atteint des valeurs plus élevées dans certains agents moussants.

Les incidences nutritionnelles et toxicologiques de la formation de lysinoalanine ont fait l'objet de nombreux travaux. Cette formation ne peut néanmoins être dissociée d'un ensemble de modifications biochimiques liées au traitement. Ainsi, globalement, il apparaît que les protéines ont un coefficient d'efficacité protéique, une utilisation protéique nette et parfois une valeur biologique d'autant plus faibles que la sévérité du traitement alcalin auquel elles ont été soumises est importante. Cette diminution de la valeur nutritionnelle résulte surtout :

- de la destruction de la cystéine, de la cystine, de la lysine et à un degré moindre de la thréonine et de l'isoleucine.
- de l'isomérisation des résidus d'acides aminés avec diminution de digestibilité et perte de potentialité nutritive pour certains résidus D.
- d'une baisse de digestibilité liée à la formation de ponts covalents parmi lesquels la lysinoalanine est prédominante en raison de la structure initiale de la plupart des protéines.
- de la toxicité de dérivés formés dont la lysinoalanine. En effet cet acide aminé s'avère néphrotoxique pour le rat chez qui il induit une néphrocytomégalie et une néphrocalcinose. Aucun effet de ce type n'est cependant observé chez d'autres animaux comme la souris, le hamster, le lapin,

le chien ou le singe. La lysinoalanine absorbée est en grande partie éliminée dans l'urine, les reins étant capables de l'hydrolyser avec libération de lysine.

- du pouvoir complexant de la lysinoalanine vis à vis d'oligoéléments comme le cuivre ou le cobalt dont l'absorption serait alors diminuée.

La formation d'autres ponts covalents comme la lanthionine, la lysinométhylalanine ou l'ornithinoalanine contribue également à la diminution de la digestibilité des protéines et à la baisse de disponibilité de la cystéine ou de la cystine.

Bien qu'il soit probable que la lysinoalanine n'ait pas d'effet direct sur l'homme, il faut néanmoins veiller à ce que les traitements technologiques appliqués à nos aliments protéiques n'engendrent pas sa formation.

XX.6. INTERACTIONS PROTEINES / AUTRES COMPOSANTS ALIMENTAIRES.

En raison de la composition très variée de nos aliments, ces interactions sont nombreuses et très fréquentes. Les réactions entre protéines et glucides réducteurs ou **réaction de Maillard** ou encore réactions de brunissement non-enzymatique sont celles qui sont le plus souvent rencontrées dans nos aliments. D'innombrables travaux leur ont été consacrées et les revues générales et ouvrages traitant de cette réaction sont très nombreux. Les réactions entre protéines et lipides ne jouent un rôle important au plan nutritionnel que si des dérivés d'oxydation des lipides sont présents ; dans ce cas les modifications souvent très défavorables des qualités organoleptiques rendent le produit difficile à consommer. Les interactions entre protéines et polyphénols jouent un rôle important dans de nombreux produits d'origine végétale. Les interactions protéines composants d'arôme, protéines colorants, peuvent contribuer à la modification des qualités organoleptiques du produit alimentaire dans lequel elles se produisent.

XX.6.1. Interactions protéines - glucides réducteurs. La réaction de Maillard.

Les réactions entre protéines et glucides réducteurs sont à l'origine des dommages les plus fréquemment subis par nos protéines alimentaires.

De telles réactions se produisent au cours de l'entreposage ou des traitements technologiques d'aliments qui renferment des glucides réducteurs (ou des composés carbonylés comme l'acide ascorbique ou certains des dérivés d'oxydation des lipides). La chaleur accélérant la vitesse de ces réactions, ces phénomènes apparaissent nettement lors de traitements thermiques comme les opérations de cuisson (pain biscuits, etc), de stérilisation de produits riches en protéines (viandes, poissons etc.) et plus particulièrement quand des produits d'origine végétale (glucides réducteurs apportés par les légumes) sont présents ou quand l'activité de l'eau est comprise entre 0,4 et 0,7.

Cette réaction est importante quand la concentration dans l'aliment des protéines et des glucides réducteurs est élevée (lait par exemple). Contrôlées, ces réactions génèrent des couleurs et des composants d'arômes souvent jugés très favorablement par le consommateur.

Cette réaction se produit dans les aliments entre des composés possédant des fonctions amine primaire (α NH₂ terminal, α NH₂ des acides aminés libres, ϵ NH₂ de la chaîne latérale des résidus de lysine) et des composés carbonylés (glucides réducteurs, aldéhydes et cétones apparaissant au cours de l'oxydation des lipides, acide ascorbique, composés d'arôme par exemple).

a) Les principales étapes de la réaction de Maillard

Schématiquement, la réaction de Maillard peut être divisée en trois étapes (figure 149).

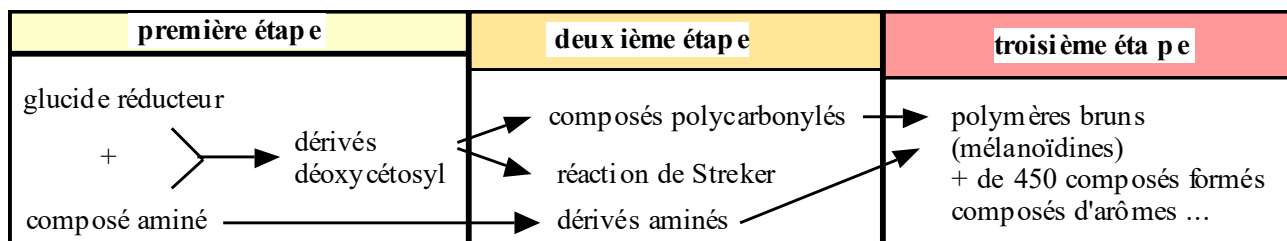


Figure 149. Schéma des principales étapes de la réaction de Maillard

Au cours de la **première étape**, il se forme une base de Schiff instable qui s'isomérise, selon la nature du glucide, en aldosylamine ou en cétosylamine. Par réarrangement d'Amadori ou de Heyns, ces glycosylamines se transforment en cétoamines ou en aldosaamines (figure 150). Ces produits peu ou pas colorés sont bien caractérisés.

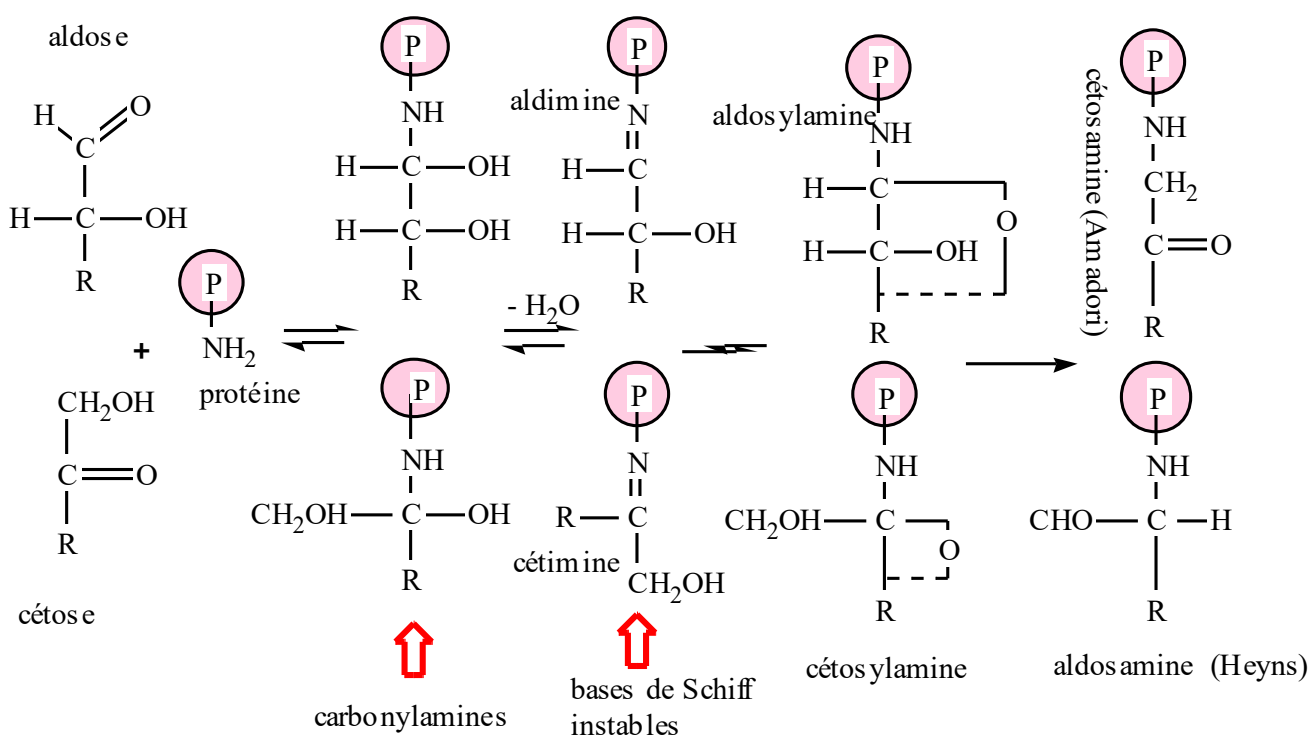


Figure 150. La première étape de la réaction de Maillard

Le produit d'Amadori (désoxycétosyl-lysine) est la forme de lysine εN-substituée la plus abondante après cette première étape de la réaction de Maillard.

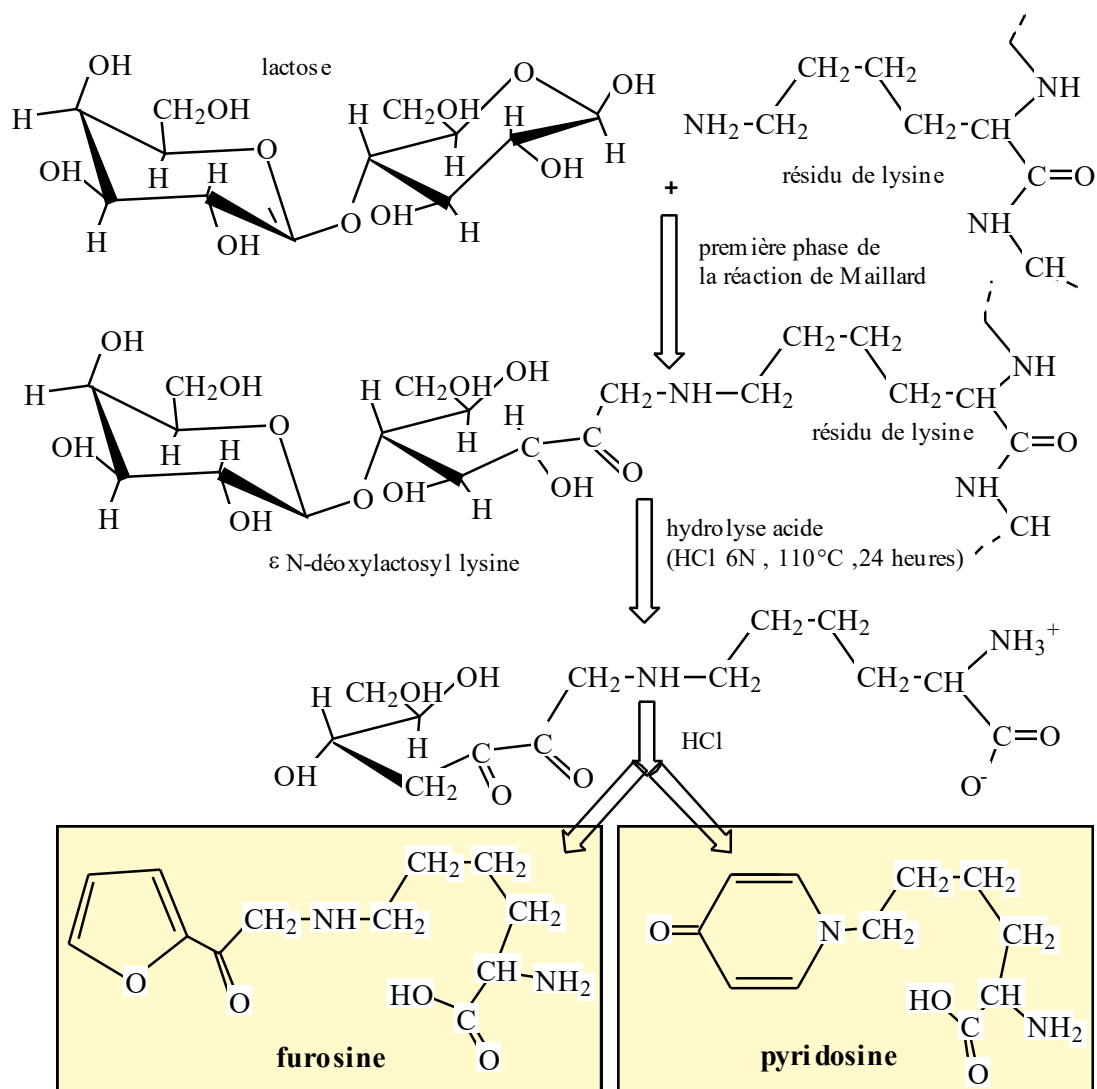


Figure 151. Formation de pyridosine et de furosine au cours de l'hydrolyse acide d' ϵ -N-(1-déoxylactulosyl)-lysine, dérivé d'Amadori des résidus de lysine et du lactose.

Ainsi la ϵ -N-(1-déoxylactulosyl)-lysine qui est le dérivé d'Amadori obtenu à partir de lysine et de lactose, représente plus de 70 % des composés de Maillard présents dans les laits chauffés (figure 150). La lysine n'est plus biologiquement disponible sous cette forme. Les cétoamines et les aldosaamines donnent, après hydrolyse acide, des dérivés bien identifiables par analyse chromatographique.

Ainsi l' ϵ -N-(1-déoxylactulosyl)-lysine donne dans ces conditions de la **pyridosine** et de la **furosine** (figure 151). Aujourd'hui, c'est le dosage de ces composés qui permet d'estimer le niveau de la réaction de Maillard dans un produit chauffé.

La **deuxième étape** de cette réaction très complexe conduit à la formation, à partir des produits d'Amadori ou de Heyns, à des composés colorés qualifiés de prémélanoïdines. Ce sont des réactions de rupture de liaisons et de deshydratation qui, par deux voies principales, conduisent à des dérivés polycarbonylés dont la polymérisation donne des produits complexes colorés en jaune-brun (figure 152).

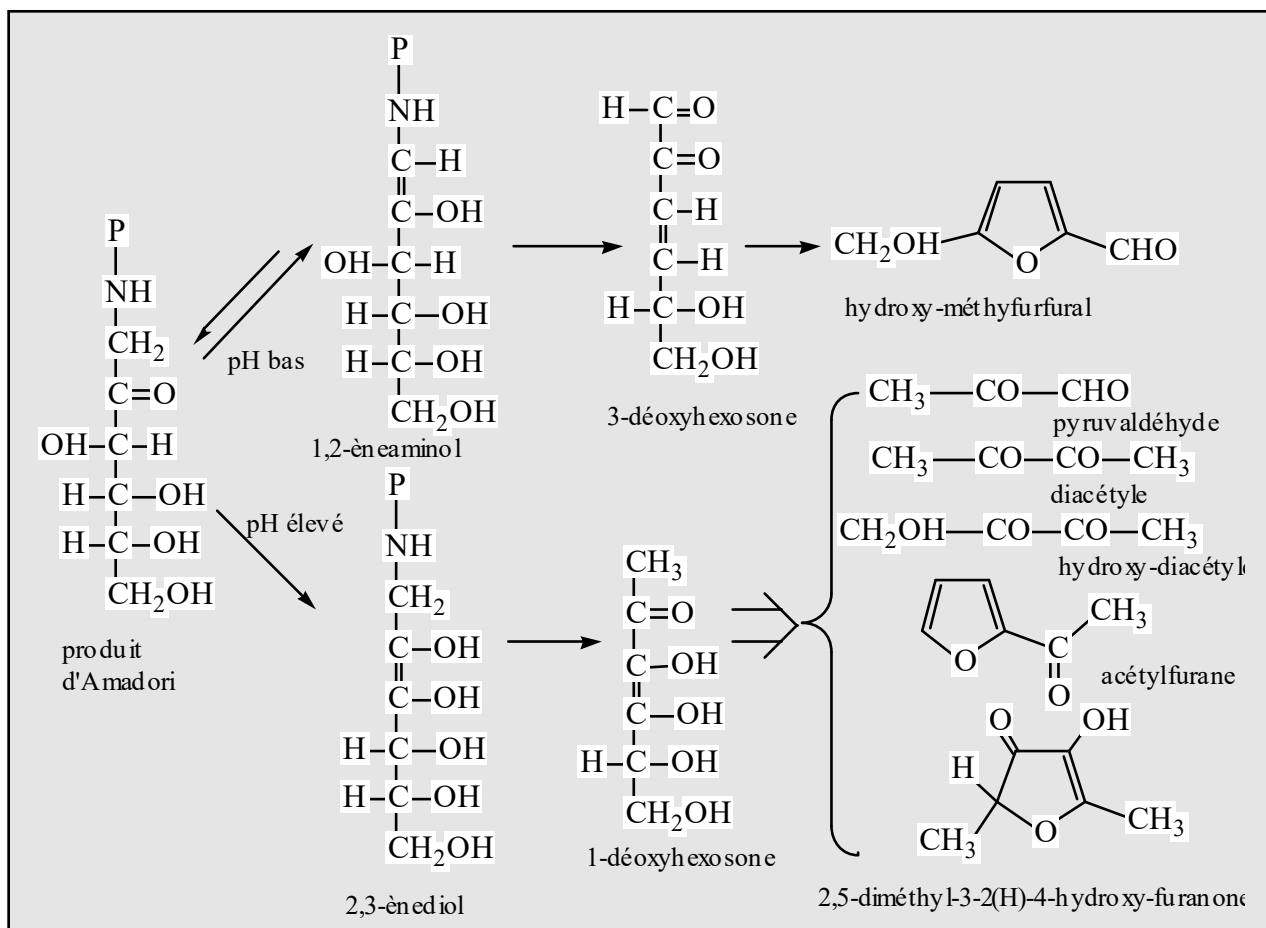


Figure 152. Décomposition des produits d'Amadori (selon HODGE)

Certains des dérivés α - β -dicarbonylés obtenus réagissent avec les groupements amines encore présents (α - NH_2 des acides aminés par exemple). Les nouveaux dérivés aminocarbonylés formés sont susceptibles de se condenser et de donner des produits bruns ou à saveur caractéristique. Cette réaction est qualifiée de dégradation de Strecker (figure 153).

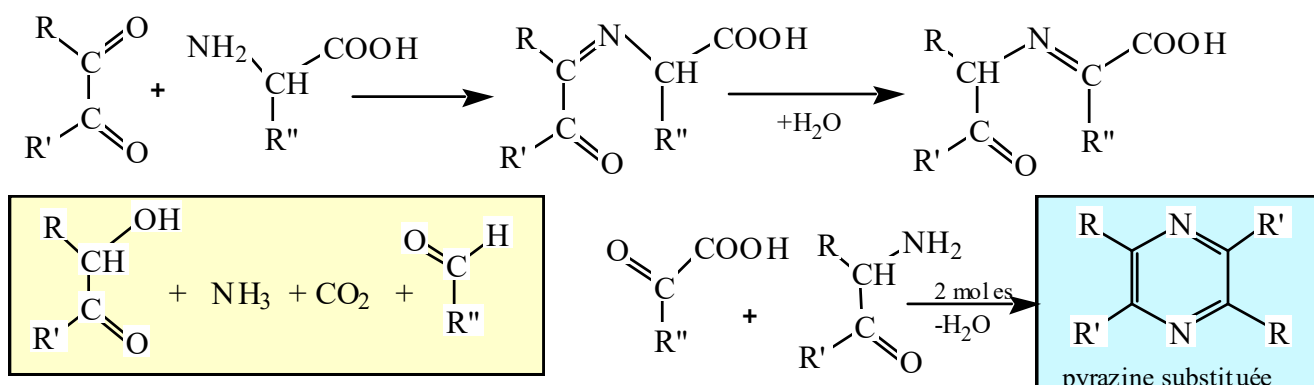


Figure 153. La dégradation de Strecker et la formation de pyrazine.

C'est cette deuxième étape très complexe qui est à l'origine d'une part de la formation de composés colorés en brun (prémélanoïdines) qui contiennent pour la plupart des atomes d'azote et d'autre part de la genèse de composés carbonylés et/ou hétérocycliques (diacétyle, acétaldéhyde, pyruvaldéhyde, pyrazines, pyrroles etc.) qui sont à l'origine de l'arôme de "grillé" des aliments soumis à des

traitements thermiques. Plusieurs centaines de composés d'arômes générés par ces réactions sont actuellement bien identifiés.

Certains des composés polycarbonylés formés au cours de cette étape sont susceptibles de jouer, en présence de protéines, le rôle d'agents de pontage avec comme conséquences principales d'une part une diminution de la disponibilité de la lysine impliquée dans ces ponts et d'autre part une baisse de digestibilité.

La **troisième étape** correspond à la formation de polymères bruns (mélanoïdines) de masse molaire variable. Dans cette étape particulièrement complexe sont impliqués les divers composés formés au cours des deux autres étapes. Par exemple, la réaction du seul hydroxyméthyl furfural avec un acide aminé donne un intermédiaire jaune dont la structure est indiquée sur la figure 154.

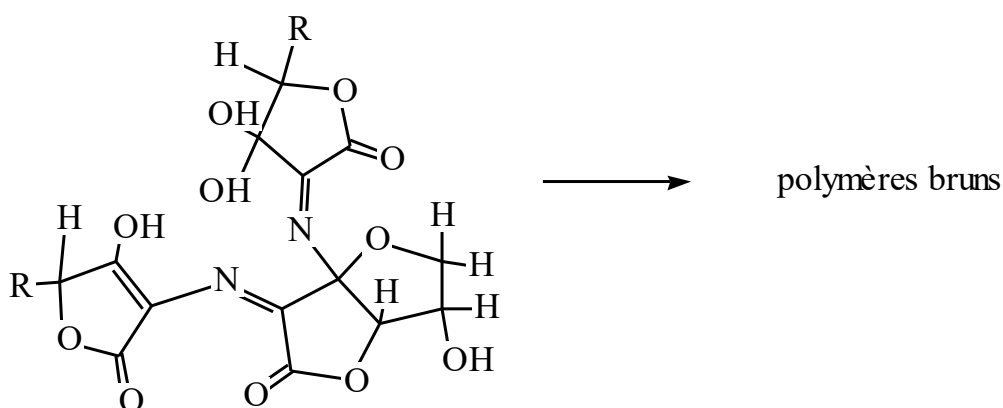


figure 154. Structure d'un composé coloré jaune précurseur de la formation de mélanoïdine.s

b) Conséquences nutritionnelles et toxicologiques de la réaction de Maillard.

Dès la fin de la première étape, il apparaît que la **lysine** impliquée par son ϵ -NH₂ à la réaction, n'est plus biologiquement disponible. Le déoxycétosyl- ϵ N-lysine libre est bien absorbé par le rat et excrété à plus de 65 % dans l'urine. Ce même dérivé présent dans une protéine (déoxycétosyl- ϵ N-lysyl) n'est que faiblement libéré au cours de la protéolyse *in vivo* et la partie absorbée est excrétée en majorité dans l'urine; la partie non absorbée est catabolisée par la microflore intestinale.

D'autres acides aminés comme la cystine, le tryptophane ou la cystéine sont capables de réagir avec les composés polycarbonylés et par voie de conséquence sont plus ou moins partiellement affectés par cette réaction.

Les modifications de résidus d'acides aminés reconnus par les protéases comme sites d'hydrolyse et les changements de conformation associés à la formation de nombreux ponts covalents diminuent d'autant plus la digestibilité de la protéine impliquée dans une réaction de Maillard que cette dernière est intense.

Les prémélanoïdines sont partiellement absorbées et métabolisées. Certaines d'entre elles ont des propriétés antinutritionnelles (inhibition d'enzymes digestives, hypertrophies hépatique, rénale et ceacale). Les mélanoïdines qui ont des masses molaires plus élevées ne sont pratiquement pas absorbées au niveau intestinal et leurs effets sont considérés comme minimes.

Signalons enfin que certains auteurs ont récemment montré que des substances à faible effet mutagène se forment au cours de la réaction de Maillard.

c) Evaluation de la disponibilité des résidus de lysine après réaction de Maillard.

La lysine est parmi les acides aminés protéiques le meilleur indicateur de la réaction de Maillard. L'évaluation par des méthodes chimiques de la réactivité de la lysine permet généralement une bonne estimation de la disponibilité de l'acide aminé.

Parmi les nombreuses méthodes chimiques existantes, celle de CARPENTER (1960,1973) au 1-fluoro-2,4-dinitro-benzène est la plus connue tandis que la méthode par fixation de colorant présente l'avantage de sa rapidité. Il existe aussi des méthodes microbiologiques ou physiques d'évaluation de la lysine "disponible".

d) Importance de la réaction de Maillard dans les protéines alimentaires

Parmi les très nombreux traitements technologiques appliqués à nos aliments, ce sont les traitements thermiques qui sont les plus fréquents (cuisson, blanchiment, pasteurisation, stérilisation, séchage etc.). Les aliments soumis à une cuisson domestique en milieu aqueux (chauffages conventionnels ou microondes) et la plupart des conserves industrielles ne subissent que peu les effets défavorables de la réaction de Maillard.

Des effets défavorables significatifs apparaissent sur la la disponibilité de la lysine quand les traitements thermiques (ou l'entreposage) sont réalisés sur des produits alimentaires à humidité relative comprise entre 0,4 et 0,7 (croûte du pain) et quand l'aliment contient à la fois des protéines et des glucides réducteurs (lait par exemple).

Des additifs comme les sulfites sont à même de ralentir voire même d'inhiber la réaction de Maillard.

XX.6.2. Interactions protéines - lipides.

Ces interactions sont multiples et complexes. En raison de leur caractère apolaire, la plupart des lipides donnent des interactions hydrophobes avec les protéines et plus particulièrement au niveau des zones protéiques dont la densité en chaînes latérales d'acides aminés apolaires (tryptophane, phénylalanine, leucine, isoleucine, valine, alanine) est élevée. Ce type d'interaction qui est mis à profit avec certaines protéines jouant le rôle d'émulsifiant ne semble pas avoir pas d' incidence nutritionnelle défavorable. Certains composés amphipolaires (sels d'acides gras, dodécylsulfate de sodium et de nombreux agents émulsifiants) donnent de fortes interactions hydrophobes avec les zones apolaires des protéines et par leur partie hydrophile des interactions avec l'eau solvante, ce qui contribue à la solubilisation.

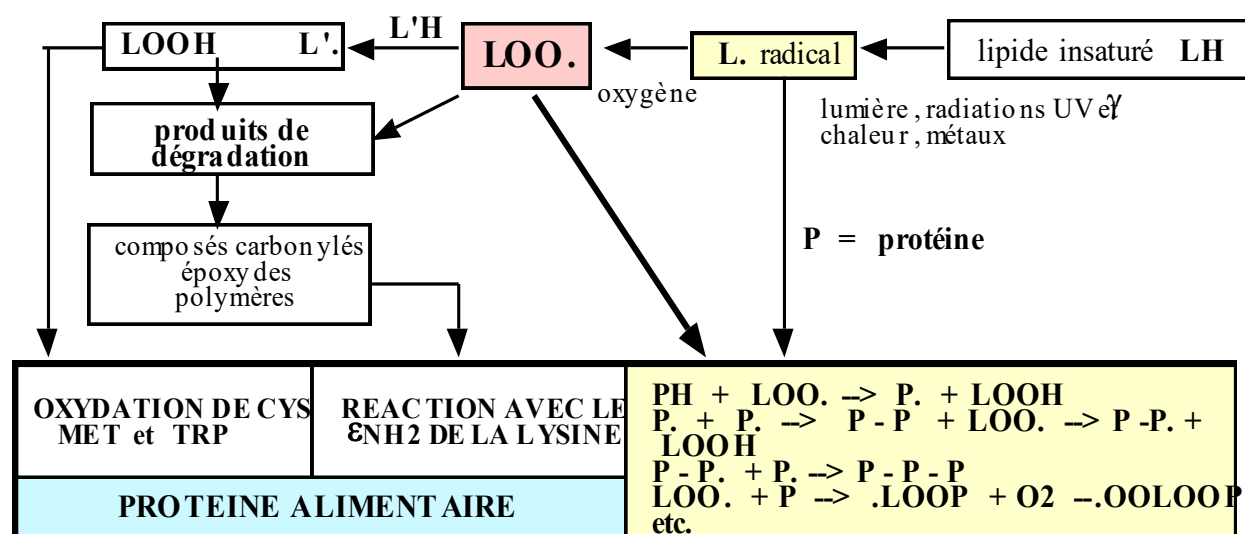


Figure 155. Principales conséquences de l'oxydation des lipides sur les protéines

Des effets défavorables du contact protéines - lipides apparaissent lorsque des phénomènes d'oxydation interviennent. Ceux-ci génèrent souvent des odeurs et des saveurs désagréables à partir des lipides insaturés qui rendent alors l'aliment, et par voie de conséquence les protéines qu'il contient, difficilement consommables.

Par ailleurs, ces phénomènes d'oxydation des lipides peuvent être accompagnés de la formation de ponts covalents intra et interprotéiques ou encore de l'oxydation des acides aminés soufrés et du tryptophane et de l'indisponibilisation de la lysine, ce qui a des conséquences défavorables sur la qualité nutritionnelle.

Les phénomènes d'oxydation des lipides sont complexes et leurs incidences sur les protéines nombreuses ont fait l'objet de nombreux travaux. Les principales interactions protéines - lipides en voie d'oxydation sont schématisées sur la figure 155. L'oxydation des acides gras insaturés conduit d'abord à la formation de radicaux libres LOO. , L. et d'hydroperoxydes. Ces derniers sont des oxydants actifs sur le tryptophane, la méthionine et la cystéine avec formation respective pour ces deux derniers résidus d'acides aminés de méthionine sulfoxyde et d'acides cystéine sulfénique, sulfinique et sulfénique. Par ailleurs les dérivés carbonylés résultant de la décomposition des hydroperoxydes et des radicaux libres oxygénés peuvent réagir avec les fonctions ϵ NH₂ des résidus de lysine dans une réaction dont le mécanisme est similaire à celui de la réaction de Maillard. L'acroléine formée dans cette étape peut réagir avec les fonctions thiol des résidus de cystéine. Enfin, les radicaux libres protéiques générés par contact avec des radicaux libres d'origine lipidique sont susceptibles de réagir entre eux. Il se forme alors des polymères protéiques.

La phase radicalaire de ces réactions se produit rapidement, le maximum de radicaux libres évalués par ESR se situant une dizaine d'heures après l'initiation. C'est au cours de cette phase que se produisent les oxydations des résidus d'acides aminés. Ce n'est qu'après plusieurs jours que la réaction du type "carbonylamine" intervient, la lysine étant alors particulièrement affectée.

Ces diverses réactions qui se produisent le plus souvent au cours de l'entreposage ont des conséquences défavorables sur la valeur nutritionnelle des protéines. La digestibilité est abaissée d'une part par formation de ponts intra et interprotéiques et d'autre part par modification des acides aminés sites d'hydrolyse. La digestibilité *in vitro* est également abaissée. Par ailleurs ces réactions s'accompagnent d'une diminution de la disponibilité de la méthionine, de la cyst(é)ine et de la lysine.

XX.6.3. Interactions protéines - polyphénols.

Plus de 2000 substances polyphénoliques parmi lesquelles des acides phénoliques, des anthocyanes, des flavones et des tannins sont identifiées dans le règne végétal et des dérivés de l'acide cinnamique comme l'acide caféique et l'acide chlorogénique sont souvent présents dans des végétaux aliments. En présence d'oxygène ces dérivés s'oxydent soit en milieu alcalin soit à des pH proches de la neutralité en présence de polyphénoloxydase. Les o-quinones qui se forment dans ces conditions sont très réactives et se polymérisent par voie non enzymatique pour donner des pigments bruns de masses molaires très élevées (figure 130). Ces réactions correspondent au brunissement enzymatique observé dans de nombreux fruits et légumes.

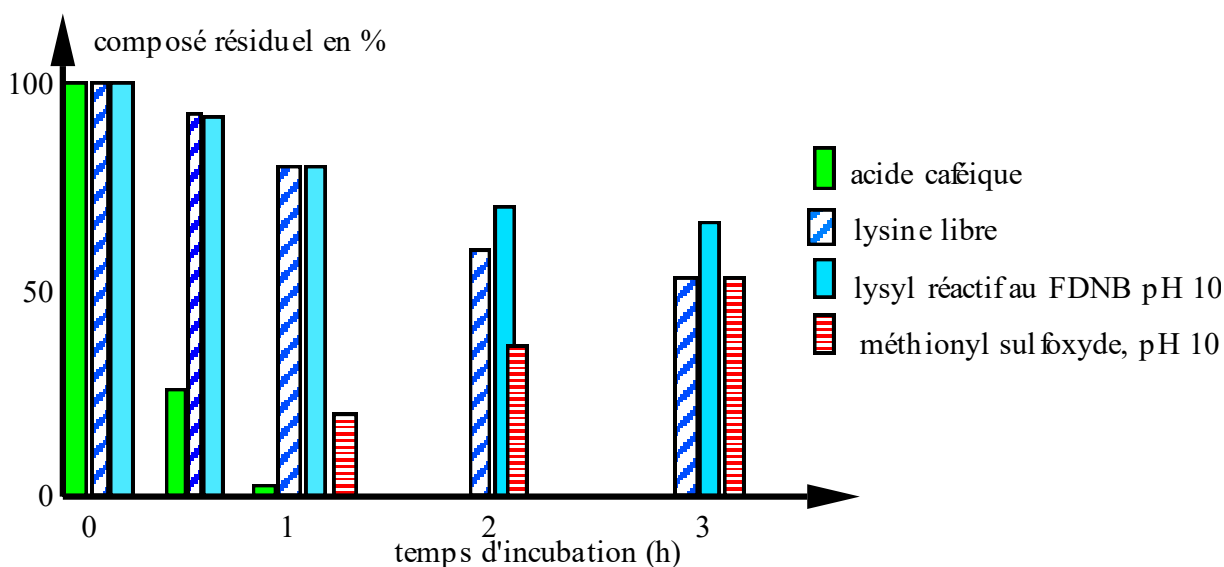


Figure 156. Variations des teneurs en acide caféique, en méthionyl sulfoxyde, en lysine et en lysyl réactif au FDNB (incubés en présence d'acide caféique) en fonction du temps (à pH 10, température ambiante, sous oxygène).

Les technologies de purification de protéines à partir de feuilles ou de certaines graines riches en polyphénols comme le tournesol conduisent à l'obtention de produits colorés en brun. Les incidences biochimiques et nutritionnelles de cette réaction ont été étudiées à partir de systèmes modèles acide caféique, lysine - acide caféique et caséine-acide caféique incubés sous oxygène en milieu alcalin (pH=10) ou à pH 7 en présence de polyphénoloxydase. L'incubation de l'acide caféique à pH 10 sous oxygène se traduit par une oxydation rapide. Quand de la lysine libre ou résiduelle (caséine) est associée à cet acide polyphénolique en cours d'oxydation, elle subit des modifications affectant en particulier l' ϵ -NH₂ (figure 156).

Des oxydations des résidus de méthionine de la caséine en résidus de méthionine sulfoxyde apparaissent au cours du contact protéine - acide caféique à pH 7 en présence d'enzyme mais surtout à pH 10.

En présence de polyphénoloxydase, la perte la plus élevée en lysine disponible dans la caséine est observée à pH 7 c'est à dire au pH optimum d'activité de l'enzyme. Ces conditions sont souvent observées dans les technologies de fractionnement des protéines à partir de produits végétaux (broyage, solubilisation à pH alcalin etc). Cependant, l'indisponibilisation des résidus de lysine est plus importante à pH 10 qu'à pH 7 en présence de polyphénoloxydase.

Ce phénomène semble lié à l'ionisation des groupements ϵ NH₂ qui ne se condensent avec les quinones que sous leur forme déprotonée. Par ailleurs deux voies de condensation avec les quinones seraient possible en milieu alcalin, la première impliquant la formation d'un carbocation à partir de la quinone et la seconde correspondant à la formation d'une quinonimine (figure 157).

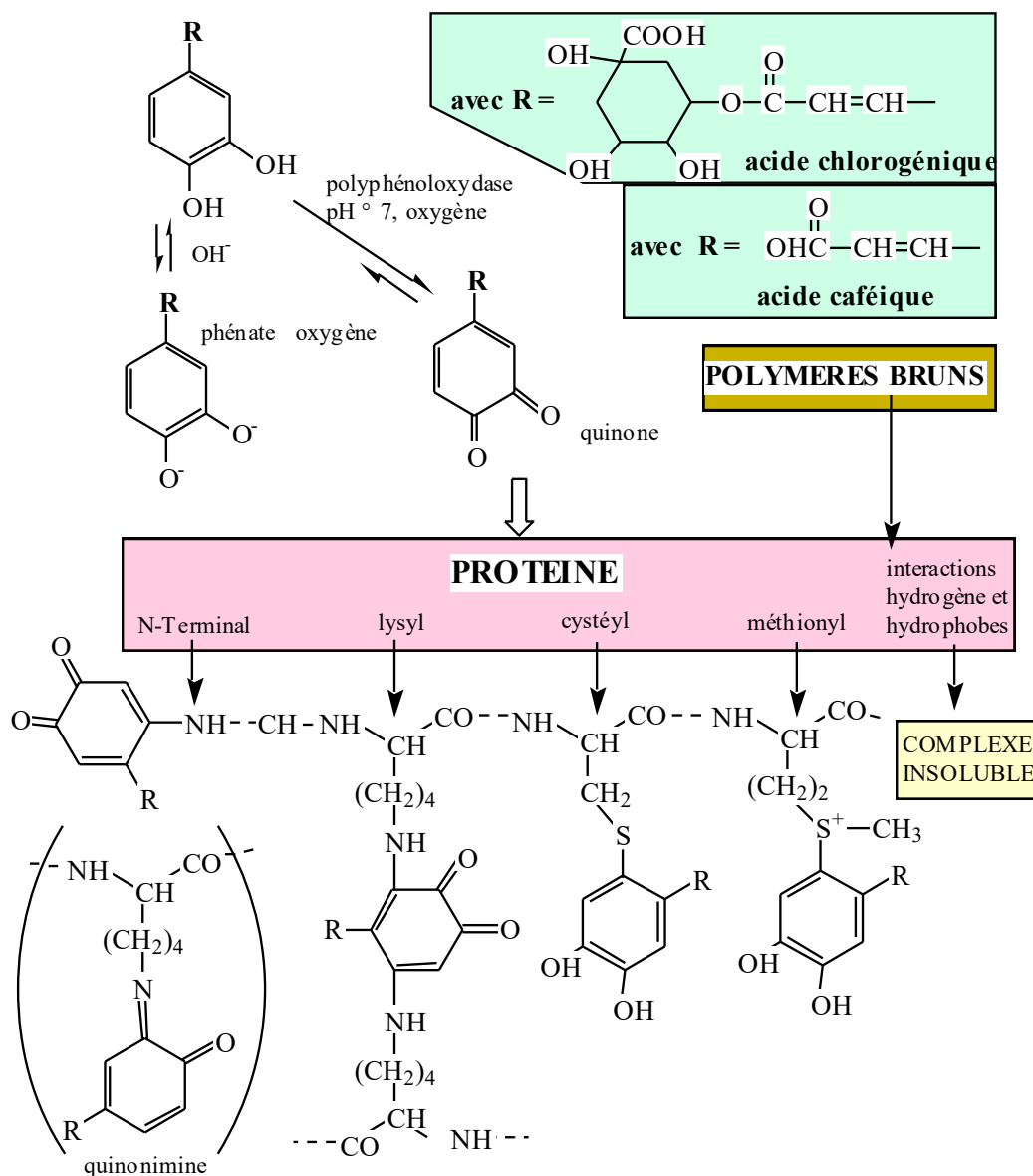


Figure 157. Interactions protéines polyphénols .Principales voies réactionnelles

Avec le gossypol qui est un polyphénol présent dans les graines de coton, l'interaction avec la lysine se produirait au niveau de la fonction aldéhydique de la molécule avec formation d'un dérivé quinonimique (figure 158).

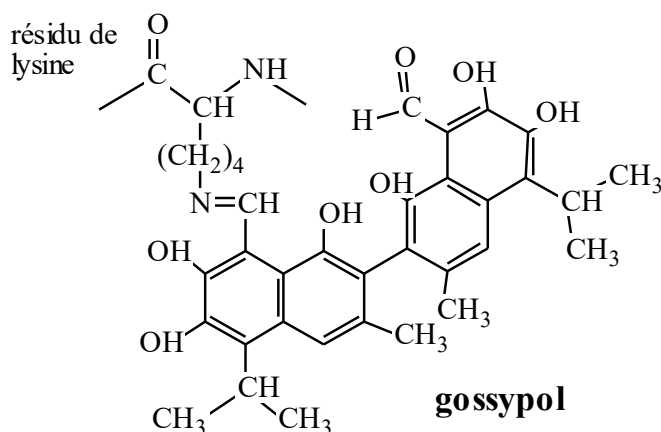


Figure 158. Interaction gossypol -résidu de lysine dans les protéines de coton.

Les incidences nutritionnelles du contact protéines - polyphénols en cours d'oxydation se situent essentiellement au niveau de la baisse de disponibilité de la lysine et à un degré moindre de celle de la méthionine et du tryptophane. L'ingestion de caséine- ^3H -lysyl préalablement incubée en présence d'acide caféique se traduit, chez le rat, par une élimination fécale importante de complexes "lysine-polyphénol" (figure 159), ce qui montre que ces complexes ne sont pas absorbés.

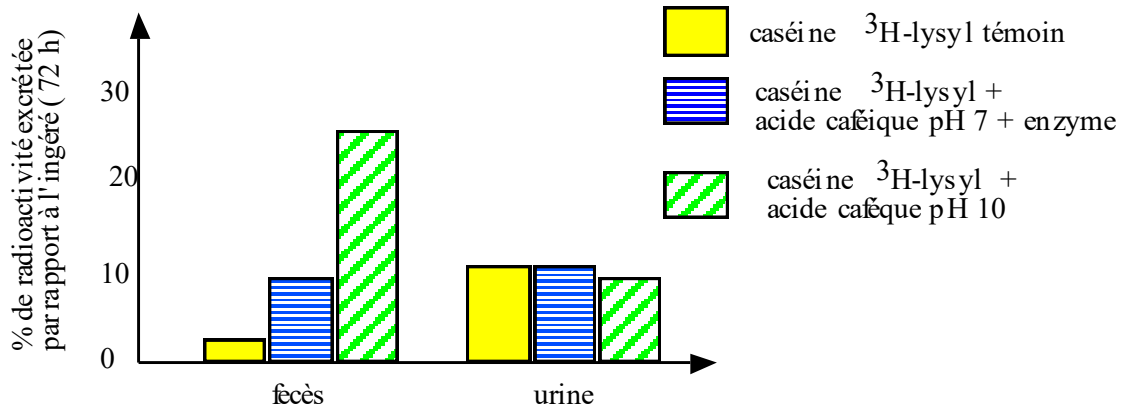


Figure 159. Transit métabolique de ^3H -lysyl-caséine incubée en présence d'acide caféique.

Il apparaît donc que l'extraction des protéines à partir de végétaux en milieu alcalin conduit à la formation, par oxydation directe, de caféoquinone ou de chlorogénoquinone qui réagissent avec les résidus de lysine des protéines. Il en résulte alors, comme observé à partir de préparations protéiques obtenues à partir de graines de tournesol riches en acide chlorogénique, une perte significative de disponibilité de la lysine.

XX.7. MODIFICATIONS DES PROTEINES AU CONTACT D'ADDITIFS OU DE DIVERS COMPOSES.

XX.7.1. Effets des traitements oxydants.

Il existe de nombreux traitements technologiques alimentaires qui peuvent être qualifiés d'oxydants. Ainsi les traitements thermiques réalisés à l'air et à chaud (atomisation par exemple), les traitements qui font appel à des composés comme le peroxyde d'hydrogène ou l'hypochlorite de sodium, le contact avec des lipides ou des polyphénols en voie d'oxydation, l'irradiation γ et certaines réactions photocatalysées ont des effets oxydants sur les chaînes latérales de certains résidus d'acides aminés.

Le peroxyde d'hydrogène est utilisé comme agent décolorant, pour détoxifier des produits contaminés par l'aflatoxine ou contenant des facteurs antinutritionnels et pour ses propriétés microbicides qui permettent en particulier la stérilisation d'emballage alimentaires.

L'hypochlorite de sodium est largement utilisé pour ses propriétés désinfectantes et détoxifiantes. Les réactions de photooxydation sont fréquentes dans certains de nos aliments et induisent des pertes en méthionine et en tryptophane.

a) Oxydation de la méthionine.

La méthionine est facilement oxydable en méthionine sulfoxyde et plus rarement, dans des conditions drastiques, en méthionine sulfone (figure 160). Le soufre du méthionine sulfoxyde présente une asymétrie qui donne deux isomères d et l.

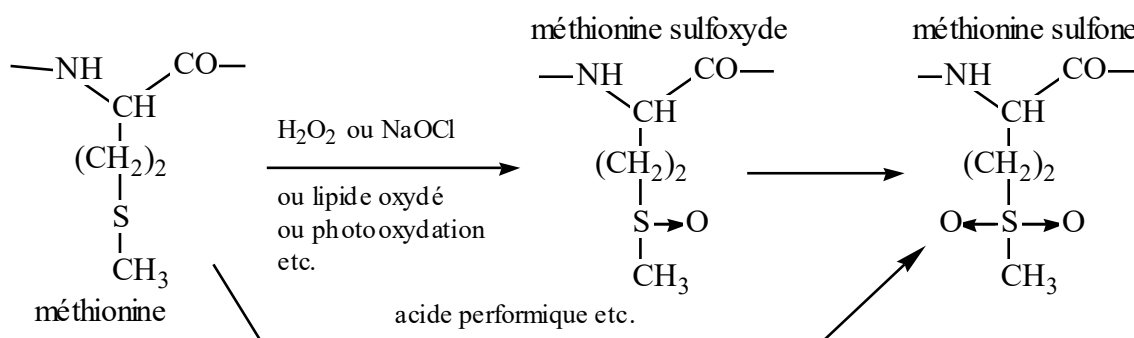


Figure 160. La méthionine et ses dérivés d'oxydation

La vitesse d'oxydation de la méthionine est élevée et dépend surtout de la concentration en agent oxydant et de la température. Ainsi le traitement par du peroxyde d'hydrogène de méthionine libre (dont la concentration est suivie par HPLC) et de caséine (dont la concentration en résidu de méthionine sulfoxyde est évaluée après hydrolyse alcaline et analyse chromatographique) conduit à une oxydation rapide de méthionine avec formation de sulfoxyde (figure 161).

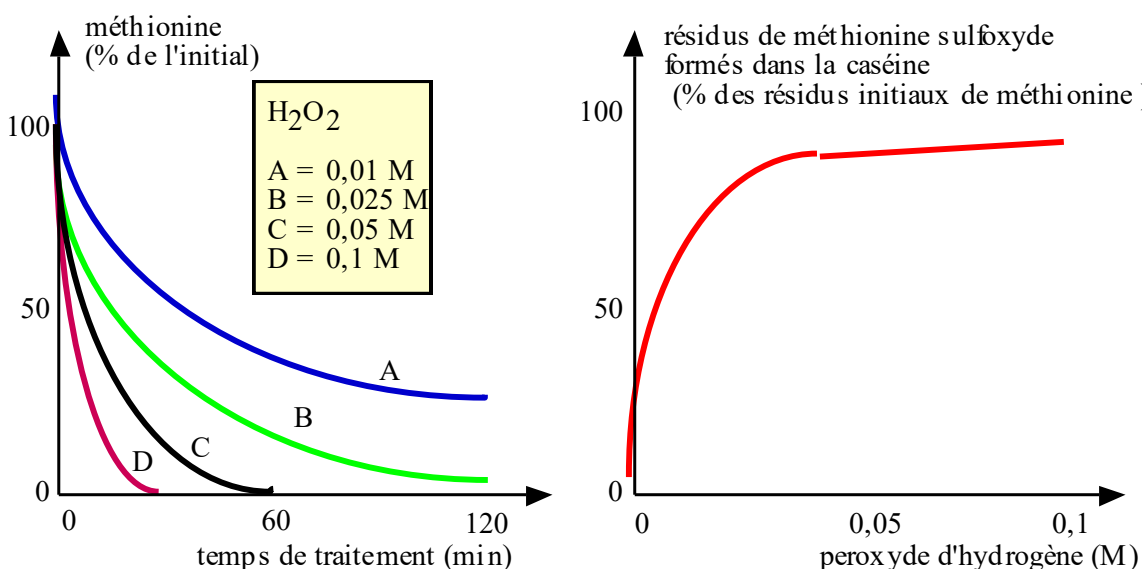


Figure 161. Oxydation de la méthionine ou des résidus de méthionine de la caséine en présence de peroxyde d'hydrogène ($pH = 8$, $50^\circ C$).

Le contact entre protéines et polyphénols d'origine végétale en cours d'oxydation, qui se traduit entre autre par la formation de peroxyde d'hydrogène, oxyde la méthionine en son sulfoxyde.

Le méthionine sulfoxyde libre ou les résidus de méthionine sulfoxyde sont utilisables par le rat comme sources de méthionine. Des études métaboliques montrent que le méthionine sulfoxyde est absorbé et réduit en méthionine par des enzymes hépatiques et rénales. Si la présence de ce dérivé d'oxydation est fréquente dans nos aliments et ne se traduit pas par des modifications nutritionnelles importantes, sa consommation induit quelques modifications physiologiques. Ainsi, chez des animaux nourris avec de la caséine dans laquelle tous les résidus de méthionine sont oxydés en sulfoxyde, la concentration plasmatique et musculaire de ce dérivé est beaucoup plus importante que celle mesurée chez des animaux témoins.

La méthionine sulfone, rarement formée au cours de traitements technologiques alimentaires, n'est pas utilisable comme source de méthionine par le rat et présente une certaine toxicité.

b) Oxydation de la cyst(é)ine.

L'oxydation de ces acides aminés soufrés conduit à des dérivés nombreux dont la présence dans nos aliments est difficile à détecter par des méthodes analytiques conventionnelles. FINLEY et al. (1981) n'a détecté par RMN que quatre composés d'oxydation dans un système modèle composé de glutathion et d'agent oxydant alors que le nombre de composés potentiels susceptibles de se former est plus élevé (figure 162).

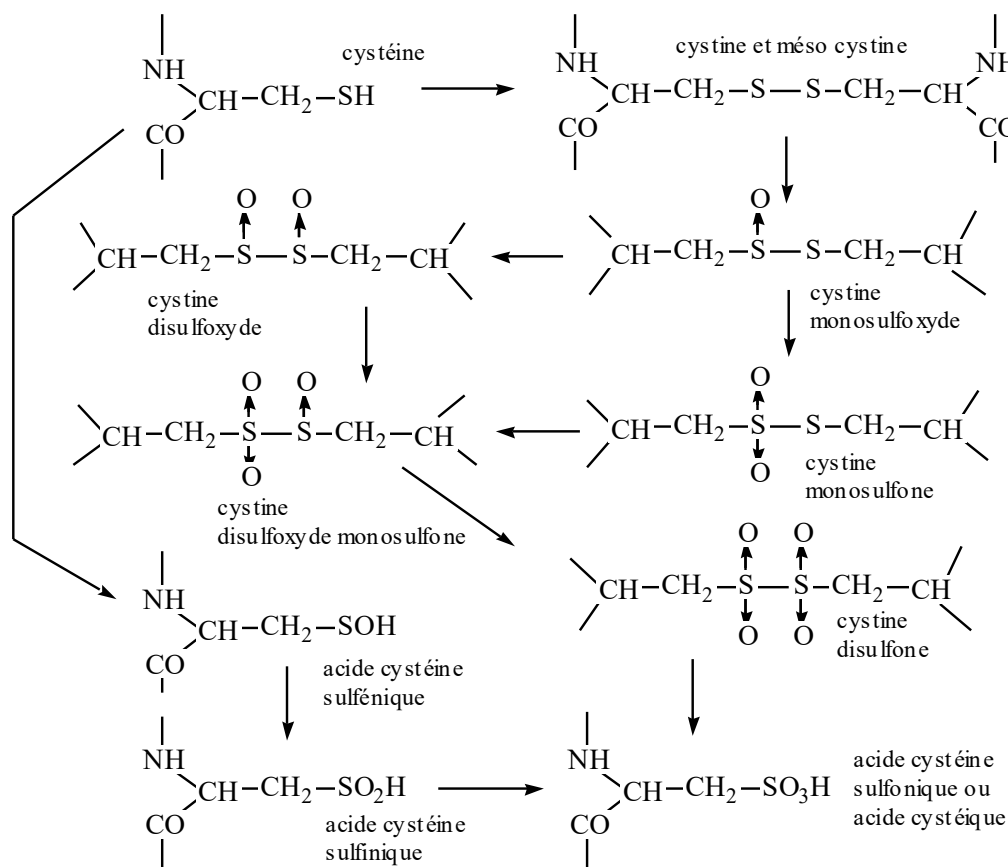


Figure 135. Dérivés d'oxydation potentiels de la cystéine et de la cystine

L'asymétrie de l'atome de soufre permet de plus d'envisager de nombreux isomères (mésos avec la cystine, D ou L avec les dérivés sulfoxyde).

Certains de ces dérivés comme la cystine monosulfoxyde et la cystine disulfone peuvent subir une réaction de β -élimination conduisant à la formation de déhydroalanine avec toutes les conséquences que cela engendre quant à la qualité nutritionnelle. Il n'est pas exclu que la formation de lysinoalanine au cours de la cuisson domestique ou industrielle de nos aliments corresponde à ce mécanisme.

Il n'existe que peu d'informations quant à la valeur nutritionnelle des dérivés d'oxydation de la cyst(é)ine. L'acide cystéique et l'acide cystéine sulfinique sont inutilisables comme sources de cyst(é)ine chez le rat tandis que la cystine monosulfone semble partiellement utilisable.

c) Oxydation du tryptophane.

Les dérivés d'oxydation du tryptophane sont nombreux (figure 163). Parmi ceux-ci il est possible de signaler ceux qui résultent d'un clivage entre le C2 et le C3 du noyau indolique (N-formylcynurénine et son dérivé déformylé) et ceux qui résultent d'une oxydation sur le carbone 2 (β -oxindolylalanine).

La vitesse d'oxydation du tryptophane par le peroxyde d'hydrogène est beaucoup plus lente que celle de la méthionine.

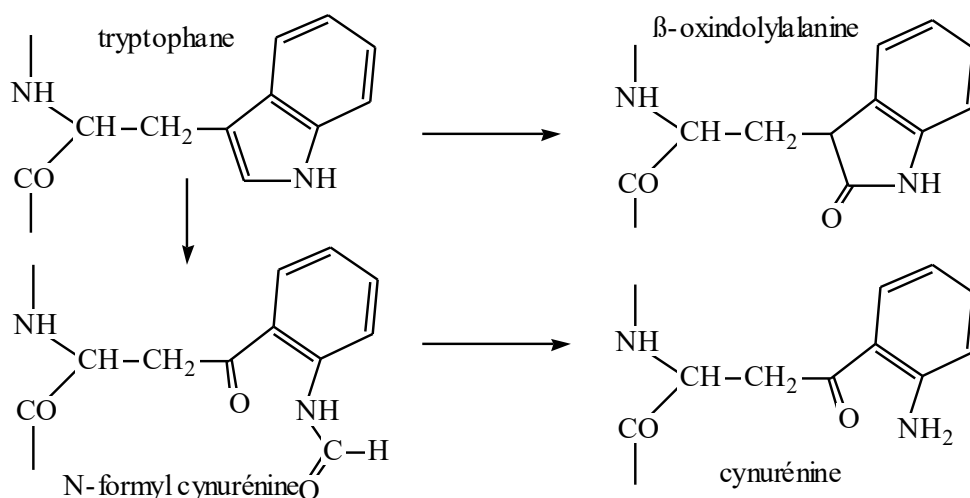


Figure 163. Les principaux dérivés d'oxydation du tryptophane

Il n'existe pas beaucoup d'informations sur la valeur nutritionnelle des dérivés d'oxydation du tryptophane. Néanmoins, il apparaît que l'ouverture du noyau indolique conduit à une perte de potentialité tryptophane des dérivés formés.

En présence de composés photo-sensibilisateurs comme la riboflavine ou des colorants, ou en présence d'acide ascorbique et de cuivre, le tryptophane mais aussi l'histidine ou encore la tyrosine sont oxydables en des dérivés complexes qui résultent de l'ouverture des noyaux aromatiques. Ces réactions se traduisent par une perte de disponibilité nutritionnelle de ces acides aminés.

XX.7.2. Effets des dérivés chlorés.

Certains solvants chlorés utilisés pour extraire l'huile (tourteau de soja) ou pour délipider des produits comme les farines de poisson sont susceptibles de réagir avec certains résidus d'acides aminés des protéines alimentaires. Ainsi, le trichloréthylène et le 1,2-trichloréthane réagissent avec les groupements thiols des résidus de cystéine pour former de la S-(dichlorovinyl)-L-cystéine dont le pouvoir toxique induit une anémie aplasique. Ces dérivés chlorés agissent comme des agents alkylants (figure 164).

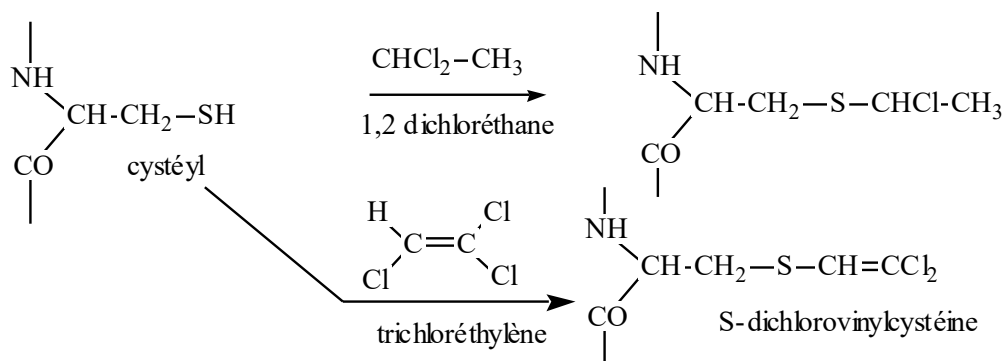


Figure 164. Action de solvants chlorés sur les résidus de cystéine des protéines.

Le trichlorure d'azote (agène), agent de maturation des farines de blé, induit la formation, à partir des résidus de méthionine des protéines du gluten, de méthionine sulfoximine toxique (figure 165). Ce composé engendre des désordres nerveux graves.

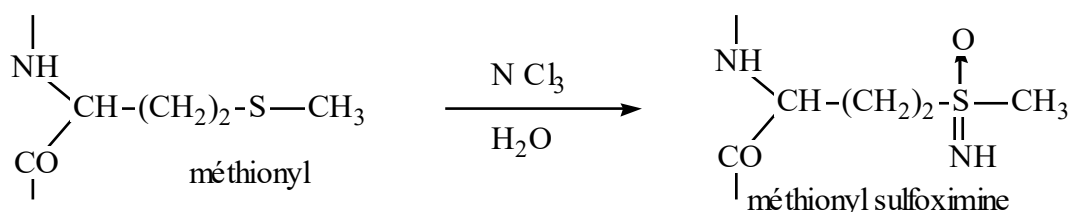


Figure 166. Formation de méthionine sulfoximine par traitement d'une protéine par du trichlorure d'azote.

La plupart des solvants chlorés utilisés dans l'extraction des lipides (dichlorométhane fluorocarbones, tétrachloréthylène etc.) peuvent avoir des effets sur la conformation de la protéine mais la plupart d'entre eux n'a pas d'effet sur les résidus d'acides aminés des protéines.

Rappelons que c'est depuis que les solvants chlorés n'ont plus été utilisés pour délipider des farines animales que celles-ci ont été impliquées dans la transmission de l'encéphalite spongiforme bovine. Il n'est pas exclu que ces solvants, comme le chloro-2-éthanol, soient de puissants générateurs de structures secondaires en hélice α . Dans ce cas, ils favoriseraient la transition $\alpha\beta \rightarrow \alpha\alpha$ avec passage de la forme PrP^{sc} à la forme PrP^c avec évidemment perte du pouvoir toxique.

Certains dérivés chlorés comme l'hypochlorite de sodium, les solutions aqueuses de dioxyde de chlore sont capables de réagir avec des acides aminés et plus particulièrement avec le tryptophane pour former des dérivés chlorés mutagènes. Des réactions d'oxydation de la méthionine, de la cyst(é)ine peuvent apparaître dans ces conditions ainsi que des réactions de désamination.

XX.7.3. Interaction sulfites - protéines alimentaires.

Les sulfites sont utilisés en technologie alimentaire comme agents inhibiteurs du brunissement enzymatique et non enzymatique et comme antiseptiques avec certains produits comme le vin ou certains fruits. Ils forment à partir des composés carbonylés ou des bases de Schiff de la réaction de Maillard des sulfonates stables et à partir des ponts disulfure des dérivés S-sulfonés (figure 167).

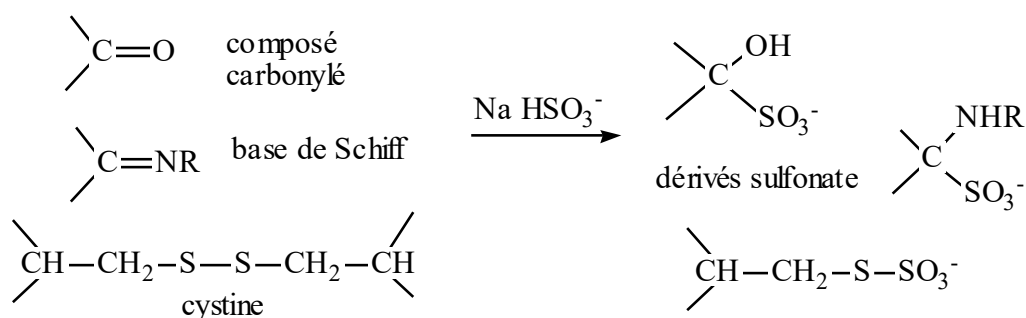


Figure 167. Formation de dérivés sulfonés au cours du traitement par du sulfite.

Cette sulfitolyse permet de modifier la solubilité de certaines protéines; elle n'affecte généralement que les ponts disulfure accessibles. Les dérivés S-sulfonate formés sont instables en milieu acide; leur ingestion se traduit par une élimination sous forme de sulfate dans les urines et les fecès.

XX.7.4. Interactions protéines - nitrites.

De très nombreuses recherches sont effectuées depuis une vingtaine d'années sur les possibles effets de composés nitrosés comme les nitrosamines et les nitrosamides éventuellement présents dans certains de nos aliments. Des revues sont régulièrement consacrées à ces dérivés dont plus de 300 s'avèrent cancérogènes chez l'animal.

En faibles quantités dans certains de nos aliments, leur formation passe souvent par un contact de composés de l'aliment avec des nitrites dont la présence est liée soit à la réduction des nitrates par des microorganismes, soit à une addition directe comme c'est le cas dans des semi-conserves au sein desquelles il joue le rôle de conservateur. Les nitrites sont des agents bactériostatiques inhibant la formation de toxine par *Clostridium botulinum* ; ils modifient aussi la couleur par formation de complexes avec des composés hémiques et contribuent à la formation de dérivés aromatiques.

Les mécanismes chimiques de nitrosation sont complexes (figure 168). En milieu acide, les nitrites donnent de l'acide nitreux qui est ensuite transformé en anhydride nitreux. Ce dernier composé réagit avec des amines secondaires déprotonées. Parmi celles-ci, la proline constitue une cible privilégiée de nitrosation dans les protéines. La nitrosopyrrolidine mise en évidence dans le jambon cuit résulte vraisemblablement de la nitrosation de proline libre, la nitroso-proline étant ensuite décarboxylée. Les acides aminés possédant un ou plusieurs atomes d'azote sur leur chaîne latérale comme par exemple le tryptophane ou l'histidine peuvent aussi subir une N-nitrosation. Les nitrites réagissent aussi avec les thiols en donnant des nitrosothiols et avec la tyrosine.

Les résidus de lysine subissent en présence de nitrite une désamination au niveau de leur ϵ -NH₂ ; il se forme de l' ϵ -hydroxynorleucine dont la présence est considérée comme un marqueur du traitement par les nitrites. Il apparaît que parmi les résidus d'acides aminés aptes à réagir, seuls ceux qui sont situés en surface sont impliqués dans des réactions de nitrosation.

Cependant, les trois composés les plus fréquemment détectés dans les semi-conserves riches en protéines et plus particulièrement dans les produits carnés conservés au nitrite sont la nitrosodiéthylamine, la nitrosoéthylméthylamine et la nitrosodiméthylamine.

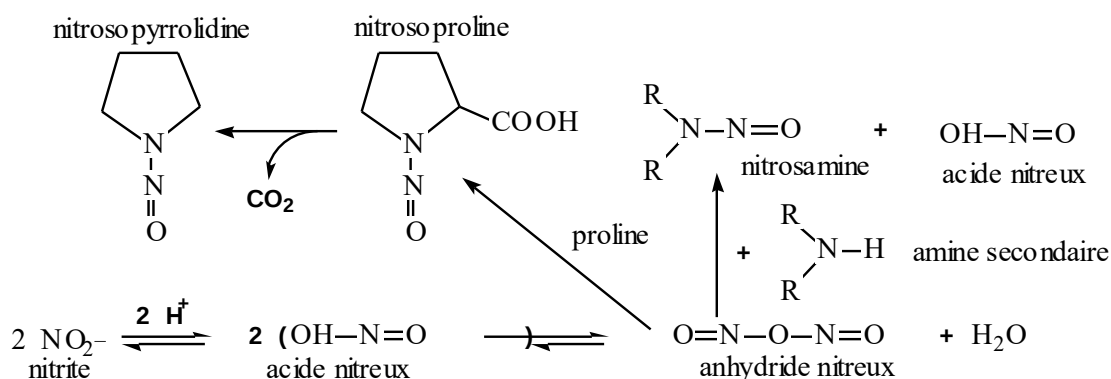


Figure 168. Formation de dérivés nitrosés à partir des nitrites.

Les incidences sur la santé des consommateurs résultant de l'ingestion de produits additionnés de nitrites et quelquefois cuits ont fait l'objet de nombreux travaux en raison du caractère cancérigène de bon nombre de ces dérivés.

XX.7.5. Réactions diverses

Les protéines, de par la diversité des groupements fonctionnels des chaînes latérales des résidus d'acides aminés, sont capables de donner des interactions variées (hydrogène, ionique et hydrophobe essentiellement) avec bon nombre de composants alimentaires. Ainsi certains composants d'**arômes** agréables ou non peuvent s'adsorber sur les protéines, ce qui modifie les caractères organoleptiques du produit et en modifie donc l'acceptabilité. Des **ions** peuvent aussi donner des interactions avec certains des groupements ionisables des chaînes latérales. De nombreux **colorants** alimentaires naturels ou ajoutés peuvent s'adsorber sur les protéines avec lesquelles ils forment des complexes souvent très stables. La production de fumée par combustion de bois libère entre autre des **aldéhydes** (acétaldéhyde, formaldéhyde, etc.) qui réagissent alors avec les protéines des aliments fumés. Ces

aldéhydes se condensent avec les groupements ϵ -aminés des résidus de lysine dont la disponibilité est abaissée.

XX.8. CONCLUSION

Au cours des traitements technologiques auxquels sont soumis nos aliments, au cours de leur entreposage, les protéines peuvent subir des altérations qui affectent leur structure spatiale ou des résidus d'acides aminés indispensables. Ces altérations n'ont que des incidences nutritionnelles minimales si notre alimentation est variée. Il est clair que les traitements thermiques industriels ou domestiques engendrent des modifications défavorables, le plus souvent en accélérant la vitesse de certaines réactions de détérioration. Cependant leurs effets bénéfiques compensent largement ces inconvénients et il faut, dans l'avenir, parvenir à une maîtrise la meilleure possible de l'ensemble de ces phénomènes. Le plus souvent, les aliments au sein desquels les protéines ont subi des altérations nutritionnelles importantes sont inconsommables par suite de modifications très désagréables de leur qualité organoleptique. Les résidus d'acides aminés les plus souvent impliqués dans des réactions diminuant la valeur nutritionnelle des protéines sont surtout la lysine et à un degré moindre la méthionine, la cystéine et le tryptophane. Il faut s'assurer que la perte, quand elle se produit, ne soit pas suivie par l'apparition de dérivés toxiques ou cancérogènes. Enfin, il faut faire en sorte que les traitements identifiés comme étant à l'origine d'une diminution de valeur nutritionnelle ou de l'apparition de dérivés toxiques (solvants chlorés, nitrites, traitements alcalins, traitements thermiques à très haute température, agents oxydants etc.) soient abandonnés ou parfaitement contrôlés quant à leurs incidences nutritionnelles ou toxicologiques.

XXI. MODIFICATIONS DE LA NUTRI-FONCTIONNALITE DES PROTEINES ALIMENTAIRES AU COURS DES TRAITEMENTS TECHNOLOGIQUES ET DE L'ENTREPOSAGE.

Très succinctement rappelons que la principale propriété nutritionnelle des protéines est d'apporter à l'organisme des acides aminés et l'azote nécessaires aux synthèses. Très schématiquement il est nécessaire que ces protéines alimentaires présentent les caractéristiques suivantes :

- **bonnes qualités organoleptiques** .
- **non toxicité**.
- **digestibilité satisfaisante**.
- **composition équilibrée en acides aminés: besoins qualitatifs**. Certains acides aminés sont indispensables et il faut suivre leur **disponibilité** au cours des traitements technologiques et plus particulièrement de ceux qui sont le plus souvent **limitants** et très réactifs par leur chaîne latérale (LYS, CYS MET, TRP, THR surtout)
- **apport satisfaisant: besoins quantitatifs**. Les besoins quantitatifs varient en fonction de nombreux paramètres (âge, état physiologique etc).

Les effets des traitements technologiques sur les protéines alimentaires, qu'il s'agisse d'opérations culinaires domestiques ou de procédés industriels, ont été très étudiés au cours de ces dernières années. Dans leur ensemble, les traitements technologiques ont des effets bénéfiques sur les aliments certains conduisant cependant à des modifications défavorables. Elles affectent le plus souvent la structure primaire des protéines et se traduisent par une diminution des teneurs ou de la disponibilité en acides aminés indispensables ou encore par la formation de substances antinutritionnelles ou toxiques. Le plus souvent leurs incidences sont négligeables si elles interviennent sur un résidu d'acide aminé indispensable qui ne constitue pas le facteur limitant ou encore si la protéine qui les a subies ne contribue que faiblement à l'apport protéique du régime. Ces modifications peuvent être cependant très préjudiciables pour certaines catégories de consommateurs comme les enfants en bas âge, les personnes âgées, les populations sous-alimentées dont l'alimentation ne repose que sur un nombre limité de produits comme certaines céréales ou légumineuses.

Il ne faut pas oublier aussi que certaines maladies peuvent avoir des origines alimentaires et que la consommation "quotidienne" de certains dérivés très toxiques ou mutagènes à dose infime peut se traduire à longue échéance par l'apparition de maladies diverses. Actuellement il est par exemple admis que 45 à 50 % de l'ensemble des cancers humains sont d'origine alimentaire. Il faut donc veiller à éviter la formation de certains dérivés toxiques ou peu toxiques à court terme mais aussi celle de dérivés toxiques à long terme comme les composés mutagènes.

Il est possible d'aborder l'étude des effets des traitements technologiques sur les propriétés nutritionnelles et fonctionnelles de deux façons soit en fonction des traitements, soit en fonction des effets sur les protéines. Dans ce dernier cas cette étude peut se faire par :

- l'étude des effets des changements de conformation (structures 2aires et 3aires)
- l'étude des effets des modifications chimiques des résidus d'acides aminés (structure 1aire)
- l'étude des interactions protéines-protéines
- l'étude des interactions protéines- substance non protéique (glucides, lipides, polyphénols, additifs etc.)

Les effets des traitements technologiques sur les **propriétés nutritionnelles** (à gauche des tableaux) et **fonctionnelles** (à droite des tableaux) sont présentés schématiquement ci-dessous :

EFFETS DE LA TEMPERATURE

Jusqu'à 100-120°C

*Dénaturation des protéines : modifications de conformation (structures secondaires, tertiaires et quaternaires modifiées, démasquage de zones hydrophobes)
désamidation - hydrolyses - échanges SH --> S - S*

Disparition du pouvoir toxique ou antinutritionnel
Augmentation de la digestibilité

Modification de la couleur (myoglobine)
Diminution de la solubilité
Variation de la capacité de rétention d'eau (gonflement dans l'eau, exsudation)
Traitement nécessaire à la gélification
Variations des propriétés émulsifiantes et moussantes
Amélioration de l'appétence et de la texture

au-dessus de 120°C

*Destruction d'acides aminés (désulfuration de CYS, MET, désamidation de GLN, ASN, destruction du TRP avec formation de carbolines)
Isomérisation L -> D,
ponts covalents S-S, isopeptidiques ou LAL)
Hydrolyses*

Perte d'acides aminés indispensables

Modification de la couleur, de l'odeur et de la texture

Formation de dérivés toxiques ou mutagènes
Diminution de la digestibilité

Diminution de la solubilité dans l'eau
Formation d'aggrégats. Variation du pH

en présence de glucides réducteurs

(réaction de Maillard, brunissement non enzymatique)

Perte de lysine disponible
Diminution de digestibilité
Formation de mutagènes MeIQ

Modification de couleur et de goût souvent favorables
Amélioration de la solubilité par fixation de composés polaires non ionisés

en milieu alcalin

(isomérisation, formation de déhydroalanine puis lysinoalanine, lanthionine, β-aminoalanine)

Diminution de digestibilité
Toxicité de dérivés. Perte de lysine

Augmentation de la solubilité
Obtention de collodions de filage

EFFETS DES TRAITEMENTS OXYDANTS

(Oxydation d'acides aminés CYS SH, MET, TRP)

Perte d'acides aminés indispensables
Dérivés toxiques

Modification de la solubilité et des propriétés émulsifiantes
Amélioration des propriétés viscoélastiques du gluten
Modification de la couleur

EFFETS DE TRAITEMENTS CHIMIQUES PAR DES ADDITIFS

Agents acylants

(anhydrides acétique, succinique, malique etc.- formation de liaisons isopeptidiques)

Peu de modifications

Modification du pHi et de la solubilité

Perte de lysine

L'acétylation augmente les propriétés émulsifiantes

Agents bifonctionnels

(malonaldéhyde ou glutaraldéhyde)

Réticulation par les ε-aminés

Diminution de la digestibilité

Diminution de la solubilité. Texturation

Phosphatation ou sulfatation

(au niveau de SER ou THR)

Peu de modifications

Diminution du pHi

Augmentation de la capacité d'absorption d'eau

Formation possible de films ou de gels

“Glycosylation”

(fixation d'acide gluconique par la carbodiimide - fixation par alkylation réductrice d'oses)

Fixation sur les ε-NH₂ ou thiol ou hydroxyle

Baisse de disponibilité de LYS

Augmentation de la solubilité à

différents pH (augmentation de l'hydrophilicité)

Résistance à la précipitation thermique

Fixation de lipides

(par alkylation réductrice ou par acylation)

Baisse de disponibilité de LYS

Diminution de la solubilité

(augmentation de l'hydrophobicité)

Réaction avec les nitrites et les sulfites (ADDITIFS)

Formation de dérivés nitrosés avec les amines 1aires et 2aires

Formation de dérivés S-sulfonés avec les sulfites

Formation de dérivés toxiques

Modifications de couleur et du goût

DESHYDRATATION

L'élimination de l'eau provoque l'agrégation des protéines par augmentation des concentrations de tous les solutés (y compris les protéines) et favorise les interactions protéines autres

composants de l'aliment surtout si la température est élevée

Risque important de réaction de Maillard

Baisse de digestibilité

Perte de Disponibilité de LYS

Oxydation de MET (si O₂)

Perte de solubilité. L'UF donne des

concentrés solubles (aptés à gélifier en fonction de leur teneur en sel et lactose)

Selon les paramètres de la poudre (taille, porosité) mouillabilité, absorption d'eau ou d'huile, dispersibilité variables

TRAITEMENTS AVEC DES SOLVANTS APOLAIRES

Solvants utilisés : hexane (lipides), acétone (pigments chlorophylliens)

éthanol ou isopropanol (phospholipides, glucides, eau, sels minéraux)

Un séchage préalable est souvent nécessaire

Une désolvantisation finale par la vapeur permet d'éliminer le solvant résiduel

Démasquage de groupes hydrophobes

Baisse de digestibilité

Agrégation et insolubilisation (souvent irréversible)

Absorption d'eau modifiée

Formation de gels (protéines de soja 8 % avec éthanol 20 % ; si >30 % il y a précipitation car les interactions protéines-protéines deviennent prédominantes par rapport à celles protéines-eau

EFFETS DU pH ET DE LA PRESENCE DE SELS

La plupart des protéines précipitent généralement au pHi (phénomène réversible sauf pour la caséine où la précipitation est associée à une déminéralisation et à une déstabilisation de sa structure quaternaire)

pH acides ou alcalins

Favorisent la fixation par les protéines d'anions ou de cations respectivement

Peu d'effets si ΔpH faible

Fixation de Na^+ augmente la solubilité

Ca^{++} la diminue (ponts salins ; les protéinates de calcium gélifient souvent à chaud ; l'élimination du Ca^{++} par un complexant comme l'acide citrique ou les polyphosphates peut ressolubiliser la protéine : sels de fonte)

A pH faiblement alcalin , la préparation des protéinates se traduit par une dissociation des protéines oligomériques (COO^-)

Peu d'effets (LAL)

Excellente solubilité Bonnes propriétés de surface et d'absorption d'eau

Pour les protéines de soja l'alcalinisation suivie de neutralisation provoque un grand déplissement; après atomisation la protéine gélifie à t° ambiante par réhydratation

EFFETS DE POLYELECTROLYTES

Divers polyélectrolytes (Carboxyméthylcellulose, alginates, polyphosphates) s'adsorbent à pH faiblement acide (entre les pK_a et pH_i) sur les protéines ; phénomène souvent réversible

Peu de modifications

Précipitation ou réticulation

TRAITEMENTS MECANQUES

Broyage

Le broyage à sec de préparations protéiques (concentrats, isolats) donne des poudres à surface particulière d'autant plus grande que leur taille est faible

Peu d'incidences

Amélioration de l'absorption d'eau
Solubilité généralement augmentée
Absorption d'huile et propriétés moussantes modifiées

Si des forces de cisaillement importantes sont appliquées (homogénéisation du lait, extrusion, filage, battage) des modifications des structures quaternaires apparaissent

Augmentation de la digestibilité

Modifications des capacités émulsifiantes et moussantes Texturation et filage

MODIFICATIONS ENZYMATIQUES

In vivo

Environ 140 modifications après synthèse au niveau des ribosomes : affectent les chaînes latérales surtout de LYS, GLU, ASP, SER, THR, PRO, CYS, ARG
Hydroxylations (PRO, LYS - hydroxylases) , Glycosylation (glycosyltransférases), Désaminases, Phosphorylases, Transglutaminase, Protéases etc.

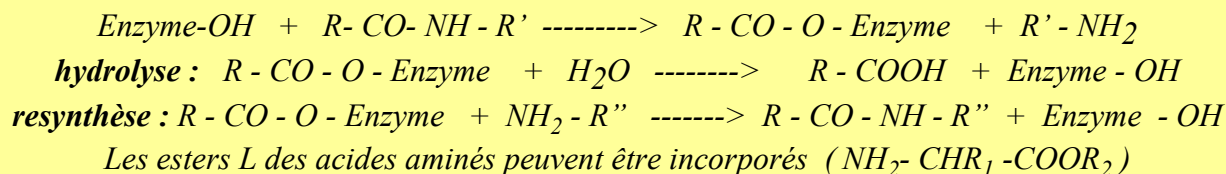
In vitro - traitement de protéolyse

Protéolyse limitée par la papaine, la broméline, la chymosine ou des protéases fongiques

Augmentation de digestibilité	Solubilisation, élimination de troubles (bière, etc)
Obtention de peptides "actifs"	Élimination de peptides amers
	Attendrissement de la viande
	Coagulation des protéines du lait
	Augmentation des capacités émulsifiantes et moussantes
	Perte des propriétés gélifiantes et viscoélastiques

***In vitro* : resynthèse, la réaction plastéine**

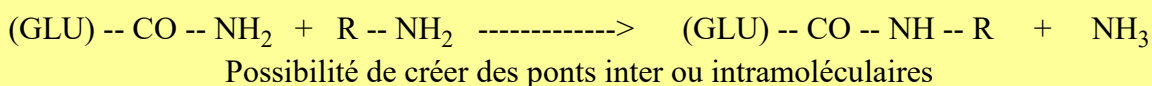
La première étape nécessite une protéolyse (5 % P/V protéine) par la pepsine ou la papaine
La deuxième nécessite une concentration de l'hydrolysate jusqu'à une teneur en protéine de 30 à 40 %
En présence de la protéase (ou d'une autre) et après ajustement du pH il se produit une resynthèse par transpeptidation



"Enrichissement" en acide aminé limitant	Modification de la solubilité
Plastéine sans PHE (phénylcétonurie)	Amélioration des propriétés moussantes et émulsifiantes
	Amélioration du goût (peptides amers)

transacylation

La transglutaminase, par une réaction calcium dépendante, catalyse la réaction suivante :



Greffage d'acides aminés	Réticulation - texturation
Ponts isopeptidiques	
diminution de la digestibilité et de la teneur en lysine disponible	

	COMPOSITION EN ACIDES AMINES (en g pour 16 g d'azote)										
	(poule)	(vache)	NORME S	VIANDES ET ABATS DE VIANDE							
	oeuf	caséine	FAO	boeuf	boeuf	boeuf	boeuf	boeuf	poulet	porc	porc
	entier			1ère	2de	foie	coeur	rein	blanc	filet	jambon
				catégorie							
acide aspartique	10,70	6,80		9,20	10,80	10,20	11,30	10,60	10,10	10,00	10,10
acide glutamique	12,30	18,50		14,30	16,60	13,80	15,50	13,70	14,60	15,90	15,70
sérine	7,70	5,90		4,10	5,00	5,60	5,30	5,90	4,00	4,00	4,20
thréonine	5,00	4,30	2,80	4,70	5,10	5,10	5,40	5,20	4,80	4,80	4,90
glycine	3,80	1,70		4,40	7,40	5,40	5,60	6,10	4,60	4,30	4,70
alanine	4,30	2,80		6,00	6,60	6,20	6,70	6,10	5,30	5,90	6,00
valine	7,40	5,50	4,20	5,30	4,10	5,30	4,70	4,60	5,50	5,20	5,30
leucine	9,00	8,50	4,80	8,20	8,00	9,00	9,20	8,50	7,65	8,30	8,30
isoleucine	6,90	4,00	4,20	5,00	3,80	4,30	3,60	3,90	5,20	5,20	5,20
tyrosine	4,50	5,80	2,80	3,80	3,10	3,80	3,70	3,70	3,70	3,90	3,60
phénylalanine	5,90	5,30	2,80	4,30	4,00	5,20	4,60	4,60	4,10	4,30	4,20
tryptophane	1,60	1,30	1,20								
méthionine	3,30	3,20	3,00	4,20	3,70	3,50	3,70	4,10	4,30	4,00	3,90
cystine	2,50	0,40	1,20								
lysine	7,20	7,30	4,20	8,90	7,60	6,90	7,20	7,10	9,30	9,10	8,90
histidine	2,30	2,50		4,40	2,10	3,00	2,80	2,50	5,10	4,00	3,90
arginine	6,40	3,60		6,00	5,90	6,00	5,30	6,20	7,20	5,80	5,30
proline	4,30	10,30		4,30	7,70	5,50	4,40	5,10	4,50	3,80	4,10
a.aminés totaux	105,10	97,70	31,20	97,10	101,50	98,80	99,00	97,90	99,95	98,50	98,30
aa essentiels	53,30	45,60	31,20	59,10	55,10	57,60	54,60	55,50	61,35	58,40	57,60
aa hydrophobes	38,60	33,60	23,00	30,80	26,70	31,10	29,50	29,40	30,45	30,90	30,50
aa polaires non											
ionisables	12,70	10,20	2,80	8,80	10,10	10,70	10,70	11,10	8,80	8,80	9,10
aa polaires											
ionisables -	23,00	25,30	0,00	23,50	27,40	24,00	26,80	24,30	24,70	25,90	25,80
aa polaires											
ionisables +	15,90	13,40	4,20	19,30	15,60	15,90	15,30	15,80	21,60	18,90	18,10
protéine (%)	13,00	90,00		20,00	19,00	15,00	18,00	17,00	21,00	20,00	21,00

	COMPOSITION EN ACIDES AMINES (en g pour 16 g d'azote)										
Graines ou grains entiers (céréales et protéagineux)	Graines ou grains entiers (céréales et protéagineux)										
	céréales				protéagineux						
	blé	maïs	riz	sorgho	haricot	pois sec	fève	fèverole	lupin	lentille	pois- chiche
acide aspartique	6,20	6,70	10,00	7,10	12,90	12,10	11,60	11,30	10,80	12,60	11,50
acide glutamique	29,60	20,80	18,00	21,40	17,50	18,10	17,90	18,40	22,90	17,10	15,10
sérine	4,50	4,80	5,10	4,30	6,20	4,40	4,40	4,40	5,10	4,20	5,00
thréonine	3,30	3,60	3,80	3,30	4,80	4,50	4,50	4,00	3,50	3,90	3,90
glycine	3,80	3,80	5,00	2,70	3,70	4,40	4,40	4,40	3,60	4,10	3,70
alanine	3,50	7,90	5,70	8,70	3,90	4,20	4,20	3,90	3,10	4,30	4,20
valine	4,80	5,00	5,80	5,20	5,40	5,00	5,00	5,20	4,00	5,40	4,70
leucine	6,90	13,90	7,70	13,10	8,50	8,00	8,00	7,50	7,40	7,60	7,80
isoleucine	4,00	4,00	4,30	4,60	5,20	4,90	4,90	4,50	4,80	5,00	4,70
tyrosine	2,60	4,00	4,00	3,90	3,10	3,90	3,90	3,50	4,60	3,30	2,80
phénylalanine	5,20	5,20	5,00	5,60	5,60	5,40	5,40	4,80	4,20	5,50	6,00
tryptophane											
méthionine	3,90	3,20	3,60	3,50	2,20	2,60	2,30	2,70	2,60	2,40	3,30
cystine											
lysine	3,50	2,80	4,00	2,50	7,10	7,50	6,80	7,10	5,20	7,70	7,40
histidine	3,00	3,00	2,50	3,00	2,90	2,10	2,10	2,90	2,50	3,60	2,90
arginine	5,20	4,90	8,50	3,70	7,30	8,80	8,80	8,80	11,00	8,80	13,00
proline	10,00	10,00	4,80	8,50	4,70	4,30	4,30	4,70	4,90	4,40	4,20
a.aminés totaux	100,00	103,60	97,80	101,10	101,00	100,20	98,50	98,10	100,20	99,90	100,20
aa essentiels	34,20	41,70	38,20	41,70	41,90	41,80	40,80	39,30	36,30	40,80	40,60
aa hydrophobes	27,40	35,30	30,40	35,90	30,00	29,80	29,50	28,20	27,60	29,20	29,30
aa polaires non ionisables	7,80	8,40	8,90	7,60	11,00	8,90	8,90	8,40	8,60	8,10	8,90
aa polaires ionisables - aa polaires ionisables +	35,80	27,50	28,00	28,50	30,40	30,20	29,50	29,70	33,70	29,70	26,60
	11,70	10,70	15,00	9,20	17,30	18,40	17,70	18,80	18,70	20,10	23,30
protéine (%)	12,00	7,00	13,00	14,00	23,00	22,00	26,00	27,00	35,00	31,00	22,00

	COMPOSITION EN ACIDES AMINES (en g pour 16 g d'azote)									
	soja		colza		tournesol		arachide		coton	
	tourteau	isolat	tourteau	isolat	tourteau	isolat	tourteau	isolat	tourteau	isolat
acide aspartique	10,20	11,50	7,50	8,70	10,10	10,10	12,40	10,00	9,80	9,50
acide glutamique	16,50	20,90	19,40	16,50	21,90	22,30	20,50	18,80	23,90	20,70
sérine	5,30	4,30	4,60	4,70	4,00	3,90	4,50	4,80	4,60	4,40
thréonine	4,00	3,20	4,80	5,10	3,70	3,50	2,70	2,40	3,70	3,20
glycine	3,80	3,70	5,20	5,00	5,50	4,50	5,60	3,90	4,30	4,30
alanine	4,10	3,80	4,50	4,80	4,00	4,20	3,90	4,40	4,40	3,90
valine	4,8	4,7	6,10	5,90	6,00	6,00	5,00	6,20	4,90	5,60
leucine	6,7	8,1	8,50	8,30	7,20	6,90	7,20	7,20	6,40	6,90
isoleucine	4,2	5,3	4,60	5,10	4,50	5,30	3,90	4,80	3,60	4,20
tyrosine	4,60	3,60	3,00	4,30	3,50	3,00	4,40	3,10	2,80	3,20
phénylalanine	6,10	5,50	4,40	4,80	5,10	6,00	5,10	4,50	5,40	7,60
tryptophane										
méthionine	3,60	2,20	4,80	3,70	4,40	3,80	2,30	3,00	2,00	2,00
cystine										
lysine	6,30	5,50	5,70	6,50	4,00	3,50	3,30	3,40	4,80	3,30
histidine	2,60	2,30	2,90	3,20	2,50	2,90	2,30	1,60	3,00	3,30
arginine	7,20	7,10	5,70	7,30	8,40	9,60	11,70	16,60	12,50	13,50
proline	6,10	8,10	7,30	6,30	5,00	4,30	4,80	3,70	3,70	4,30
a.aminés totaux	96,10	99,80	99,00	100,20	99,80	99,80	99,60	98,40	99,80	99,90
aa essentiels	40,30	38,10	41,90	43,70	38,40	38,00	33,90	34,60	33,60	36,00
aa hydrophobes	30,00	29,40	31,40	32,10	30,70	31,00	27,90	28,80	25,10	29,50
aa polaires non ionisables	9,30	7,50	9,40	9,80	7,70	7,40	7,20	7,20	8,30	7,60
aa polaires ionisables -	26,70	32,40	26,90	25,20	32,00	32,40	32,90	28,80	33,70	30,20
aa polaires ionisables +	16,10	14,90	14,30	17,00	14,90	16,00	17,30	21,60	20,30	20,10
protéine (%)	50,00	95,00	37,00	85,00	38,00	98,00	55,00	95,00	55,00	92,00