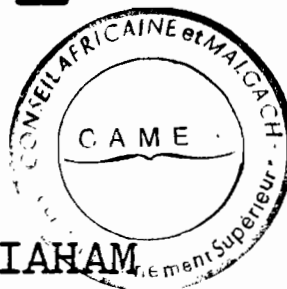


UNIVERSITE DE DIJON

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE DE BIOLOGIE APPLIQUEE
A LA NUTRITION ET A L'ALIMENTATION

T H E S E



Présentée par Babou DIAHAM

en vue d'obtenir le titre de DOCTEUR-INGENIEUR

ETUDE DES PROTEINES DE *BRASSICA JUNCEA*

AU COURS DE LA FABRICATION

ET DE LA CONSERVATION DE LA MOUTARDE.

CONSEIL AFRICAIN ET MALGACHE
POUR L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
C. A. M. E. S. — OUAGADOUGOU
Date 02. JUIN. 1995
Registré sous n° 003.7.7...
— Commission d'examen :

soutenu le 15 Décembre 1983

Mr P. DUPUY Président

Mr C. BARON

Mr J.P. HALM

Mr D. LORIENT

Barké Farba DIAHAM
Wërsëk Mama SARR

REMERCIEMENTS

J'exprime ma profonde reconnaissance à Monsieur le Professeur Christian BARON, Professeur de Biochimie à la Faculté des Sciences de Dijon, pour l'accueil qu'il m'a réservé dans son laboratoire et pour la confiance qu'il m'a accordée sur le plan scientifique.

Je tiens à exprimer mes respectueux remerciements à Monsieur Pierre DUPUY Directeur du Département "Station de Technologie des Produits Végétaux de l'I.N.R.A. de Dijon",

Directeur du G.E.R.A.U.D. (Groupe d'Etude et de Recherche en Alimentation de l'Université de Dijon),

qui a bien voulu me faire l'honneur de présider le jury.

Que Monsieur Jean-Pierre HALM, Directeur technique de SEGMA MAILLE, dont nous avons apprécié l'amicale contribution et qui a bien voulu participer à la commission d'examen, reçoive mes sincères remerciements.

Que Monsieur le Professeur Denis LORIENT, Professeur de Biochimie à l'E.N.S.B.A.N.A., qui a eu la bienveillance de juger ce travail, comme il l'avait déjà fait pour mon mémoire d'Ingénieur, soit assuré de toute ma gratitude

J'aimerais remercier tout particulièrement mes amis des laboratoires de Biochimie Générale et de Biochimie Alimentaire pour leur aide matérielle et morale.

Que toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail, trouvent ici, l'expression de ma sincère reconnaissance.

Je tiens à témoigner toute mon amitié aux personnes du service de l'O.C.A.U. (Office de Coopération et d'Accueil Universitaire) qui ont facilité mon séjour en France.

RESUME

Les protéines de *Brassica juncea*, extraites à l'aide d'une solution de chlorure de sodium (0,5 M) ont été fractionnées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 10 %.

L'étude des protéines de graines et de différentes pâtes de moutarde (avec et sans SO₂), a mis en évidence une hydrolyse partielle de ces protéines au cours de la fabrication et de la conservation de la moutarde.

Ces phénomènes d'hydrolyse s'accroissent avec la température et le temps de conservation de la pâte. A température ambiante et à la lumière, la présence de SO₂ semble accroître la stabilité des fractions les moins mobiles.

Le dosage des acides aminés totaux montre que 91 % de l'hydroxyproline de la graine provient des téguments.

Cet acide aminé peut donc être considéré comme un "marqueur" de sons de la moutarde. Un dosage de routine de l'hydroxyproline a été proposé.

L'analyse de l'évolution de la lysine libre au cours de la conservation de la pâte indique que cet acide aminé participe aux phénomènes de brunissement non enzymatiques.

La présence de SO₂ retarde, toutefois, le brunissement. L'efficacité de SO₂ dure entre 1 et 4 mois.

L'activité de la myrosinase a été étudiée. Il apparaît que :

- cette activité enzymatique baisse rapidement au cours de la conservation de la pâte.
- SO₂ diminue l'activité de la myrosinase de *Brassica juncea*
- la myrosinase de *Sinapis alba* est 30-40 fois plus active que celle de *Brassica juncea*.

MOTS CLES : *Brassica juncea* - graines de moutarde - pâte de moutarde - fabrication - conservation - dépelliculation - acides aminés - protéines - hydroxyproline - myrosinase - électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

SUMMARY

Brassica juncea proteins extracted with saline solution (NaCl 0,5 M) have been fractionated by polyacrylamide gel electrophoresis.

The study of seed and different mustard paste proteins points to a partial hydrolysis of these macromolecules after the paste preparation.

These phenomena augment with preservation time and temperature.

At room temperature and under light the presence of SO₂ seems to increase the stability of the slow fractions.

The aminoacid measurement indicates that 91 % of seed hydroxyproline originates in the cuticle. Hydroxyproline may be considered as a "marker" of the mustard bran.

A routine method of hydroxyproline determination is proposed.

The analysis of the evolution of the free lysine during mustard preservation demonstrates that this aminoacid participates in the non enzymatic browning. The presence of SO₂ increases, nevertheless, the induction time of the browning reactions. The effect of SO₂ lasts from one to four months.

The myrosinase activity has been studied. It seems that :

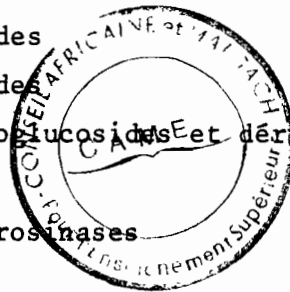
- this enzymatic activity decreases quickly during the preparation and preservation of the mustard ;

- SO₂ reacts with the myrosinase and consequently decreases its specific activity ;

- the myrosinase of *Sinapis alba* is 30-40 times as active as that of *Brassica juncea*.

SOMMAIRE

	page
AVANT - PROPOS	1
INTRODUCTION	2
1 - Place de <i>Brassica juncea</i> parmi les crucifères	2
11 - Présentation de <i>Brassica juncea</i>	2
12 - Place de <i>Brassica juncea</i> parmi les crucifères	2
13 - Etude bibliographique	4
2 - Fabrication de la moutarde	5
3 - Les thioglucosides et leur devenir	7
31 - Structure des thioglucosides	7
32 - Hydrolyse des thioglucosides	8
33 - Rôles biologiques des thioglucosides et dérivés	9
4 - Propriétés et fonctions des myrosinases	10
41 - Localisation	10
42 - Nature et mode d'action de la myrosinase	10
43 - Structure de la myrosinase	13
44 - Effet de l'acide ascorbique	14
45 - Propriétés de la myrosinase	18
451 - Influence du pH sur l'activité de la myrosinase	18
452 - Influence de la température	18
453 - Influence de l'acide ascorbique	19
454 - Effet des substances organiques et inorganiques	19
455 - Stabilité de la myrosinase	20
46 - Les thioglucosidases d'origine microbienne	21
MATERIEL ET METHODES	
1 - Matériel végétal	22



2 - Broyage des graines, des amandes et des pellicules	22
3 - Délipidation	22
4 - Dosage de l'azote total	23
5 - Dosage des acides aminés	23
51 - Hydrolyse acide des protéines	23
52 - Extraction des acides aminés libres	23
53 - Chromatographie en phase liquide des acides aminés	24
531 - Dosage des acides aminés	24
532 - Méthode de calcul	26
54 - Mise en évidence de l'hydroxyproline	28
6 - Analyse des protéines hydrosolubles	29
61 - Extraction des protéines	29
611 - Extraction des protéines des pâtes de moutarde	29
612 - Extraction des protéines des graines, des amandes et des pellicules	29
62 - Purification des protéines	29
63 - Electrophorèse	30
631 - Préparation des solutions	30
632 - Protocole	31
7 - Activité de la myrosinase	31
71 - Extraction de la myrosinase	32
72 - Mise en évidence qualitative de la myrosinase	32
721 - Diffusion dans un gel d'agarose	32
722 - Méthode de MAC GIBBON et d'ALLISON	33
723 - Méthode d'impression de VAUGHAN	34
73 - Détermination quantitative de l'activité de la myrosinase	35
731 - Méthode de SCHWIMMER	35
732 - Dosage du glucose	36

RESULTATS ET DISCUSSION

1 - Efficacité de la dépelliculation	38
11 - Teneur azotée des parties anatomiques de la graine	38
12 - Teneurs en eau et en protéines des amandes pures	40
13 - Teneur en pellicules des échantillons "d'amandes"	41
14 - Utilisation éventuelle de la dépelliculation dans la technologie de la moutarde	42
2 - Etude des protéines de <i>Brassica juncea</i>	44
21 - Extraction des protéines	44
22 - Electrophorèse des protéines : analyse qualitative	45
23 - Electrophorèse des protéines : analyse quantitative	47
231 - Electrophorèse des protéines des graines	47
232 - Effet de la fabrication de la pâte de moutarde sur le profil électrophorétique des protéines	49
233 - Evolution des protéines solubles dans une solution saline de la pâte de moutarde au cours de la conservation	49
3 - Composition en acides aminés des protéines	61
31 - Acides aminés totaux	61
32 - Cas de l'hydroxyproline	66
321 - Mise en évidence de l'hydroxyproline	66
322 - Teneurs en hydroxyproline des parties anatomiques de la graine	68
323 - Dosage de l'hydroxyproline de la pâte de moutarde	69
33 - Acides aminés libres	72
34 - Evolution de la teneur en lysine libre de la pâte de moutarde au cours de la conservation	76
4 - Etude de la myrosinase	78
41 - Analyse qualitative de la myrosinase	78
411 - Détection du glucose sur gel d'agarose	78
412 - Détection du glucose après électrophorèse	78
413 - Détection du sulfate acide par le chlorure de baryum	78
414 - Localisation de la myrosinase	78

42 - Détermination quantitative de l'activité de la myrosinase	79
421 - Méthode de SCHWIMMER	79
4211 - Calcul des coefficients d'extinction molaire	79
4212 - Calcul des activités spécifiques des myrosinases de <i>Brassica juncea</i> et <i>Sinapis alba</i>	79
4213 - Evolution de l'activité enzymatique de la myrosinase des pâtes de moutarde au cours de la conservation	87
4214 - Influence de l'acide ascorbique	88
422 - Méthode du dosage du glucose	88
CONCLUSION	96
BIBLIOGRAPHIE	99

SOMMAIRE DES FIGURES

Figure n°	page
1 : <i>Brassica nigra</i>	3
2 : Fruit de <i>Brassica napus</i> (Silique)	3
3 : Domaine d'utilisation des "amandes" dans la fabrication de la moutarde	43
4 : Schéma des électrophorégrammes des protéines de <i>Brassica juncea</i>	46
5 : Electrophorèse des protéines de <i>Brassica juncea</i>	48
6 : Effet de la fabrication de la pâte de moutarde sur le profil électrophorétique des protéines	50
7 : Evolution des protéines solubles dans une solution de NaCl au cours de la conservation de la moutarde	51 à 57
8 : Mise en évidence de l'hydroxyproline par chromatographie sur couche mince	67
9 : Spectre de la sinigrine (solution aqueuse)	80
10 : Spectre de la sinigrine (dans le tampon phosphate-acide citrique pH 5,69)	81
11 : Spectre de l'isothiocyanate d'allyle	82
12 : Cinétique de la myrosinase de <i>Sinapis alba</i> à 40°C	84
13 : Cinétique de la myrosinase de <i>Sinapis alba</i>	85
14 : Cinétique de la myrosinase de <i>Brassica juncea</i> à 40°C	86
15 : Spectre de l'acide ascorbique	89
16 : Dégradation de l'acide ascorbique à 20°C	90
17 : Effet de l'acide ascorbique à 50°C sur la myrosinase de la pâte de moutarde avec SO ₂ conservée 1 mois à 4°C	91
18 : Spectre de la sinigrine (dans tampon citrate-acide citrique pH 5,38)	92
19 : Spectre des protéines brutes (protéines de moutarde avec SO ₂ "analyse dès réception")	93
20 : Spectre des protéines brutes (protéines de moutarde sans SO ₂ "analyse dès réception")	94

SOMMAIRE DES TABLEAUX

Tableau n°	page
1 : Fabrication de la moutarde	6
2 : Mode d'action de l'acide ascorbique	17
3 : Teneur azotée des parties anatomiques de la graine	39
4 : Teneur azotée des parties anatomiques de la graine selon la littérature	39
5 : Rendement d'extraction des protéines	44
6 : Pourcentage des fractions protéiques dans les parties anatomiques de la graine	58
7 : Pourcentage des fractions protéiques au cours de la conservation de la moutarde	59
8 : Composition en acides aminés des graines entières	62
9 : Composition en acides aminés des "amandes grosses"	63
10 : Composition en acides aminés des "amandes fines"	64
11 : Composition en acides aminés des pellicules	65
12 : R_f de la proline et de l'hydroxyproline	68
13 : Teneur en hydroxyproline des parties anatomiques de la graine	68
14 : Composition en acides aminés libres du broyat	73
15 : Composition en acides aminés libres de la pâte de moutarde après tamisage	74
16 : Composition en acides aminés libres de la pâte de moutarde achevée	75
17 : Teneur en lysine libre des pâtes au cours de la conservation	76
18 : Coefficients d'extinction molaire de la sinigrine et de l'allylisothoniocyanate à 227,5 nm	79
19 : Activités spécifiques des myrosinases des graines de <i>Brassica juncea</i> et de <i>Sinapis alba</i>	83
20 : Activités spécifiques de myrosinase des pâtes de moutarde au cours de la conservation	87
21 : Activités spécifiques de diverses myrosinases	95

AVANT - PROPOS

Notre travail a été effectué dans le cadre d'un contrat "G.E.R.A.U.D" (Groupe d'Etude et de Recherche en Alimentation de l'Université de Dijon) regroupant des industriels de la moutarde, des chercheurs (Faculté des Sciences - I.N.R.A.) et des juristes afin de valoriser la moutarde de Dijon sur le marché national et international.

En effet, ce produit, fabriqué à partir des graines de *Brassica juncea*, est naturellement sensible aux phénomènes de brunissement. C'est pour les éviter qu'on ajoute de l'anhydride sulfureux en cours de fabrication. Cependant l'addition de SO₂ n'est pas habituelle dans divers pays étrangers, et de ce fait, les recherches du contrat "GERAUD" portent sur "la moutarde de Dijon sans SO₂".

Le travail qui nous a été confié est le fractionnement des protéines de la graine de *Brassica juncea* et l'étude de leurs propriétés enzymatiques (de type "myrosinase") dans le but d'apprécier le rôle des fractions protéiques au cours de la conservation de la moutarde de Dijon (avec ou sans SO₂).

Nous présentons, d'abord, en introduction, notre matière première biologique, la graine de *Brassica juncea*, ainsi que les données de la bibliographie (relativement abondante) sur les thioglucosides de la moutarde et l'action des thioglucosidases. Puis, après avoir décrit nos méthodes de travail, nous grouperons nos résultats en quatre parties :

- Efficacité de la dépelliculation
- Composition en acides aminés des protéines
- Etude des protéines de *Brassica juncea*
- Etude de l'activité "myrosinase"

En conclusion, nous ferons ressortir l'évolution des diverses fractions protéiques au cours de la conservation de la moutarde de Dijon, ainsi que les points à approfondir dans le cadre de recherches futures.

INTRODUCTION

1 - Place de *Brassica juncea* parmi les crucifères.

11. Présentation de *Brassica juncea*

Brassica juncea est une plante herbacée annuelle de la famille des crucifères. Les fleurs sont hermaphrodites, régulières et complètes avec un réceptacle convexe. La formule florale est : 4 sépales + 4 pétales + 6 étamines + 2 carpelles. La silique, fruit caractéristique des crucifères, a une structure constante. C'est une capsule formée de deux carpelles, à déhiscence paraplacentaire, s'ouvrant par quatre fentes situées deux par deux de chaque côté des placentas. Les parois carpellaires stériles se soulèvent de bas en haut; et les graines restent fixées sur le cadre placentaire.

La graine, pourvue de deux téguments est exalbuminée. Les cotylédons occupent la plus grande partie de l'embryon qui remplit toute la cavité séminale. La graine de *Brassica juncea* est globuleuse, légèrement ovoïde, son diamètre varie de 1,2 à 1,8 mm ; son poids moyen est de 2,4 mg (VANGHEESDAELE et FOURNIER, 1980). Elle possède, suivant les variétés, une teinte allant du brun-rouge (graine d'origine hongroise ou canadienne), ou jaune-clair (*Montana blonde* ou *Montana orientale*). (DELRUE, 1981). Elle comporte trois constituants anatomiques principaux : les téguments, l'embryon et les cotylédons. D'après BENGTSOHN (1970), les téguments représentent 15 à 21 % de la graine entière.

La culture de *Brassica juncea* est pratiquement disparue en France au profit du colza (*Brassica napus*) plus rémunérateur. Les plus gros exportateurs de moutarde sont le Canada, les Etats-Unis et la Hongrie, mais l'Inde possède, certainement, beaucoup plus de variétés différentes.

12. Place de *Brassica juncea* parmi les crucifères.

Plusieurs auteurs (MAC KENZIE et BLAKELY, 1972 ; VAUGHAN et WAITE, 1967) soutiennent l'hypothèse selon laquelle *Brassica juncea* serait un hybride de *Brassica nigra* et de *Brassica campestris*.



Figure 1 : *Brassica nigra*

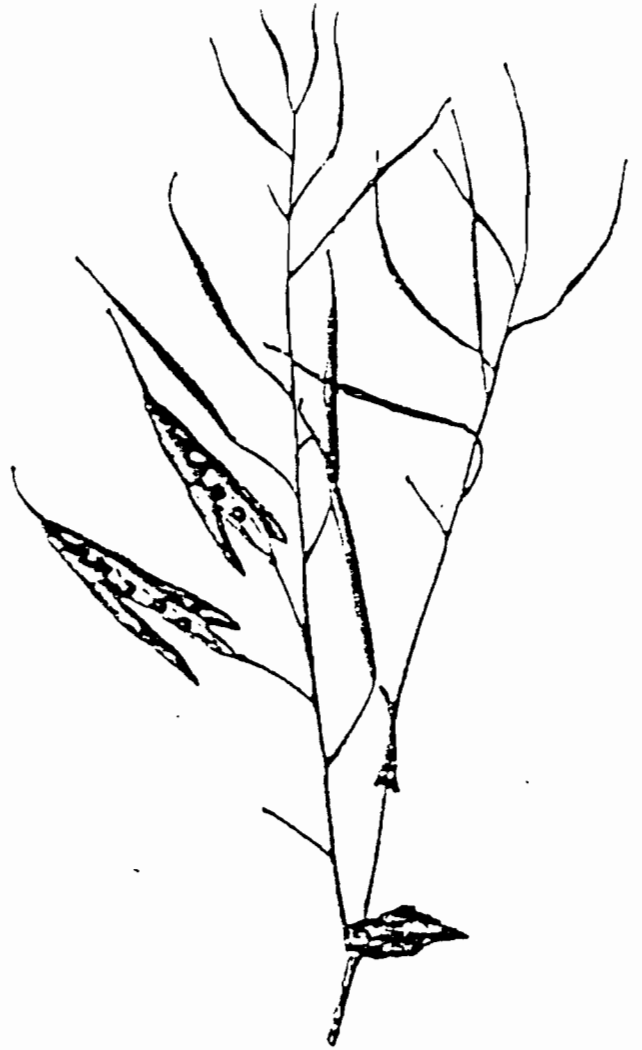


Figure 2 : Fruit de *Brassica napus*
(Silique)

Identification de *Brassica juncea*

Embranchement	SPERMAPHYTES		
Classe	ANGIOSPERMES		
Sous-classe	DICOTYLEDONES		
Série	THALAMIFLORES		
Ordre	PARIETALES		
Sous-ordre	RHOEADALES		
Famille	CRUCIFERES		
Tribu	BRASSICACEES		
Genre	BRASSICA	SINAPIS	; etc...
Espèce	<i>B. nigra</i> ; <i>B. campestris</i> ; <i>B. juncea</i> ; etc.. <i>S. alba</i> ; <i>S. arvensis</i> ; etc..		

Les crucifères représentent une famille homogène comprenant environ 380 genres et 3000 espèces.

Les graines de *Brassica nigra*, de *Brassica juncea* et de *Sinapis alba* entrent dans la confection des pâtes de moutarde. Cependant, pour l'appellation moutarde de Dijon, seules les deux premières espèces sont utilisées.

13. Etude bibliographique.

Les protéines de la graine de *Brassica juncea* ont fait l'objet de beaucoup de travaux.

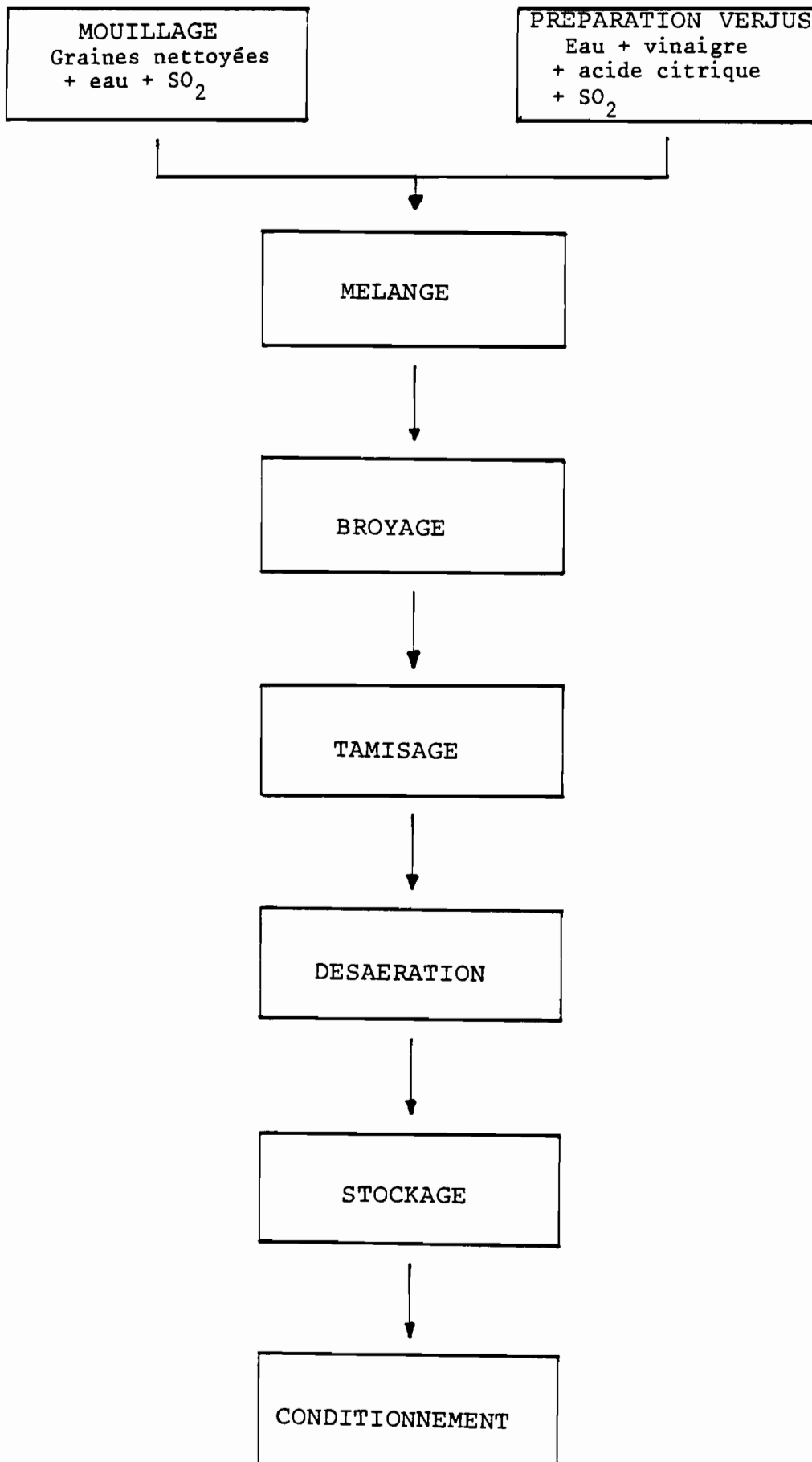
- Analyse par électrophorèse et par immunoélectrophorèse à des fins taxonomiques (VAUGHAN et DENFORD, 1968 ; VAUGHAN et al., 1968).

- Etude des thioglucosides et des thioglucosidases qui sont responsables de la formation future de l'arôme.

- Analyse des protéines hydrosolubles et des acides aminés (BOUQUET, 1971).

A notre connaissance, aucun travail portant sur le devenir des protéines au cours de la fabrication et de la conservation de la moutarde n'a été entrepris. Notre objectif est de contribuer à une meilleure connaissance de ce problème.

Tableau 1 : Fabrication de la moutarde



2 - Fabrication de la moutarde

Brassica nigra et *Brassica juncea* sont, traditionnellement, utilisées dans la fabrication de la moutarde de Dijon. *Brassica nigra* possède une plus forte teneur en allylsénévol ou isothiocyanate d'allyle (1 à 1,5 %) que *Brassica juncea* (0,8 à 1 %). Néanmoins, et pour des raisons économiques, seule la dernière espèce est, actuellement employée dans la confection de la moutarde. En effet, *Brassica nigra* perd beaucoup de graines lors de l'ouverture de sa silique déhiscente.

La fabrication de la pâte de moutarde est une suite d'opérations unitaires.

- . Nettoyage des graines par tamisage pour éliminer les plus gros éléments étrangers et par passage dans un cylindre de dépoussiérage.

- . Mouillage des graines avec de l'eau contenant de l'anhydride sulfureux (500 ppm) sous forme de métabisulfite. Cette opération permet un gonflement des téguments.

- . Addition d'une solution qui peut être du verjus (jus de raisin vert), du vin blanc ou rouge, du moût de raisin ou du vinaigre. Des additifs sont ajoutés : acides tartrique, citrique et surtout SO₂ ; ainsi que de petites quantités de sel, de sucre et éventuellement d'épices et d'aromates.

La moutarde finale doit contenir, au moins, 28 % de matières sèches (décret du 10 septembre 1937).

- . Broyage des graines avec des meules ou avec des broyeurs à micro-coupe.

- . Tamisage avec des tamis en acier inoxydable.

La moutarde de Dijon doit contenir moins de 2 % de sons. La moutarde à l'ancienne, quant à elle, n'est pas tamisée.

- . Désaération de la pâte par simple malaxage dans des cuves ou à l'aide d'un disque qui projette la moutarde à travers des trous très fins.

- . Stockage de 1/2 à 3 jours pour éliminer l'amertume de la pâte.

- . Conditionnement.

La production annuelle française de moutarde est d'environ 40.000 tonnes.

Caractéristiques de la pâte de moutarde :

- . Teneurs réglementaires

Anhydride sulfureux : teneur inférieure à 500 ppm.

Sons : teneur inférieure à 2 %.

Matières sèches : teneur supérieure à 28 %.

. Composition de la pâte de moutarde de Dijon, selon COUTTON (1977)

Matières grasses	10 à 12%
Matières azotées	6 à 8 %
Sucres totaux	2 à 4 %
Matières minérales	1 % + 6 à 9 % NaCl

. pH

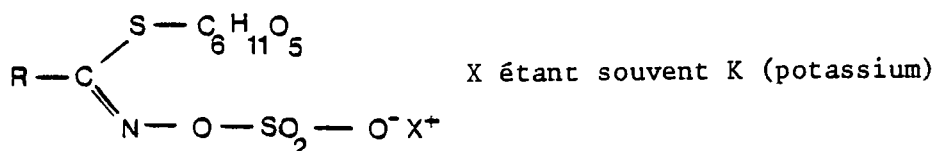
3,5 ≤ pH ≤ 3,8

3 - Les thioglucosides et leur devenir.

31. Structure des thioglucosides.

Les graines de crucifères ont une teneur élevée en protéines de bonne qualité nutritionnelle. Elles renferment, aussi, des thioglucosides dont les produits de dégradation constituent l'arôme caractéristique des pâtes.

La structure générale, probablement unique, est celle proposée par ETTLINGER et LUNDEEN en 1956. Les thioglucosides diffèrent par la nature chimique de leurs chaînes latérales.



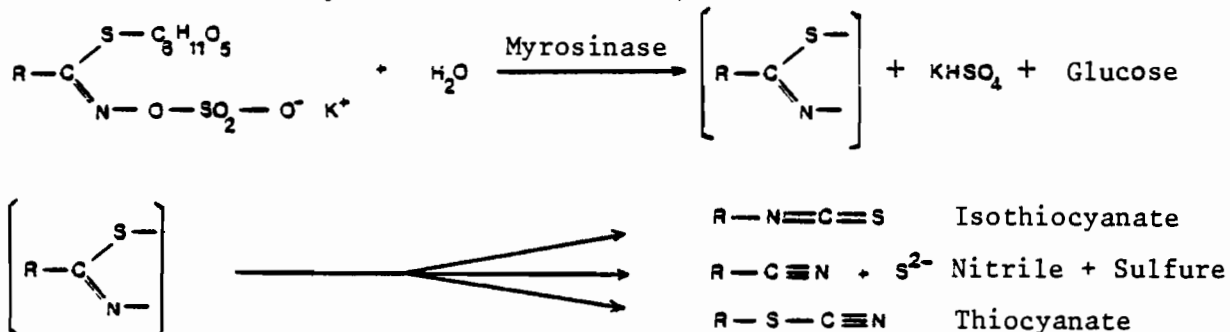
Exemple ; Pour l'allylthioglucoside(ou sinigrine), R est :



Les thioglucosides semblent se répartir dans la plante entière : dans les tissus parenchymateux, surtout dans l'écorce (GUIGNARD, 1890), et dans l'embryon de la graine. Pour une espèce donnée, KJAER (1960) signale une différence quantitative et surtout qualitative sur la répartition des thioglucosides dans la plante. Ainsi les graines de *Brassica nigra*, contiennent l'allylthioglucoside, alors que dans ses racines, on trouve le 2-phényléthylthioglucoside.

32. Hydrolyse des thioglucosides.

Les thioglucosides sont dégradés, en présence d'eau et d'une thioglucosidase communément appelée myrosinase (thioglucoside glucohydrolase : EC 3.2.3.1), suivant la réaction (d'après VAN ETTEN et al., 1969) :



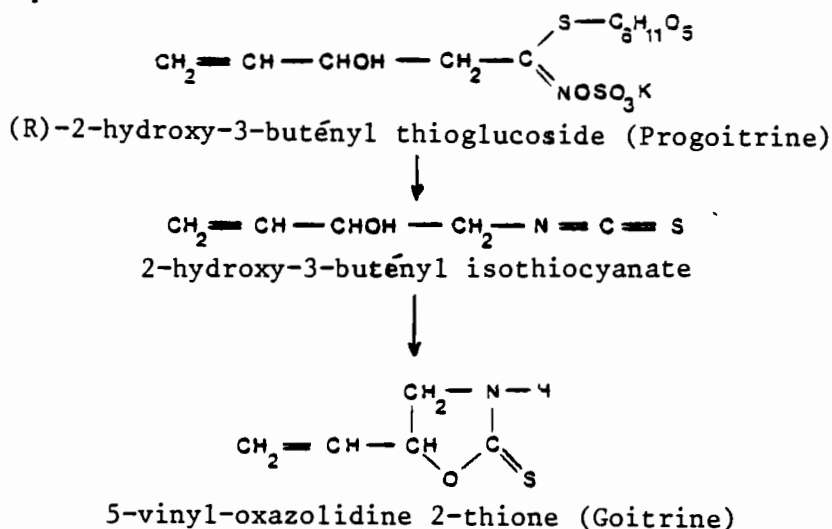
L'hydrolyse des thioglucosides donne toujours du glucose et du sulfate acide de potassium. La formation d'isothiocyanates, de thiocyanates et de nitriles dépend de conditions et de facteurs qui ne sont pas encore tous connus (VAN ETTEN et al., 1969 et VIRTANEN, 1965).

L'isothiocyanate formé, donne en présence de R'OH, du thiouréthane. Cette réaction est non enzymatique.



Lorsque R' appartient à la molécule d'isothiocyanate, il se forme des hétérocycles ou des polymères.

Exemple :



Plusieurs oxazolidine-thiones ont des actions goitrigènes (GREER, 1962) Néanmoins il est heureux de constater que ces composés n'apparaissent pas dans la moutarde de Dijon car la sinigrine est le seul thioglucoside de la graine de *Brassica juncea* (VAN ETEN et al., 1969).

33. Rôles biologiques des thioglucosides et dérivés.

L'action de la thioglucosidase est recherchée dans la confection de condiments. La flaveur piquante de la moutarde est liée, essentiellement, à la présence de l'isothiocyanate d'allyle.

Cependant, à très fortes doses, les dérivés des thioglucosides ont des effets néfastes sur la santé. BARKER (1936) observe que l'ion thiocyanate utilisé dans le traitement de l'hypertension peut agir comme goitrigène chez l'homme, en abaissant, probablement, la concentration en iode dans la thyroïde (action antithyroïdienne).

LANGER et collaborateurs ont provoqué une hyperthyroïdisme en gavant des rats avec des doses journalières élevées d'isothiocyanate d'allyle. (LANGER, 1964 ; LANGER et STOLC, 1965).

Des rats, recevant des rations riches en nitriles, sont victimes d'une hyperhépatie, d'une hyperplasie du canal biliaire, d'une fibrose et d'une mégalocytose des hépatocytes. Les reins sont hypertrophiés avec des lésions reinales au niveau des cellules épithéliales tubulaires (VAN ETEN et al., 1969). Cependant, la dose létale (DL 50) du nitrile le plus actif sur les rats, indiquée par ces derniers auteurs est de 170 ppm par kg. Ce qui correspond, si l'on suppose que toute la sinigrine se transforme en nitrile, à une prise unique de 15 kg de pâte de moutarde pour un homme de 75 kg.

Les thioglucosides participeraient à la protection de la plante. En effet, leur hydrolyse enzymatique, après la désintégration cellulaire, produit des aglycones pourvus de pouvoirs bactéricide et fongicide. Ces aglycones joueraient donc un rôle "antibiotique" dans les plantes supérieures.

4 - Propriétés et fonctions des myrosinases.

La myrosinase ou thioglucoside glucohydrolase : EC 3.2.3.1 catalyse l'hydrolyse enzymatique des thioglucosides. La structure chimique unique des substrats et la diversité des produits de la réaction ont stimulé les recherches sur cette enzyme depuis sa découverte par BUSSY en 1840.

41. Localisation.

La myrosinase est présente dans tous les tissus des plantes à thioglucosides. Son activité décroît tout au long du développement de la plante mais elle reste décelable au stade floral (IVERSEN et BAGGERUD 1980).

Elle est localisée essentiellement dans des cellules particulières ou idioblastes (GUIGNARD, 1890, SCHWEIDLER 1905, PECHE, 1913).

PHELAN et VAUGHAN (1980), en étudiant des graines en germination et des jeunes plantes de *Sinapis alba*, ont mis en évidence une bonne corrélation entre l'apparition de la myrosinase dans les organes et la présence des idioblastes. Selon ces mêmes auteurs, les cellules à myrosinase sont absentes dans les racines et les fleurs de *Sinapis alba*. La présence des idioblastes dans les racines n'est, donc, pas générale puisque IVERSEN et BAGGERUD (1979) ne l'ont constatée que dans la tribu des Brassicacées.

MATILE (1980) montre que dans les tissus racinaires du raifort, la myrosinase est localisée à l'extérieur des cellules : dans la paroi cellulaire ou liée au plasmalemme.

42. Nature et mode d'action de la myrosinase.

La nature et le mode d'action de la myrosinase ont fait l'objet de beaucoup de controverses.

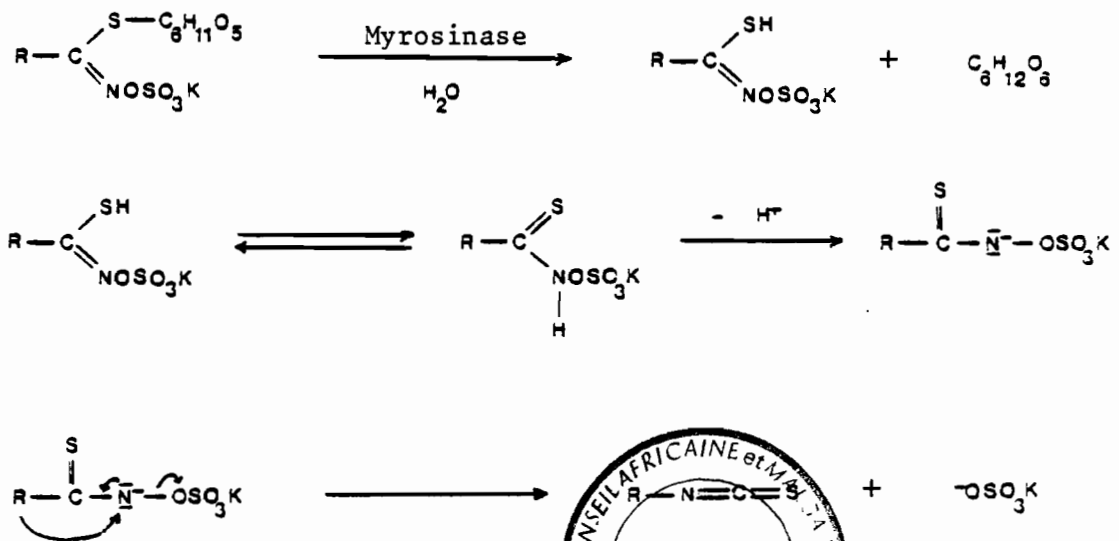
VON EULER et ERIKSON (1926) signalent que la myrosinase est composée de 2 enzymes : une thioglucosidase et une sulfatase ; l'action de la première étant plus rapide. La nature double de la myrosinase a été confirmée par SANDBERG et HOLLY (1932) mais pour ces derniers auteurs, les 2 enzymes agiraient en même temps.

ETTLINGER et LUNDEEN (1956) indiquent la possibilité d'une myrosinase unique et proposent, pour la formation de l'isothiocyanate le mécanisme suivant :

- La première étape est constituée par l'hydrolyse enzymatique de la liaison thioglucosidique.

- Il s'ensuit un réarrangement spontané de la molécule aglycone (ou réarrangement de Lossen), qui aboutit à l'élimination du sulfate.

NAGASHIMA et UCHIYAMA (1959) apportent une preuve expérimentale de l'unicité de la myrosinase et appuient l'hypothèse du réarrangement de Lossen.



NAGASHIMA et UCHIYAMA observent, en outre que la myrosinase est inhibée par les substances qui réagissent avec le groupe - SH et activée par l'acide ascorbique.

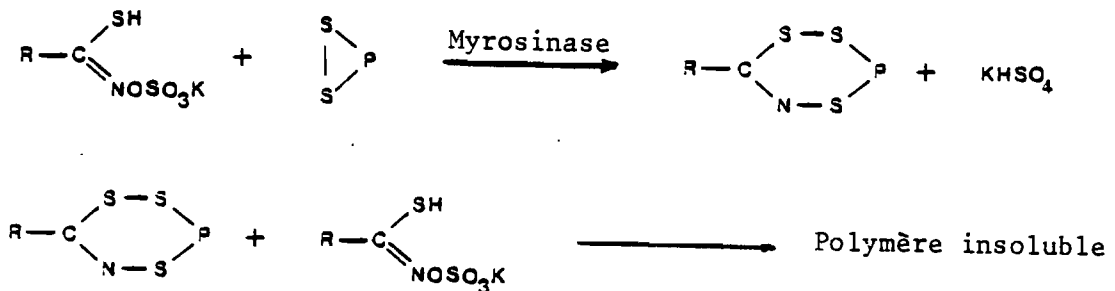
GMELIN et VIRTANEN (1959) remarquent, chez *Lepidium rudaie*, *Thlaspi arvense* ou *Lepidium sativum*, la production enzymatique de thiocyanate dont le mécanisme serait analogue à celui de la formation de l'isothiocyanate (réarrangement de Lossen).

Cependant, le facteur qui oriente le radical R- sur l'atome d'azote ou de soufre est encore inconnu.

ETTLINGER et al. (1961) avancent qu'il existe 2 enzymes dont seulement une est activée par l'acide ascorbique.

GAINES et GOERING (1960 et 1962) pensent avoir séparé à pH3 la thioglucosidase de la sulfatase par méthode chromatographique sur DEAE cellulose échangeuse d'ions, à partir des graines de *Brassica juncea*.

SCHWIMMER (1960) a mis en évidence, à partir de la sinigrine, la formation de trouble catalysée par la myrosinase à pH3. Le trouble résulterait de la réaction du 3 - butényl - thiohydroxymylsulfate avec les protéines ayant des ponts disulfures selon le mécanisme suivant :



A la lumière de ces observations, les conclusions de GAINES et GOERING (1960 et 1962) peuvent être expliquées par le degré de purification de la solution enzymatique.

Une préparation très pure donne une solution pauvre en protéines non enzymatiques. Ce qui peut réduire la quantité de protéines à ponts disulfures au point d'empêcher l'apparition de HSO_4^- selon le mécanisme de SCHWIMMER.

D'autre part la purification peut éliminer des composés avides en ions H^+ d'où une inhibition du réarrangement de Lossen à pH3. Une solution de myrosinase très pure mise au contact de la sinigrine produirait ainsi une accumulation de glucose et de 3 - butényl-thiohydroxymyl sulfate.

La deuxième fraction de GAINES et GOERING pourrait correspondre à une solution de myrosinase peu purifiée. La quantité d'enzyme pourrait être si faible que la libération de glucose consécutive à l'hydrolyse de la sinigrine soit indécélable par la méthode de dosage.

Par contre le mélange des 2 fractions apporte suffisamment de myrosinase et des facteurs favorisant le réarrangement de Lossen, d'où une production de glucose, de sulfate et d'isothiocyanate.

Selon ces travaux la myrosinase serait donc une enzyme unique. Cette thèse est confirmée par les travaux de TSURUO et al. (1967). En effet, ces auteurs n'ont pas réussi, avec les méthodes utilisées par GAINES et GOERING, à séparer la thioglucosidase de la sulfatase à partir des graines de *Brassica juncea*.

43. Structure de la Myrosinase.

Les thioglucosides sont hydrolysés par une enzyme qui, cependant, est constituée d'un groupe d'isoenzymes.

L'enzyme est une thioglucoside glucohydrolase classée EC 3.2.3.1 (FLORKIN et STOTZ, 1965).

La purification de la myrosinase des graines et la séparation des isoenzymes ont fait l'objet de beaucoup d'études.

La myrosinase de graines de *Brassica juncea* présente 2 isoenzymes après passage sur cellulose échangeuse d'ions (TSURUO et al., 1967) mais une seule isoenzyme après analyse par électrophorèse sur gel d'amidon (VAUGHAN et al., 1968).

Le fractionnement de la myrosinase par chromatographie sur DEAE cellulose montre trois isoenzymes pour les graines de *Sinapis alba* et quatre isoenzymes pour les graines de *Brassica napus* (BJÖRKMAN et JANSON 1972, LONNERDAL et JANSON, 1973).

L'étude effectuée par électrophorèse sur gel d'acrylamide, sur plusieurs espèces de crucifères montre que le nombre des isoenzymes de la myrosinase varie d'une espèce à l'autre mais aussi suivant les organes d'une même plante (MAC GIBBON et ALLISON, 1970, PIHAKASI et PIHAKASKI, 1978).

Les isoenzymes purifiées à l'heure actuelle, sont des glycoprotéines de poids moléculaires variant entre 125 000 et 155 000. La partie glucidique constituée essentiellement d'hexoses représente suivant les espèces entre 9 et 23 % de la molécule. Les pH isoélectriques des différentes isoenzymes sont compris entre 4,6 et 6,2 (BJÖRKMAN, 1976).

Le site actif de la myrosinase de plante semble contenir des groupes aminés, des groupes sulfhydryles et un résidu histidyle. Ainsi la myrosinase a, au moins, quatre groupements sulfhydryles qui sont actifs à l'état natif (OHTSURU et HATA, 1973a).

Les isoenzymes sont composées de sous-unités identiques (BJÖRKMAN et JANSON 1972). LONNERDAL et JANSON (1973) ont obtenu 2 sous-unités pour les molécules de myrosinase de graines de *Sinapis alba* et de *Brassica napus* par chromatographie sur gel de Sepharose 6B avec le tampon guanidine - HCl comme éluant. OHTSURU et HATA (1972) trouvent, pour les isoenzymes d'une poudre de moutarde *Brassica juncea*, quatre sous-unités après électrophorèse sur gel de polyacrylamide contenant du SDS (Sodium duodecyl-Sulfate)

44. Effet de l'acide ascorbique.

L'étude de l'influence de l'acide ascorbique sur l'activité de la myrosinase a donné des résultats divers et parfois contradictoires depuis que NAGASHIMA et UCHIYAMA (1959) ont considéré cet acide comme un cofacteur de l'enzyme.

ETTLINGER et al. (1961) séparent par extraction deux enzymes à partir des graines de *Sinapis alba*. Ces deux isoenzymes se comportent différemment en présence de l'acide ascorbique qui n'affecte pas l'activité de l'une alors qu'il est indispensable pour l'activité de l'autre.

TSURUO et al. (1967) indiquent que les deux isoenzymes de la myrosinase isolées à partir de graines de *Brassica juncea* ont le même comportement vis-à-vis de l'acide ascorbique.

VOSE (1972) obtient avec les isoenzymes de *Sinapis alba* des réponses à l'acide ascorbique dissemblables selon la technique de purification. En effet, les isoenzymes séparées par électrofocalisation sont toutes activées par l'ascorbate ; les taux d'activation sont cependant très différents. Par contre, après étude des 2 isoenzymes purifiées par chromatographie échangeuse d'ions (DEAE et TEAE cellulose), l'auteur note une activation de l'une et une inhibition de l'autre.

BJÖRKMAN et JANSON (1972) trouvent que les trois isoenzymes de *Sinapis alba* sont activées jusqu'à une concentration de 1mM d'acide ascorbique ;

mais le taux d'activation dépend de l'isoenzyme.

HENDERSON et MC EWEN (1972) ont étudié l'effet de l'acide ascorbique sur les isoenzymes de myrosinase de graines oléagineuses. *Sinapis alba* possède une isoenzyme non affectée et au moins une isoenzyme activée par l'acide ascorbique.

OHTSURU et HATA (1972) trouvent quatre isoenzymes à partir d'une farine de moutarde de *Brassica juncea* qui sont toutes activées par l'acide ascorbique. Cependant, l'activité d'une isoenzyme est accrue de 50 fois alors que celle des autres l'est de 100 fois.

Le mécanisme de l'action de l'acide ascorbique n'est pas encore complètement connu mais nous disposons de plusieurs éléments qui sont à l'origine ou qui renforcent l'hypothèse de TSURUO et HATA (1968c). L'influence de l'ascorbate sur l'activité de la myrosinase dépend de la concentration en effecteur. Aux concentrations faibles, toutes les isoenzymes testées sont activées. L'activation croît avec la teneur en acide ascorbique jusqu'à une concentration d'environ 1mM. Aux concentrations élevées, l'ascorbate agit comme inhibiteur de l'activité de l'isoenzyme ; activité qui est complètement inhibée aux concentrations en acide ascorbique supérieures à 10 mM (BJÖRKMAN et LONNERDAL 1973).

L'effet de l'acide ascorbique sur la myrosinase n'est pas fondé sur les propriétés d'oxydo-réduction de l'ascorbate : en effet, ETTLINGER et al. (1961) ont étudié l'action sur la myrosinase de plusieurs analogues de l'acide ascorbique. Beaucoup d'entre eux, comme le 2-*o*-méthyl - L - ascorbate, agissent comme des co-enzymes mais avec des taux d'activation moindres que celui de l'ascorbate.

De plus, TSURUO et HATA (1967) montrent, en utilisant l'ascorbate oxydase, que l'acide ascorbique est fortement fixé sur l'enzyme. Cette fixation de l'ascorbate sur l'enzyme est confirmée par BJÖRKMAN et LÖNNERDAL en 1973.

OHTSURU et HATA (1973b) montrent que l'effet de l'acide ascorbique ne résulte pas d'un phénomène de dissociation-association des sous-unités de l'enzyme mais d'un changement dans la conformation de la protéine.

REESE et al. (1958) observent que le p-nitrophényl- β -glucoside peut être un substrat de la myrosinase. TSURUO et HATA (1968c) notent que ce système enzyme-substrat n'est pas activé par l'acide ascorbique. Cependant, des teneurs élevées en ascorbate, provoquent une inhibition de la dégradation du p-nitrophényl- β -glucoside par la myrosinase. Cela a permis à ces auteurs d'élaborer une hypothèse sur le mécanisme d'action de l'acide ascorbique. La myrosinase aurait un site d'action (S) pour le substrat et deux sites pour l'effecteur (E_1 et E_2). Le site du substrat comprendrait deux parties : le site S_1 pour la portion glycone et le site S_2 pour le segment aglycone du thioglucoside.

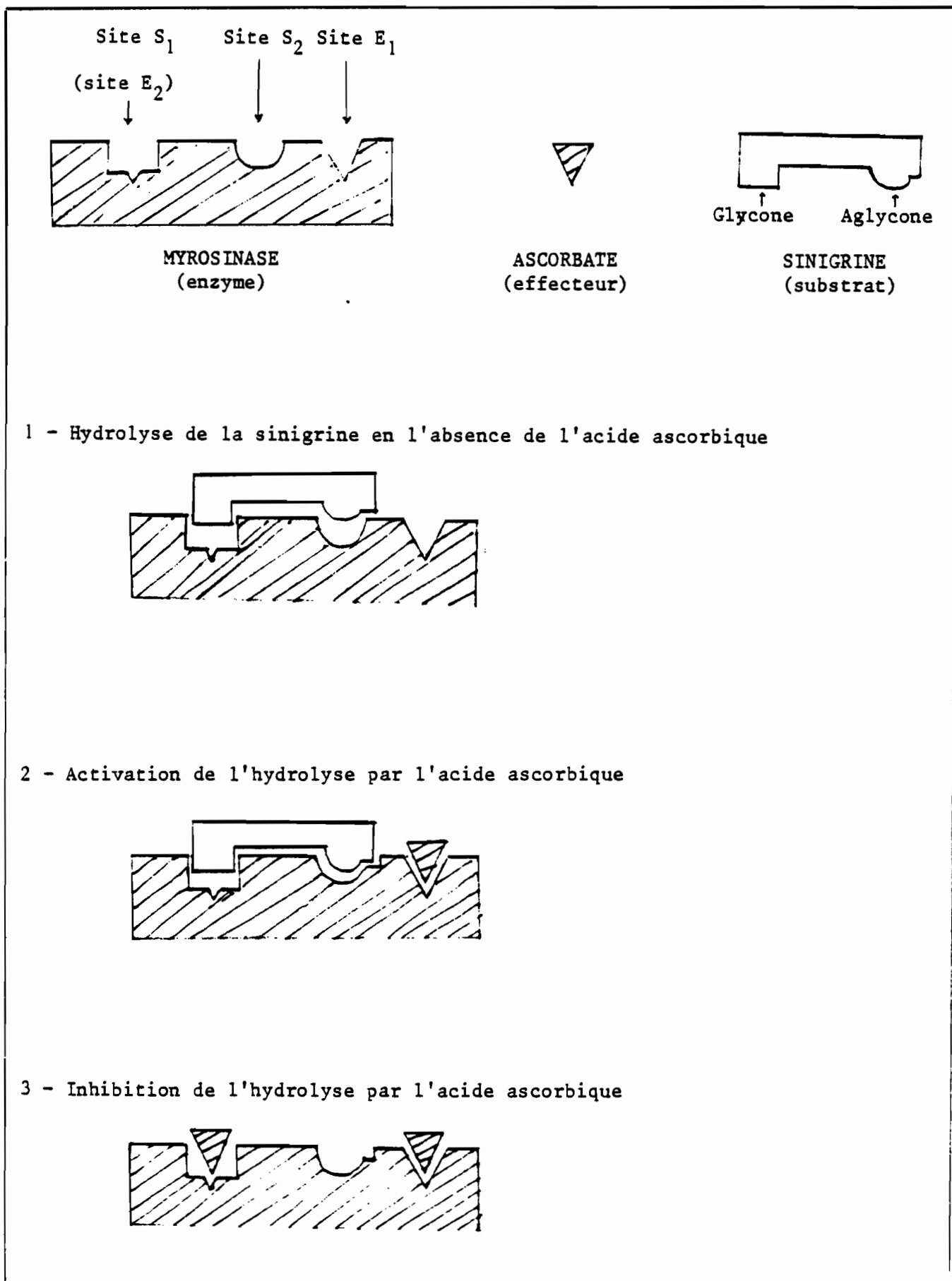
Lorsque l'ascorbate se fixe sur son site E_1 , il y a altération de la conformation du site S_2 permettant un meilleur contact entre l'enzyme et le substrat. A haute teneur en ascorbate, il y a inhibition de l'activité de la myrosinase car le site E_2 de l'acide ascorbique correspond au site S_1 du thioglucoside. (voir tableau 2)

OHTSURU et HATA (1975) montrent que la myrosinase a quatre sites par molécule qui fixent plutôt fortement l'acide ascorbique et au moins un site supplémentaire qui fixe moins fortement l'ascorbate.

OHTSURU et HATA (1979) précisent que l'addition d'acide ascorbique provoque un changement dans la conformation de l'enzyme aboutissant à une apparition de résidus aminés à la surface et une disparition de résidus de tryptophane dans la zone altérée par l'acide (près du site S_2).

Les groupes sulfhydryles indispensables à l'activité catalytique de l'enzyme sont localisés près du site S_1 .

Tableau 2 : Mode d'action de l'acide ascorbique (TSURUO et HATA, 1968)



45. Propriétés de la myrosinase.

Il existe environ 60 thioglucosides naturels qui peuvent être substrats de la myrosinase. BJÖRKMAN et LÖNNERDAL (1973) ont analysé l'action des isoenzymes des graines de *Sinapis alba* et *Brassica napus* sur plusieurs substrats et n'ont pas observé de différence ni entre les isoenzymes de même origine ni entre les myrosinases de *Sinapis alba* et de *Brassica napus*. Il ne semble donc pas y avoir de spécificité marquée des myrosinases pour un substrat donné.

451. Influence du pH sur l'activité de la myrosinase.

L'activité de la myrosinase est fonction du pH. Chaque isoenzyme présente une zone de pH optimum qui dépend de la pureté de l'enzyme, du type et de la concentration du tampon. Cette zone est comprise entre les pH 4,5 et 9.

Le pH intervient aussi sur la nature du produit de la réaction. Ainsi, l'isothiocyanate est obtenu au pH neutre alors que le nitrile se forme en milieu acide (pH inférieur à 3).

D'autre part, SCHWIMMER (1960) rapporte qu'à pH 3, la myrosinase catalyse la formation d'un trouble résultant de la réaction du 3-buténylthiohydroxymylsulfate avec des protéines à ponts disulfures.

Il est à noter que le pH de la moutarde de Dijon est compris entre 3,5 et 4,2.

452. Influence de la température.

L'activité de la myrosinase croît avec la température jusqu'à environ 60-65°C. Au delà de cette température la dénaturation de l'enzyme commence. La température optimum diminue en présence de l'acide ascorbique (35°C pour la myrosinase de *Brassica juncea* ; OHTSURU et HATA, 1979), en raison de la thermosensibilité de l'effecteur.

ANDRE et DUROU-CARBOUERES (1957) ont montré qu'une enzyme, la désulfurase des sénévols dégrade l'allylsénévol en nitrile et en sulfure. Néanmoins, cette désulfurase ne doit pas être active dans la pâte de

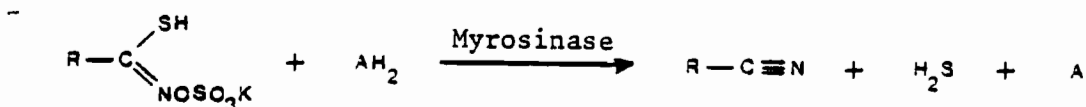
moutarde puisque son activité est inhibée, à toute température, aux pH inférieurs à 4,5 (VANGHEESDAELE et BICHOT, 1970).

453. Influence de l'acide ascorbique.

A faible concentration, l'acide ascorbique active la myrosinase. On observe, en même temps que l'augmentation de la vitesse de la réaction, une baisse de l'affinité de l'enzyme pour son substrat.

L'acide ascorbique n'a donc pas le comportement normal d'un effecteur positif. (BJÖRKMAN 1976).

SCHWIMMER (1960) signale la production de H₂S catalysée par la myrosinase à pH 3, en présence de l'acide ascorbique (AH₂) selon le mécanisme suivant :



L'effet inhibiteur de l'acide ascorbique, à fortes doses, provient d'une part, d'une compétition au niveau du site du substrat entre l'ascorbate et le thioglucoside et d'autre part, d'une instabilité du complexe enzyme-substrat (BJÖRKMAN et LÖNNERDAL, 1973).

454. Effet des substances organiques et inorganiques.

Divers sucres et glucosides inhibent les myrosinases à des concentrations beaucoup plus élevées que celle du substrat. Ainsi le glucose est un inhibiteur compétitif lorsque la teneur en sinigrine est faible (TSURUO et HATA, 1968b). Le glucose n'affecte pas la liaison entre l'enzyme et l'acide ascorbique. Le saccharose quant à lui, n'inhibe pas l'activité enzymatique.

TSURUO et HATA (1968a) rapportent que des sels contenant des anions monovalents ont un effet inhibiteur qui est notable sur la myrosinase en état d'activation par l'acide ascorbique et faible sur l'enzyme non activée. Cet effet inhibiteur n'est pas observé avec des anions divalents.

NAGASHIMA (1959) montre que la myrosinase brute est inhibée à 85 % par des ions de métaux lourds Hg^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} et Cu^{2+} . Cependant SEARLE et al. (1982) notent que les ions ferreux accélèrent la dégradation du méthylène-3-indolylméthylglucosinolate en méthylène-3-indolylacétonitrile (précurseur de l'auxine) par la myrosinase de *Sinapis alba*. D'autre part VANGHEESDAELE et FOURNIER (1977) indiquent que les sels cuivreux désulfurent les thioglucosides pour donner les nitriles correspondants.

455. Stabilité de la myrosinase.

BJÖRKMAN et LÖNNERDAL (1973) ont étudié la stabilité des myrosinases de *Sinapis alba* et *Brassica napus*, au cours de la conservation. Cette stabilité dépend de la pureté de la solution enzymatique, du tampon et des conditions de température et de pH.

Les enzymes purifiées sont plus stables que les préparations brutes. En solution, l'enzyme se conserve bien dans le tampon imidazole à pH 6 et à 4°C.

La congélation complète détruit les enzymes purifiées mais n'entraîne pas de changement notable sur l'activité de l'extrait brut.

46. Les thioglucosidases d'origine microbienne.

Une thioglucosidase appelée sinigrinase a été trouvée chez les moisissures notamment *Aspergillus sidowi* dont l'enzyme est constitutive (REESE et al. 1958, OHTSURU et al., 1969a, 1969b), *Aspergillus niger* (OHTSURU et HATA, 1973c; OHTSURU et al., 1973), chez des bactéries (OGINSKY et al., 1965 ; TANI et al., 1974a, 1974b) et même chez des mammifères au niveau de certaines tumeurs (GOODMAN et al., 1959).

La sinigrinase possède les deux activités thioglucosidase et sulfatase. Néanmoins, elle semble être beaucoup moins spécifique que la myrosinase des plantes. REESE et al. (1958) notent que, contrairement à la myrosinase, la sinigrinase hydrolyse tous les β -glucosides testés, le maltose l'amidon et le saccharose.

La myrosinase présente une affinité vis-à-vis de la sinigrine vingt fois plus importante que celle de la sinigrinase (OHTSURU et al., 1969a).

La thioglucosidase d'origine microbienne est moins stable dans des conditions de pH acide ou alcalin. Elle est, également, plus thermosensible que la myrosinase.

L'effet des ions sur l'activité de la sinigrinase dépend de l'origine de l'enzyme. Ainsi l'ion cuivrique n'a pas d'effet (à une concentration de 10^{-3} M) sur la sinigrinase d'*Aspergillus sidowi* (REESE et al., 1958), alors qu'il active la thioglucosidase d'*Aspergillus niger* (OHTSURU et HATA, 1973c) et inhibe fortement l'enzyme d'*Enterobacter cloacea* (TANI et al., 1974a).

MATERIEL ET METHODES

1 - Matériel végétal

Notre travail a porté sur trois types d'échantillons de *Brassica juncea*

- Des échantillons de la matière première à savoir la graine et ses constituants anatomiques.

La séparation des amandes et des téguments a été effectuée par insufflation d'air au laboratoire de l'I.N.R.A. de Nantes. Cette opération très délicate, en raison de la petite taille des graines, permet d'obtenir trois fractions "amandes fines", "amandes grosses" et "pellicules".

- Des échantillons de pâtes de moutarde en cours de fabrication. Ce lot comporte le broyat, la pâte tamisée et la moutarde achevée. Nous avons effectué sur ces échantillons le dosage des acides aminés libres.

- Des échantillons de pâtes de moutarde avec et sans SO₂ en cours de conservation.

Nous remercions vivement les sociétés SEGMA MAILLE et AMORA ainsi que l'I.N.R.A. de Nantes qui nous ont fourni ces échantillons.

2 - Broyage des graines, des amandes et des pellicules.

Un broyage, à l'aide d'un broyeur "MOULINEX", est effectué pendant 30 secondes sur 40 g environ de matière première préalablement congelée dans l'azote liquide. Cette opération est répétée 4 fois.

3 - Délipidation

Les broyats, obtenus précédemment, ainsi que les pâtes de moutarde sont délipidés par lavage sur Büchner avec de l'acétone jusqu'à obtention d'un filtrat incolore. Les pâtes délipidées sont ensuite séchées, sous vide,

dans un dessiccateur.

4 - Dosage de l'azote total.

Ce dosage a été effectué sur les graines, les amandes, les pellicules et sur les différentes farines délipidées. Nous avons utilisé la méthode de KJELDAHL

Les protéines brutes sont déterminées par calcul, à partir de l'azote total en adoptant le coefficient 6,25.

5 - Dosage des acides aminés.

51. Hydrolyse acide des protéines.

L'hydrolyse acide est effectuée sur les farines délipidées des graines, des amandes et des pellicules.

On introduit une petite quantité de farine délipidée (20 mg de farine d'amandes ; 20 mg de farine de graines entières ; ou 40 mg de farine de pellicules), et 6 ml de solution d'acide chlorhydrique (HCl 5 N) dans une ampoule qui, après congélation dans l'azote liquide, est scellée sous vide. L'hydrolyse est opérée pendant 12 heures à 120°C. L'échantillon hydrolysé est évaporé dans un dessiccateur, puis repris dans 1 ml de solution d'acide chlorhydrique (HCl 0,1 N), et enfin, filtré à l'aide d'une seringue munie d'un embout à membrane filtrante. Les acides aminés totaux, ainsi obtenus, sont placés au congélateur jusqu'au dosage.

52. Extraction des acides aminés libres.

Les analyses sont effectuées sur les farines délipidées des pâtes prélevées au cours de la fabrication de la moutarde. On met en suspension 2 g de farine dans 15 ml de solution de chlorure de sodium (solution NaCl 0,5 M, pH 8), puis on centrifuge 20 minutes à 800 g. On réalise une deuxième extraction avec 15 ml de la solution de chlorure de sodium. Les surnageants d'un même échantillon sont rassemblés (solution S). On fait passer 8 ml de la solution S dans une colonne de résine

échangeuse de cations : Dowex 50. Les acides aminés fixés sur la résine sont élués avec 10 ml d'ammoniaque (5N). Les éluats sont évaporés dans un dessiccateur sous vide et les extraits secs sont repris dans 1 ml d'acide chlorhydrique (0,1N) (Solution S').

Les solutions S' sont conservées au congélateur jusqu'à l'analyse.

53. Chromatographie en phase liquide des acides aminés.

531. Dosage des acides aminés.

L'analyse est effectuée, à l'aide d'un auto-analyseur Technicon, selon la méthode de MOORE et STEIN (1951 et 1954) améliorée par BENSON et al. (1967).

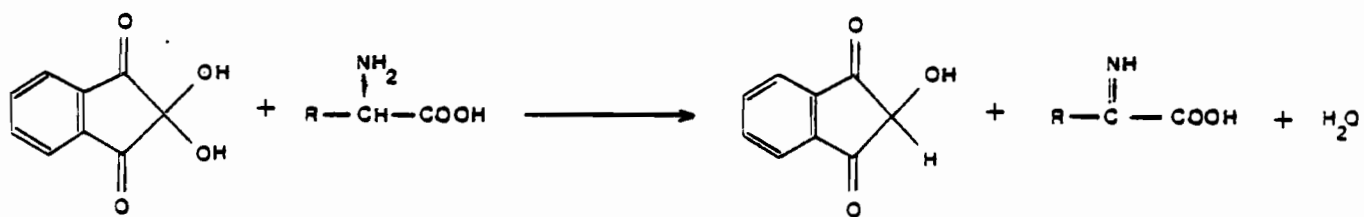
La colonne est remplie de particules solides d'une résine de polystyrène sulfoné (type C₃), sous forme lithium, c'est-à-dire préalablement équilibrée avec une solution d'hydroxyde de lithium (LiOH 0,3M), de façon que tous les ions H⁺ des groupements acides sulfoniques soient remplacés par des ions Li⁺. Lorsque des acides aminés, chargés positivement sont introduits dans la colonne, ils déplacent les ions Li⁺ et se fixent sur la résine. Cette fixation dépend entre autres, du pH, de la force ionique et de la température de la colonne. Les acides aminés sont, ensuite, élués par des solutions tampons dont le pH varie de 2,75 à 4,10.

	Tampon citrate pH 2,75	Tampon citrate pH 3,50	Tampon citrate pH 4,10	Régénération de la colonne (Solution LiOH 0,3M)
Durée de passage (mn)	96	46	40	30
Température de la colonne	37°C	37°C	55°C	-
Acides Aminés Élués	Asp, Hypro, Thr, Ser, Asn, Glu, Pro, Gly, Ala, Val,	Cys Met Ile Leu Nle	Tyr, Phe, Orn Lys His Arg	-

Pour séparer l'asparagine de l'acide glutamique, dans le dosage des acides aminés libres, la température de la colonne en début d'analyse est portée à 32°C.

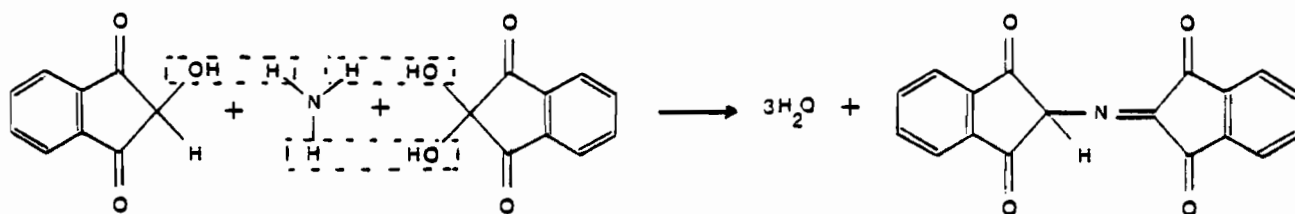
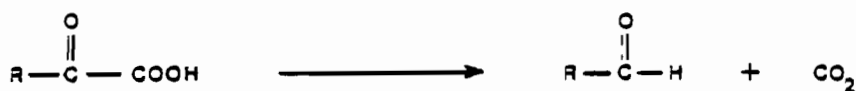
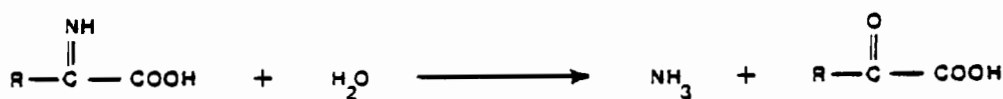
Les acides aminés élués sont révélés à 95°C par une solution de ninhydrine.

Le mécanisme de la production du composé coloré fait intervenir le groupement - NH₂ en position α de la fonction acide.

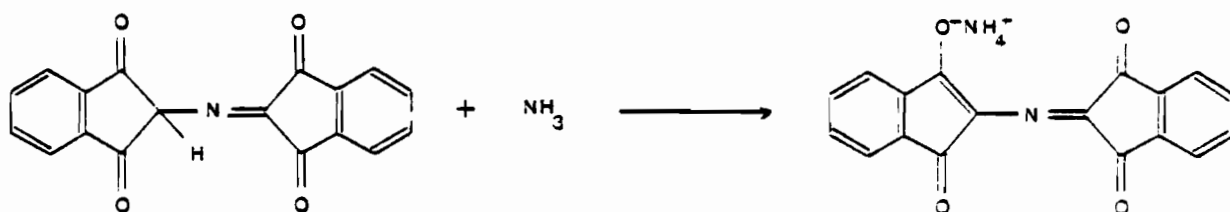


Ninhydrine

Hydrindantine



Composé pourpre



Composé bleu

Il se forme, donc, une coloration violette pour l'ensemble des acides aminés sauf pour la proline et l'hydroxyproline dont l'azote iminé est engagé dans un cycle. Ces derniers développent une coloration jaune. L'intensité de la coloration obtenue est mesurée dans un colorimètre à 410 nm.

La durée totale d'une analyse est d'environ 200 minutes.

532. Méthodes de calcul.

L'analyse s'effectue en présence d'un étalon interne, ici, la norleucine qui est un acide aminé de synthèse. Elle se fait en deux temps : l'analyse d'une solution standard d'acides aminés, puis de la solution à étudier.

. Première injection

- . a (ml) : volume de solution standard de molarité m (μ moles/ml)
- . i_1 (ml) : volume de solution d'étalon interne

. Deuxième injection

- . v (ml) : volume de l'échantillon à doser
- . i_2 (ml) : volume de solution d'étalon interne.

Considérons que l'acide aminé à doser est la lysine. On obtient après analyses :

- . x_1 : surface du pic de la norleucine (1^{ère} injection)
- . y : surface du pic de la lysine de la solution standard
- . x_2 : surface du pic de la norleucine (2^o injection)
- . s : surface de la lysine de l'échantillon

On définit le coefficient de réponse $K = \frac{\text{surface du pic de la lysine}}{\text{surface du pic de la norleucine}}$

$$K_1 = \frac{\text{surface du pic de la lysine de la solution standard } y}{\text{surface du pic de la norleucine (1^{ère} injection) } x_1} = \frac{y}{x_1}$$

soit $y = K_1 x_1$

$$K_2 = \frac{\text{surface du pic de la lysine de l'échantillon}}{\text{surface du pic de la norleucine (2° injection)}} = \frac{s}{x_2}$$

$$\text{soit } s = K_2 x_2$$

Soient q_1 (μmoles), la quantité de lysine dans le standard à injection
et q_2 (μmoles), la quantité de lysine de l'échantillon injecté.

La quantité de lysine étant proportionnelle à la surface de son pic on a :

$$\frac{q_2}{q_1} = \frac{s}{y} = K_2 x_2 \cdot \frac{1}{K_1 x_1} = \frac{K_2}{K_1} \cdot \frac{x_2}{x_1}$$

En outre, la surface du pic de norleucine est proportionnelle au volume injecté, on a donc :

$$\frac{x_2}{x_1} = \frac{i_2}{i_1} \quad \text{et} \quad \frac{q_2}{q_1} = \frac{K_2}{K_1} \cdot \frac{i_2}{i_1}$$

Or $q_1 = m \cdot a$, d'où

$$\text{La quantité de lysine de l'échantillon injecté } q_2 (\mu\text{moles}) = m \cdot a \cdot \frac{K_2}{K_1} \cdot \frac{i_2}{i_1}$$

- Dosage des acides aminés totaux

Soit b (ml), le volume de récupération de l'hydrolysate de T (mg) de farine délipidée contenant N (mg) d'azote.

La quantité de lysine Q (μmoles) d'une farine contenant 100 mg d'azote est :

$$Q = q_2 \cdot \frac{b}{v} \cdot \frac{100}{N} = m \cdot a \cdot \frac{K_2}{K_1} \cdot \frac{i_2}{i_1} \cdot \frac{b}{v} \cdot \frac{100}{N}$$

$$Q (\mu\text{moles}) = m \cdot a \cdot \frac{K_2}{K_1} \cdot \frac{i_2}{i_1} \cdot \frac{b}{v} \cdot \frac{100}{N}$$

- Dosage des acides aminés libres

Soient . F (g) la quantité de farine délipidée , contenant N(mg) d'azote, utilisée

- . b₁ (ml) volume total du surnageant
- . b₂ (ml) volume de surnageant passé sur Dowex
- . b₃ (ml) volume de HCl (0,1N) utilisé pour la récupération des acides aminés.

La quantité de lysine Q (μmoles) d'une farine contenant 100 mg d'azote est :

$$Q = q_2 \cdot \frac{1}{v} \cdot b_1 \cdot \frac{1}{b_2} \cdot b_3 \cdot \frac{100}{N}$$

$$= m \cdot a \cdot \frac{K_2}{K_1} \cdot \frac{i_2}{i_1} \cdot \frac{b_1}{v} \cdot \frac{b_3}{b_2} \cdot \frac{100}{N}$$

$$Q (\mu\text{moles}) = m \cdot \frac{a}{v} \cdot \frac{K_2}{K_1} \cdot \frac{i_2}{i_1} \cdot \frac{b_1}{b_2} \cdot b_3 \cdot \frac{100}{N}$$

54. Mise en évidence de l'hydroxyproline.

Elle est réalisée par chromatographie sur couche mince selon la méthode décrite par RANDERATH (1971). Nous avons utilisé des plaques (20 x 20 cm) de gel de silice (KIESELGEL) fournies par la société Merck.

Nous avons analysé l'hydrolysats des protéines de pellicules ainsi que des solutions pures de proline et d'hydroxyproline avec le mélange éluant suivant :

Chloroforme : méthanol : Ammoniaque 17 % (2 : 2 : 1 v/v).

L'identification de ces 2 acides aminés est facilitée par le fait qu'ils donnent une coloration jaune, en présence de la ninhydrine.

Une chromatographie bidimensionnelle est réalisée avec l'hydrolysats des protéines de pellicules pour séparer éventuellement la proline de l'hydroxyproline ; les mélanges éluants suivants sont utilisés :

- . Chloroforme : méthanol : Ammoniaque 17 % (2 : 2 : 1 v/v)
- . Propanol-1 : eau (22 : 10 v/v).

6. Analyse des protéines hydrosolubles.

61. Extraction des protéines.

611. Extraction des protéines des pâtes de moutarde.

La farine délipidée est délayée dans une solution de chlorure de sodium (0,5M) amenée à pH 8 avec du phosphate disodique (6 ml de solution pour 1 g de farine).

La solution d'extraction contient également du fluorure de phénylméthylsulfonyle (PMSF 1mM) qui inhibe le développement bactérien. La suspension est placée à 4°C pendant 24 à 48 heures, puis centrifugée à 27 000 g, à 4°C pendant 45 minutes dans une centrifugeuse "Sorvall Superspeed RC - 2". Le surnageant contenant les protéines est soit utilisé rapidement, soit lyophilisé.

622. Extraction des protéines des graines, des amandes et des pellicules.

La farine en suspension dans la solution de chlorure de sodium (6ml pour 1 g de farine) est traitée, après refroidissement dans un bain de glace, aux ultrasons dont l'action destructrice sur les membranes est liée à la libération importante d'énergie mécanique consécutive aux phénomènes de cavitation. Nous avons utilisé le modèle "B-12 Sonifier Cell disruptor" de la compagnie "Branson Sonie Power".

La suspension est traitée trois fois aux ultrasons à la puissance de 75 W pendant 3 minutes. Le reste de l'extraction se déroule comme dans le paragraphe précédent.

62. Purification des protéines.

Les protéines sont précipitées en ajoutant du sulfate d'ammonium à raison de 0,7 g par ml de surnageant. Après trois jours à 4°C, le précipité est isolé par centrifugation à 800 g pendant 10 minutes. Les protéines

sont reprises dans la solution de chlorure de sodium, puis dialysées à 4°C dans la même solution et enfin lyophilisées.

Les membranes de dialyse sont péalablement traitées par trempage pour éliminer la glycérine, les composés sulfurés et les métaux lourds. Les membranes sont, d'abord, placées 10 minutes, dans une solution bouillante de carbonate d'ammonium 5 %. Après plusieurs lavages à l'eau distillée, elles sont chauffées 10 minutes dans une solution d'acide éthylènediaminotétraacétique (EDTA 10mM). L'EDTA, fixe par chélation, les métaux lourds. Les membranes sont, enfin, rincées à l'eau distillée jusqu'à disparition complète de l'absorption à 260 nm due à la présence d'EDTA.

63. Electrophorèse.

Nous avons utilisé un protocole mis au point pendant notre mémoire d'ingénieur (DIAHAM 1981, GRUENWEDEL et DIAHAM 1982). L'électrophorèse est réalisée à l'aide de l'appareil 2117 Multiphor LKB.

Une teneur élevée d'urée (5M) dans le gel de polyacrylamide inhibe la protéolyse. Elle permet, aussi, une bonne dissociation des protéines végétales qui ont tendance à s'agglomérer.

631. Préparation des solutions

. Solution A

Acrylamide 5,63M ; N,N'-méthylène-bis-acrylamide 17,3mM dans l'eau distillée.

. Solution B

N,N,N',N'-tétraméthyléthylène diamine (TEMED) 0,17M ; acide acétique 7,52M dans l'eau distillée.

. Solution C

Péroxydisulfate d'ammonium 5,87mM et urée 8M dans l'eau distillée.

La solution C est préparée extemporanément.

. Solution "cuves électrophorèse". (Acide acétique 0,9M)

. Solution de coloration

Solution aqueuse contenant : 1g de bleu de coomassie, 110g d'acide

trichloracétique, 40g d'acide sulfosalicylique et 330ml de méthanol par litre de solution.

. Solution de décoloration

250ml d'éthanol, 84ml d'acide acétique et on complète à un litre avec de l'eau distillée.

632. Protocole.

Le gel est obtenu en mélangeant 7,5 ml de solution B, 15 ml de solution A et 37,5 ml de solution C.

Après la polymérisation qui dure 6 heures, le gel est placé sur la plaque de refroidissement et relié aux solutions des cuves par du papier Whatman n° 1.

On réalise, ensuite, une préélectrophorèse (100 V pendant 2 heures), pour substituer les ions ($S_2O_8^{2-}$, TEMED²⁺...) du gel aux ions (CH_3COO^- et H^+) de la solution acétique.

On dépose environ 160 µg de protéines dans des puits ou sur des languettes de papier, situés à 2 cm du bord du gel, du côté de l'anode.

Après l'électrophorèse (220 V pendant 3 h 30), le gel est plongé 8 heures dans la solution de coloration.

Le bleu de coomassie, colorant anionique, réagit avec les protéines qui précipitent sous l'action de l'acide trichloracétique. L'excès de colorant est éliminé par trempages successifs dans des solutions de décoloration.

Cette opération dure 2 jours. L'intensité des bandes est déterminée, à l'aide d'un densitomètre, à 575 nm, la longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption du bleu de coomassie.

7. Activité de la myrosinase.

L'action de la myrosinase peut être détectée par la mise en évidence de la disparition du substrat, ou de l'apparition d'un des produits de la réaction enzymatique.

SCHWIMMER (1961), HENDERSON et MC EWEN (1972), ont étudié l'hydrolyse de la sinigrine, en se fondant sur la différence d'absorption à 227,5 nm entre l'allylthioglucoside et l'allylisothiocyanate (à concentrations

équimolaires, l'absorption de l'allylsénévol représente 8,2 % de celle de la sinigrine).

MAC GIBBON et ALLISON (1970) ont mis en évidence l'action de la myrosinase en ajoutant du chlorure de baryum ($BaCl_2$) qui donne, en présence du sulfate acide de potassium ($KHSO_4$), un composé blanc de sulfate de baryum ($BaSO_4$) insoluble dans l'eau.

D'autres méthodes sont fondées sur la libération du glucose. Elles mettent en jeu une séquence réactionnelle ayant pour premier substrat le glucose [BJÖRKMAN et JANSON (1972) ; VAUGHAN et al. (1968) ; PIHAKASKI et PIHAKASKI (1978)]

71. Extraction de la myrosinase.

Elle est effectuée selon la méthode de TSURUO et al. (1967).

Les farines délipidées sont délayées dans une solution de chlorure de sodium (0,5M) contenant du 2-mercaptoéthanol 0,01M. Les protéines sont extraites par précipitation fractionnée (la myrosinase précipite entre 50 et 70 % de saturation en sulfate d'ammonium), à pH 7.

Les précipités sont isolés par centrifugation à 4°C, à 800 g pendant 10 minutes.

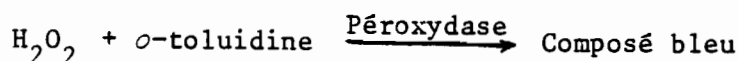
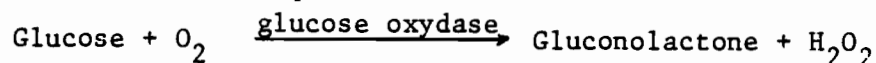
La fraction contenant l'enzyme est reprise dans la solution d'extraction puis dialysée dans la même solution. La myrosinase, ainsi purifiée, est stable pendant plusieurs mois à + 5°C.

Les protéines sont dosées selon la méthode de LOWRY modifiée par SCHACTERLE et POLLACK (1973).

72. Mise en évidence qualitative de la myrosinase.

721. Diffusion dans un gel d'agarose.

L'apparition du glucose est décelée par la formation d'un composé bleu, produit final de la séquence réactionnelle suivante :



7211. Solutions.

- . Tampon citrate pH 6,2
- . Solution de myrosinase : 40 mg/l dans le tampon citrate
- . Solution de sinigrine : 10 mg/ml dans le tampon citrate
- . Solution de détection du glucose
 - o-toluidine : 6 mg
 - Glucose oxydase : 1,25 mg
 - Péroxydase : 0,80 mg
 - Tampon citrate : qsp 5 ml.

7212. Protocole.

L'agarose (0,5g) est délayé dans 100 ml de tampon citrate. La suspension est portée à ébullition jusqu'à obtention d'une solution homogène transparente. 12 ml de la solution refroidie à 60°C, sont étalés sur une plaque de verre (84 x 96 mm).

Après formation du gel, on confectionne des systèmes de puits à l'aide d'un emporte-pièce LKB de 20 μ l de capacité. Chaque système est constitué d'un puits central et de 6 puits périphériques situés à égale distance sur un cercle de 2 cm de diamètre. Le puits central reçoit 20 μ l de la solution de détection de glucose et les puits périphériques le mélange de 10 μ l de solution de sinigrine et 10 μ l de solution de myrosinase.

Si cette dernière est active, le glucose libéré migre à la rencontre du complexe enzymatique de détection. La migration du glucose dans le gel est contrôlée par un système témoin où les puits périphériques reçoivent 20 μ l de la solution de glucose.

722. Méthode de MAC GIBBON et d'ALLISON.

7221. Solutions.

- . Solution A' :

Acrylamide 3,66M, Bisacrylamide 11,2mM dans l'eau distillée.

- . Solution B' :

TEMED 0,1 M ; acide acétique 7,52 M dans l'eau distillée.

. Solution C' :

Péroxydisulfate d'ammonium 3,52 mM ; urée 4,8 M dans l'eau distillée.

On prépare un gel à 6 % de polyacrylamide en mélangeant les solutions A', B' et C' dans les proportions 2 : 1 : 5

. Solution de révélation pH 4,5

BaCl₂ : 10mg/ml ; sinigrine 5mg/ml ; acide ascorbique 3mM ; acide acétique 1M.

7222. Protocole.

Les conditions de migration sont analogues à celles utilisées avec le gel à 10 % de polyacrylamide : préélectrophorèse à 100 V pendant 2 heures suivie d'une électrophorèse à 200 V pendant également 2 heures.

Le gel, plongé dans le révélateur, est incubé 12 heures à 37°C. Si la myrosinase est active, il se forme des bandes blanches de BaSO₄. Pour identifier les bandes ayant une activité myrosinase, les fractions de quelques échantillons sont colorées au bleu de coomassie.

723. Méthode d'impression de VAUGHAN.

La méthode est fondée sur la détection du composé bleu, produit de la réaction de l'eau oxygénée avec l'*o*-toluidine.

La technique d'impression consiste à mettre en contact avec le gel, un papier préalablement imbibé de solution de sinigrine. Après un temps suffisant pour permettre l'apparition et la diffusion du glucose vers le papier ; ce dernier est imprégné de solution contenant la glucose oxydase, la peroxydase et l'*o*-toluidine.

Après incubation, on observe des taches bleues aux endroits où avait diffusé le glucose.

7231. Solutions.

. Tampon citrate pH 6,2

. Solution de sinigrine 1 % dans le tampon citrate

. Solution de révélation

Glucose oxydase 7,5 UI/ml ; Péroxydase 2,5 UI/ml ; *o*-toluidine 1 mg/ml dans le tampon.

7232. Protocole

Sur un gel à 10 % de polyacrylamide, ayant servi au fractionnement des protéines, on dépose un papier Whatman 3 MM, préalablement, imbibé de solution de sinigrine. Après 20 minutes à température ambiante, le papier est retiré et placé sur une plaque de verre. On y pulvérise la solution de révélation.

73. Détermination quantitative de l'activité de la myrosinase.

731. Méthode de SCHWIMMER.

7311. Solutions.

. Tampon phosphate pH 5,70

Na_2HPO_4 , $12\text{H}_2\text{O}$: 4mM, acide citrique: 2mM dans l'eau distillée.

. Solution de sinigrine 100mg/l dans le tampon

. Solution de myrosinase 50 mg/l dans le tampon.

Ces solutions sont filtrées sur papier-filtre.

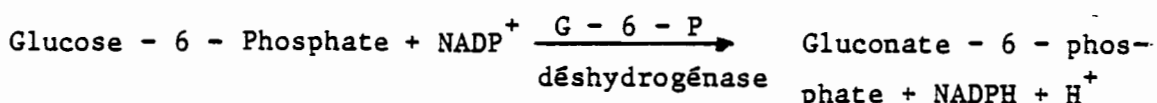
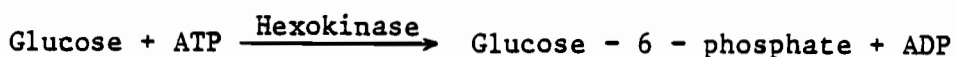
7312. Protocole.

Les trois solutions sont chauffées à 40°C. A l'instant $t=0$, on mélange la solution de sinigrine et la solution de myrosinase dans les proportions 1 : 1.

Au bout de 60 minutes à 40°C, le mélange et le tampon sont placés 5 minutes dans un bain glacé. La densité optique du mélange est mesurée contre la solution tampon à 227,5 nm.

732. Dosage du glucose.

La méthode est inspirée de celle de PIHAKASKI et PIHAKASKI (1978). Elle est fondée sur la dégradation du glucose par l'hexokinase.



La quantité de glucose est déterminée par la mesure de l'absorption de NADPH à 340 nm.

7321. Solutions .

- . Tampon citrate pH 5,5
- . Solution de sinigrine 15 mg/ml dans le tampon
- . Solution de myrosinase 5 mg/ml dans le tampon
- . Solution de glucose 7 mg/ml dans le tampon
- . Kit Boehringer
 - Solution (1) : NADP : 64mg ; ATP : 160mg ; MgSO₄ et stabilisateur; dans 27 ml d'eau distillée.
 - Solution (2) : 0,7 ml de suspension enzymatique contenant 200 UI d'hexokinase et 100 U de glucose-6-déshydrogénase.

7322. Protocole.

L'hydrolyse de la sinigrine est obtenue en incubant 60 minutes à 40°C, le mélange suivant :

0,2 ml de tampon, 1ml de solution de sinigrine et 0,8 ml de solution de myrosinase.

Deux témoins contenant d'une part, 1 ml de tampon et 1 ml de solution de sinigrine et, d'autre part, 1 ml de tampon et 1 ml de solution de glucose sont traités dans les mêmes conditions.

Le dosage du glucose se fait comme suit : dans deux cuves de quartz on met :

	Blanc	Echantillon
Solution (1)	1 ml	1 ml
Solution à doser	-	0,1 ml
Eau distillée	2 ml	1,9 ml

Les mélanges sont agités et la densité optique de l'échantillon est mesurée à 340 nm, puis on ajoute la solution (2)

Solution (2)	0,02 ml	0,02 ml
--------------	---------	---------

On agite et on laisse reposer 10 minutes ; ensuite la densité optique de l'échantillon est lue à 340 nm, toutes les 30 secondes jusqu'à ce qu'elle soit constante pendant 5 minutes.

RESULTATS ET DISCUSSION

1 - Efficacité de la dépelliculation

La dépelliculation permet de séparer les parties anatomiques de la graine et donc de faciliter leur étude.

Nous nous sommes demandés si ce procédé est utilisable dans la technologie de la moutarde. Cela aurait comme avantage d'éliminer le tamisage de la pâte acide (la durée de vie des tamis métalliques inoxydables utilisés est de dix jours), et de limiter les phénomènes d'oxydation en diminuant le temps de contact de la pâte avec l'oxygène.

Ce procédé permettrait de valoriser les pellicules dont la teneur en sel ajouté au cours de la fabrication, limitait l'utilisation en agriculture.

11. Teneur azotée des parties anatomiques de la graine.

Les teneurs en eau et en azote des échantillons "graines entières", "amandes grosses", "amandes fines" et "pellicules" ont été déterminées trois fois. Les valeurs moyennes sont indiquées dans le tableau 3.

Tableau 3 : Teneur azotée des parties anatomiques de la graine

		Graines entières	Amandes grosses	Amandes fines	Pellicules
Matière sèche en (g) pour 100 g de matière fraîche		91,9	93	93,8	83,5
Quantité N d'azote en (g)	Pour 100 g de matière fraîche	3,94	4,20	4,40	1,98
	Pour 100 g de matière sèche	4,29	4,52	4,69	2,37
Quantité de protéines brutes (N . 6,25)en (g)	Pour 100 g de matière fraîche	24,62	26,25	27,50	12,38
	Pour 100 g de matière sèche	26,79	28,20	29,32	14,83

Tableau 4 : Teneur azotée des parties anatomiques de la graine selon la littérature

	Graines entières	Amandes	Pellicules
Quantité de protéines brutes (en g) pour 100 g de matière d'après FINLAYSON (1976)	24 à 25	-	-
Quantité de protéines brutes (en g) pour 100 g de matière d'après VANGHEESDAELE (1980)	27,5	30,8	14,7

Les résultats obtenus pour les graines entières confirment ceux de FINLAYSON (1976), mais sont inférieurs à ceux de VANGHEESDAELE et FOURNIER (1980). Ces derniers auteurs attribuent cette différence aux modalités de minéralisation. La sinigrine, composé azoté, se dégrade, en effet, en substances volatiles qui peuvent être perdues en début de minéralisation.

12. Teneurs en eau et en protéines des amandes pures.

VANGHEESDAELE et FOURNIER (1980) indiquent que les graines entières de *Brassica juncea* sont constituées de 80 % d'amandes et 20 % de pellicules.

121. Teneur en eau des amandes.

Soient h_g, h_p, h_a , les teneurs en eau respectives des graines entières, des pellicules et des amandes ($h_g = 8,1 \%$, $h_p = 16,5 \%$), on peut écrire :

$$h_g = \frac{20 \cdot h_p + 80 \cdot h_a}{100}$$

on obtient donc $h_a = 6 \%$

122. Teneur en protéines des amandes.

De même on a :

$$x_g = \frac{20 \cdot x_p + 80 \cdot x_a}{100}$$

x_g, x_p, x_a étant les teneurs en protéines des graines entières, des pellicules et des amandes ($x_g = 24,62 \%$, $x_p = 12,38 \%$)

De l'équation précédente, on tire $x_a = 27,68 \%$

Les teneurs en eau et en protéines des amandes pures sont respectivement 6 % et 27,68 %.

13. Teneur en pellicules des échantillons "d'amandes".

Soient I, le pourcentage de pellicules, h la teneur en eau et x la teneur en protéines de l'échantillon.

Soient h_a et x_a les teneurs en eau et en protéines des amandes pures ($h_a = 6 \%$, $x_a = 27,68 \%$)

Soient $h_p = 16,5 \%$ et $x_p = 12,38 \%$, les teneurs en eau et en protéines des pellicules.

On peut écrire les équations suivantes :

$$h = \frac{I \cdot h_p + (100-I) \cdot h_a}{100} \quad (1)$$

$$x = \frac{I \cdot x_p + (100-I) \cdot x_a}{100} \quad (2)$$

131. Teneur en pellicules des "amandes grosses"

$h = 7 \%$, $x = 26,25 \%$

On tire de l'équation (1) $I = 9,5 \%$ et de l'équation (2) $9,4 \%$, soit une moyenne $I = 9,4 \%$

132. Teneur en pellicules des "amandes fines"

$h = 6,2 \%$ et $x = 27,50 \%$

Les valeurs de I déterminées à partir des équations (1) et (2) sont respectivement $1,9 \%$ et $1,2 \%$ soit une moyenne de $1,5 \%$.

Les pellicules représentent $9,4 \%$ et $1,5 \%$ respectivement dans les échantillons "d'amandes grosses" et "d'amandes fines".

14. Utilisation de la dépelliculation dans la technologie de la moutarde.

Nous voulons préparer 100 g de pâte de moutarde avec x (g) d'"amandes fines" et y (g) d'"amandes grosses".

La quantité de matières sèches doit être supérieure à 28g ;

$$x \cdot \frac{93,8}{100} + y \cdot \frac{93}{100} \geq 28, \text{ soit } 1,01 x + y \geq 30,11$$

De plus la teneur en sons doit être inférieure à 2 g

$$x \cdot \frac{1,5}{100} + y \cdot \frac{9,4}{100} \leq 2 ; \text{ soit } 0,16 x + y \leq 21,27$$

Pour des raisons économiques, nous pouvons limiter la quantité de matière sèche à 33 %

$$x \cdot \frac{93,8}{100} + y \cdot \frac{93}{100} \leq 33 \text{ soit } 1,01 x + y \leq 35,48$$

Les points de coordonnées (x,y) sont situés dans le polygone délimité par les droites d'équation

$$y = 0$$

$$y = - 1,01 x + 30,11$$

$$y = - 0,16 x + 21,17$$

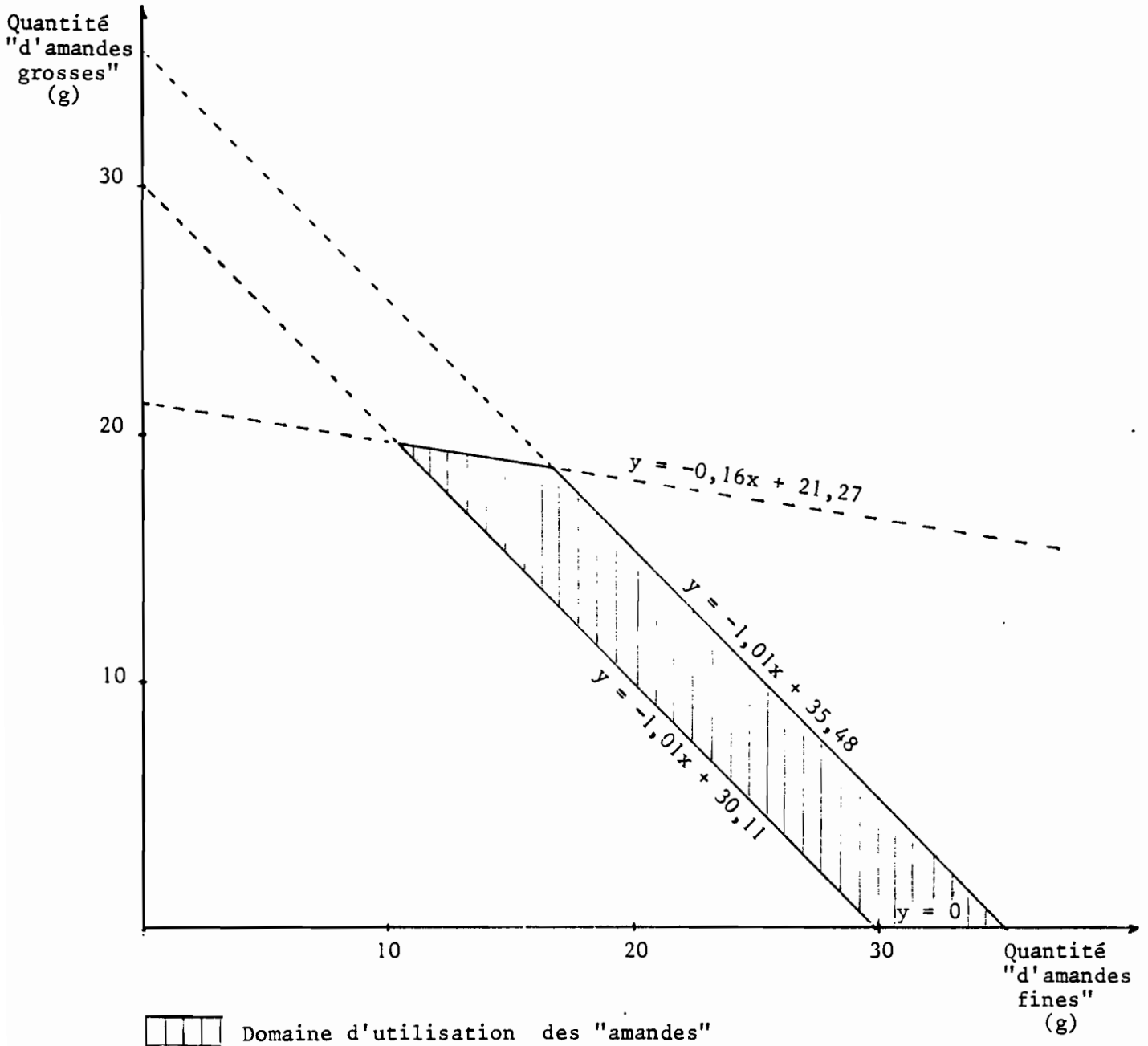
$$y = - 1,01 x + 35,48$$

Du point de vue de la législation, la dépelliculation est pertinente. Il reste à vérifier si une moutarde préparée de cette façon présente des qualités organoleptiques comparables à celles d'une moutarde traditionnelle.

Il semble toutefois, que les polyholosides des pellicules jouent un rôle important dans la texture de la pâte finale. Ce qui constituerait un frein à l'utilisation de la dépelliculation dans la technologie de la moutarde.

Figure 3 : Domaine d'utilisation des "amandes" dans la fabrication de la moutarde.

(Quantités pour la confection de 100 g de pâte)



2 - Etude des protéines de *Brassica juncea*.

21. Extraction des protéines.

La quantité de protéines extraites est déterminée par le dosage de l'azote total dans le surnageant, selon la méthode de KJELDAHL. Le rendement d'extraction représente le pourcentage de l'azote du surnageant par rapport à la quantité totale d'azote contenue dans l'échantillon de farine délipidée utilisé pour l'extraction.

Notons, en outre, que la délipidation élimine plus de 80 % des matières grasses de la matière première.

Tableau 5 : Rendement d'extraction des protéines

	"Graines entières"	"Amandes grosses"	"Amandes fines"	Pellicules	Pâte de moutarde
Concentration d'azote (mg/ml) dans le surnageant	5,7	6,5	7,5	1,1	7
Quantité d'azote (mg) dans le surnageant	98	109,34	129,82	13,59	100,64
Quantité d'azote (mg) dans l'échantillon de farine délipidée	175,95	191,82	226,57	79,46	175,03
Rendement de l'extraction	55,5	57	57,3	17,1	57,5

Il est à noter que l'extraction est d'autant meilleure que la teneur en pellicules de l'échantillon est moindre. En effet, les protéines des téguments sont imbriquées dans la cellulose des parois cellulaires.

Le rendement d'extraction des protéines des graines entières est, avec notre méthode, inférieur à celui mentionné par BOUQUET (1971) qui a délayé la farine délipidée dans un volume de tampon plus important. Nous avons limité la quantité de tampon afin d'obtenir un surnageant dont la concentration est suffisante pour permettre une dilution dans une solution d'urée. Nous pensons que la fraction extraite est représentative des protéines solubles dans la solution saline.

Les protéines solubles dans la solution de chlorure de sodium (0,5M) ont été partiellement identifiées par BOUQUET (1971) qui trouve un tiers de globulines et deux tiers d'albumines (la myrosinase appartenant au groupe des albumines).

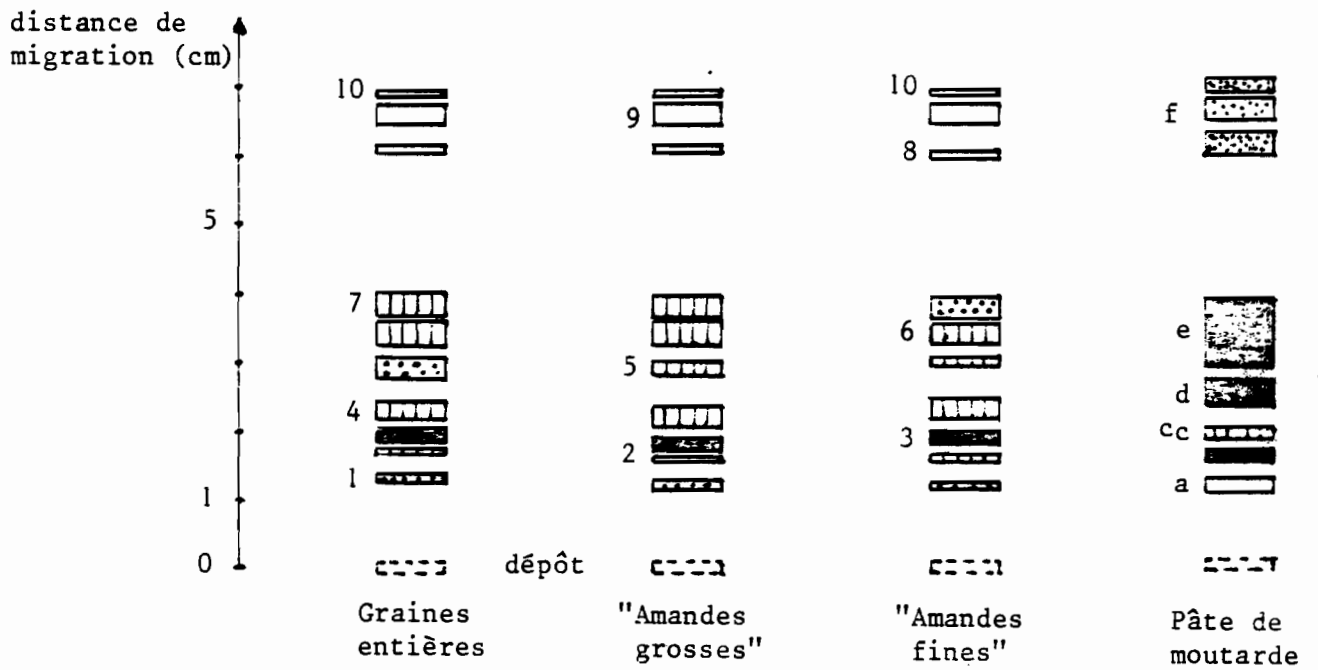
Le surnageant contient, également, des composés azotés non protéiques comme la sinigrine ou des acides nucléiques. BOUQUET trouve dans le surnageant 85 % de l'azote total dont 23 % d'azote non protéique.

22. Electrophorèse des protéines : analyse qualitative.





Nous avons analysé les protéines des graines, des amandes et des pâtes de moutarde par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Les meilleures migrations sont obtenues avec le gel à 10 % de polyacrylamide. Les résultats sont schématisés dans la figure 4.

Figure 4 : Schéma des électrophorégrammes des protéines
de *Brassica juncea*

(électrophorèse sur gel de polyacrylamide 10 %
à 220 V pendant 3 h 30)



Intensité de la coloration des bandes

-  faible
-  moyenne
-  forte
-  très forte

$$\text{distance de migration indiquée} = \frac{\text{distance après décoloration}}{\text{largeur du gel après décoloration}} \quad . \quad 11$$

largeur initiale du gel = 11 cm

On observe, à l'oeil nu, dix bandes pour les protéines des matières premières (graines et amandes). Ces bandes sont numérotées dans le sens de migration. L'intensité de la coloration est plus importante pour la fraction 3 et plus faible pour les bandes 8 , 9 et 10.

La migration des protéines des pâtes donne un profil électrophorétique analogue à celui des protéines des graines. On observe huit bandes dont une (la fraction e) correspond aux fractions 5 , 6 et 7 des protéines des graines.

23. Electrophorèse des protéines : analyse quantitative.

L'intensité des bandes est déterminée au densitomètre. Les pics, notamment, le premier et le dernier, sont délimités par comparaison avec les distances de migration dans le gel.

Nous n'avons pas effectué de calculs statistiques mais une triple détermination au densitomètre des quantités relatives des différentes fractions d'un même échantillon, indique que l'erreur due à la délimitation des pics est inférieure à 1 %.

231. Electrophorèse des protéines des graines.

Les résultats sont consignés dans les figures 5 et dans le tableau 6. Les fractions 8 ,9 et 10 ne sont pas détectées par le densitomètre en raison de la faiblesse de l'intensité de leur coloration.

Les fractions 3 et 4 sont les plus abondantes. .

On note une évolution de l'importance relative de certaines fractions quand on passe des graines entières aux amandes fines. Ainsi, lorsque la teneur en pellicules de l'échantillon diminue, le pourcentage des fractions 2 et 5 augmente tandis que celui des fractions 3 et 7 baisse. Il apparaît, donc, que les pellicules sont plus riches en fractions 3 et 7 et plus pauvres en fractions 2 et 5 que la graine entière.

Figure 5 : Electrophorèse des protéines de *Brassica juncea*
solubles dans une solution de chlorure de sodium (0,5M)

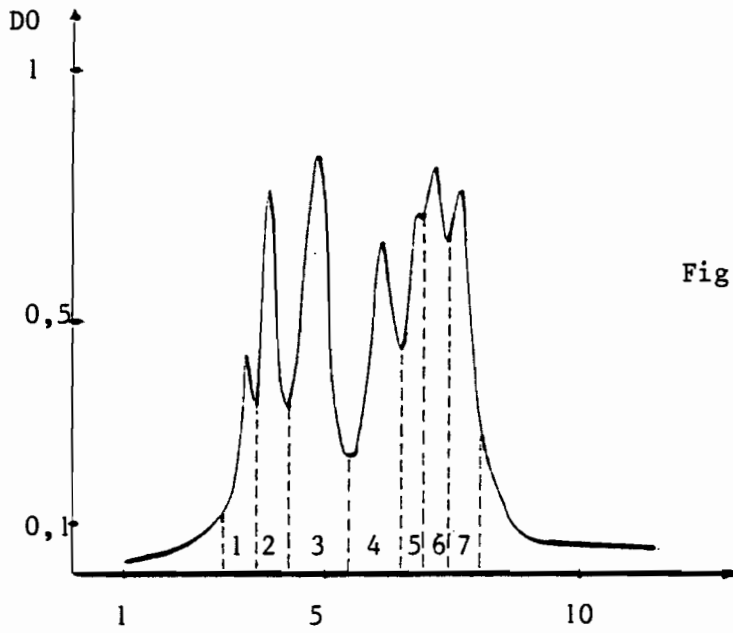


Fig. 5-1 : protéines des
graines entières

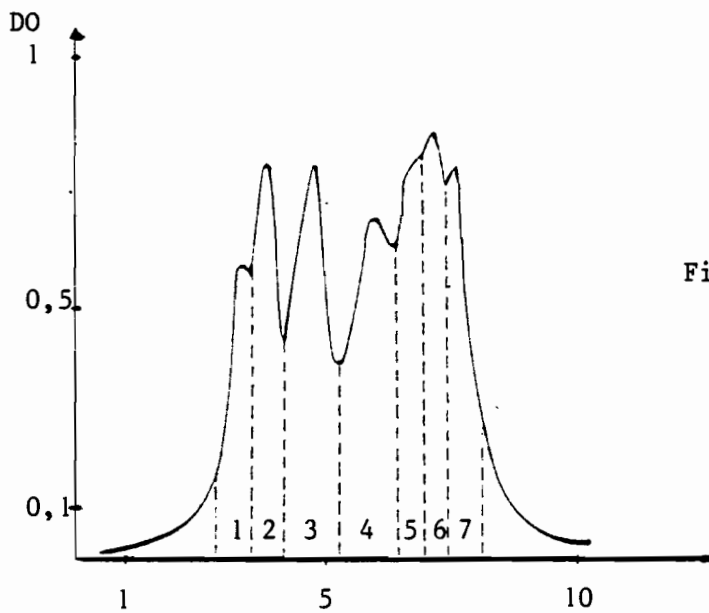


Fig. 5-2 : protéines des
"amandes grosses"

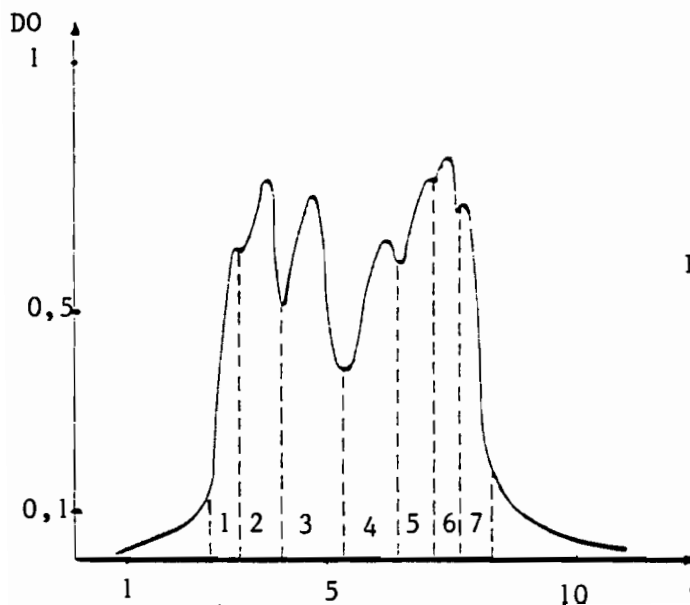


Fig. 5-3 : protéines des
"amandes fines"

232. Effet de la fabrication de la pâte de moutarde sur le profil électrophorétique.

Les protéines brutes des graines et de la pâte de moutarde sont fractionnées et les résultats sont enregistrés dans les courbes suivantes (figures 6).

La fraction f, regroupant les trois bandes ayant les mobilités électrophorétiques les plus importantes, résulte, sans doute, de phénomènes d'hydrolyse.

Cette fraction augmente au cours de la fabrication de la moutarde, ainsi que les fractions 2 et 4 ; alors que les fractions 3 et (5 + 6 + 7) baissent.

L'évolution de l'importance relative des fractions peut s'expliquer par :

- une hydrolyse partielle de certaines fractions (3 et 5+6+7).
- une baisse de la solubilité de certaines protéines.
- une destruction des protéines.

Les deux dernières hypothèses sont corroborées par le dosage de l'azote total dans les surnageants. En effet, pour une coloration comparable des bandes, l'échantillon des protéines de la pâte injecté contient beaucoup plus d'azote. Autrement dit le surnageant contenant les protéines des graines renferme moins d'azote non protéique.

233. Evolution des protéines solubles, dans une solution saline, de la pâte de moutarde au cours de la conservation.

Le fractionnement, par électrophorèse des protéines des pâtes de moutarde a été effectué sur gel de polyacrylamide 10 %. Les résultats sont enregistrés dans les figures 7 et dans le tableau 7.

- Influence de la température.

Pour un temps de conservation donné, l'élévation de la température favorise l'hydrolyse des protéines qui se traduit par l'augmentation de la fraction f. On constate, de plus, que la fraction d est inchangée,

Figure 6 : Effet de la fabrication de la pâte de moutarde sur le profil électrophorétique des protéines

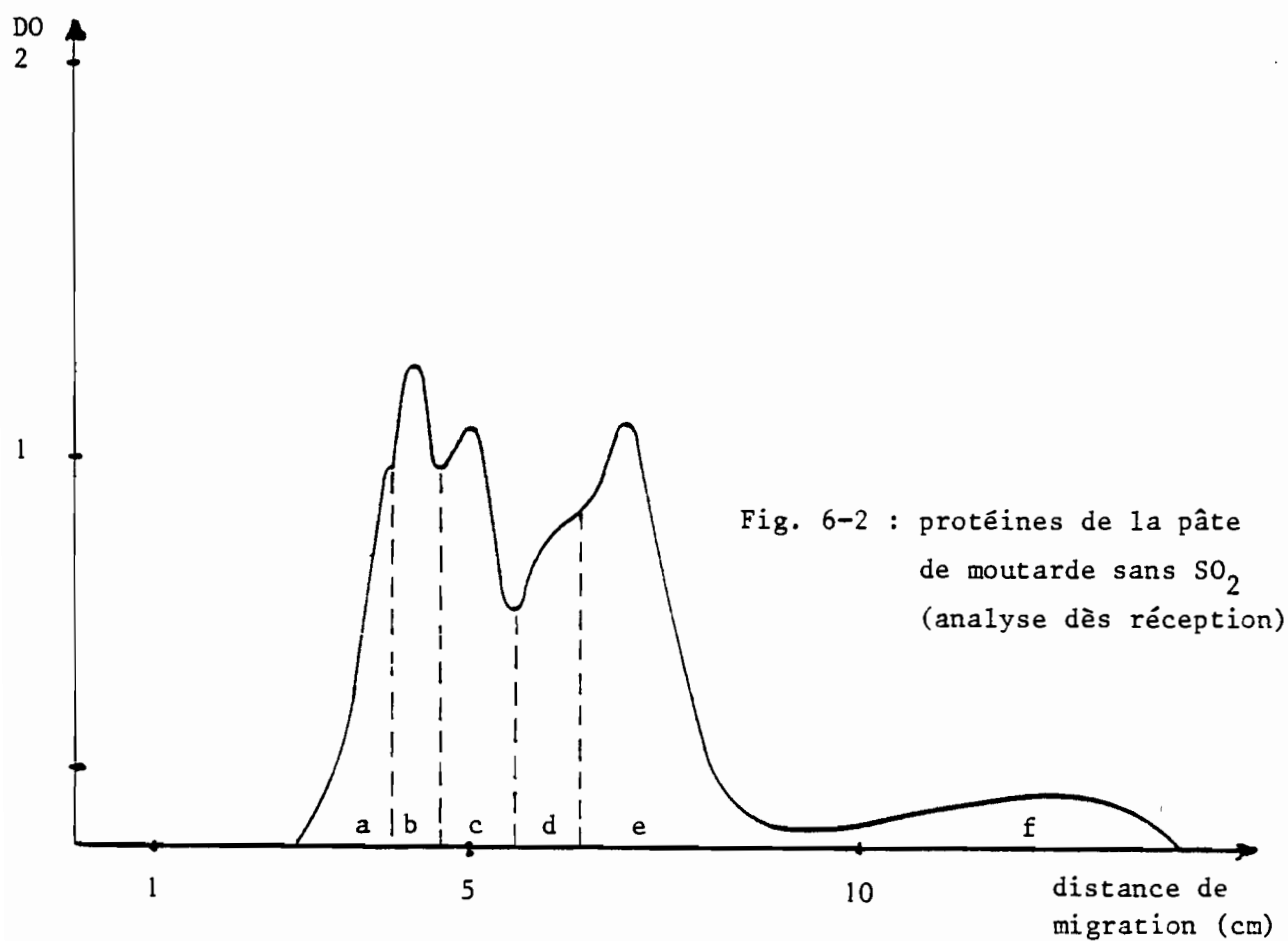
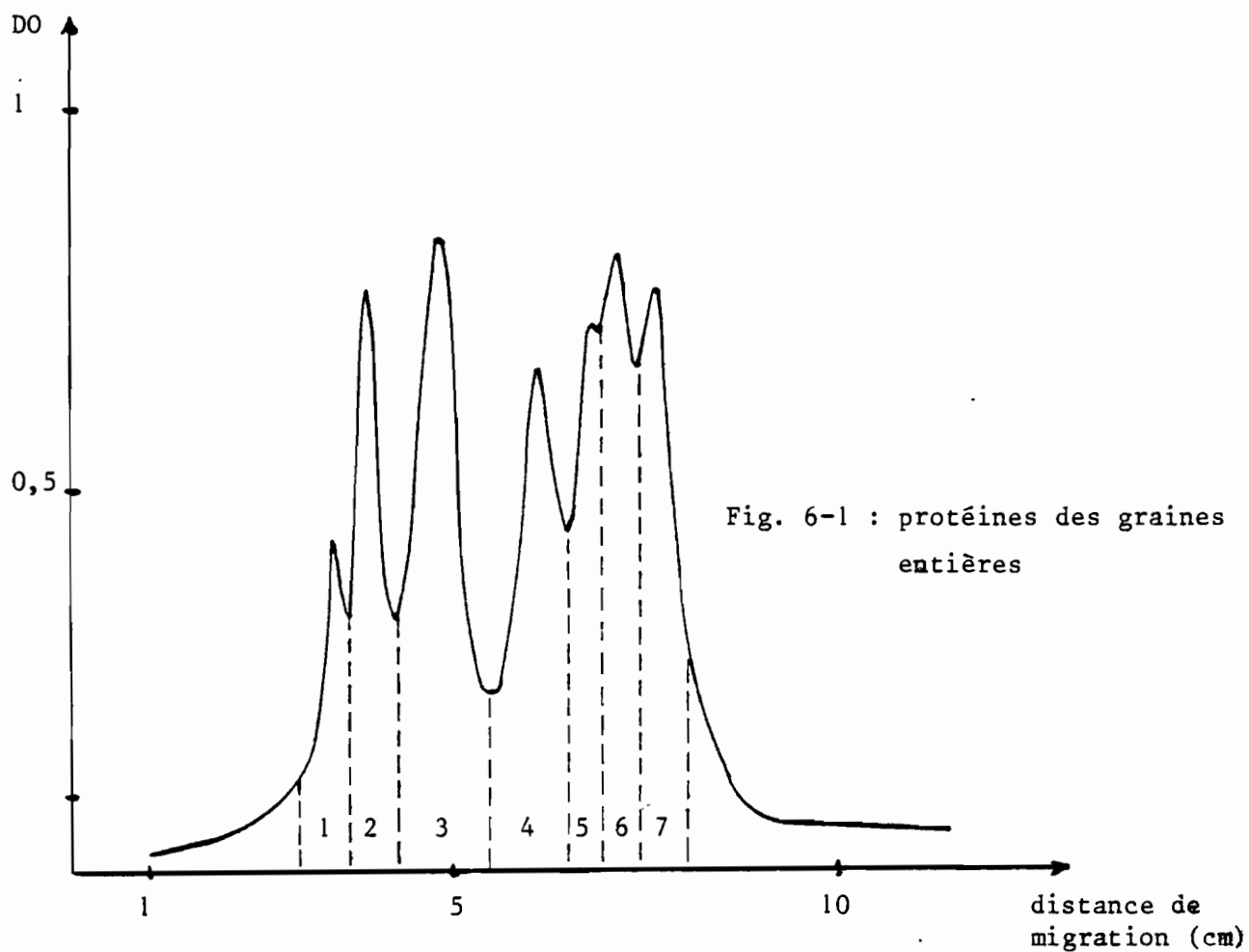
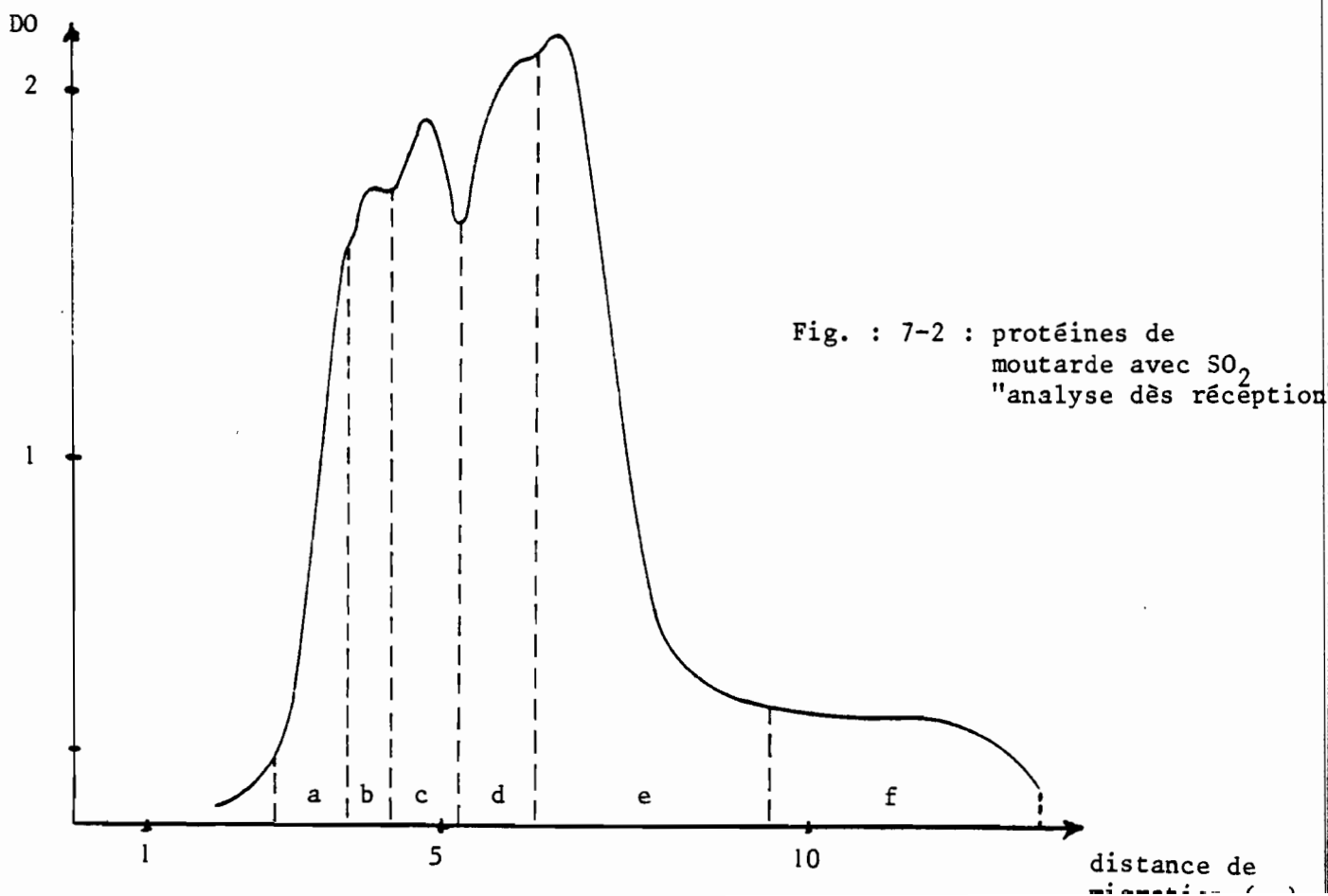
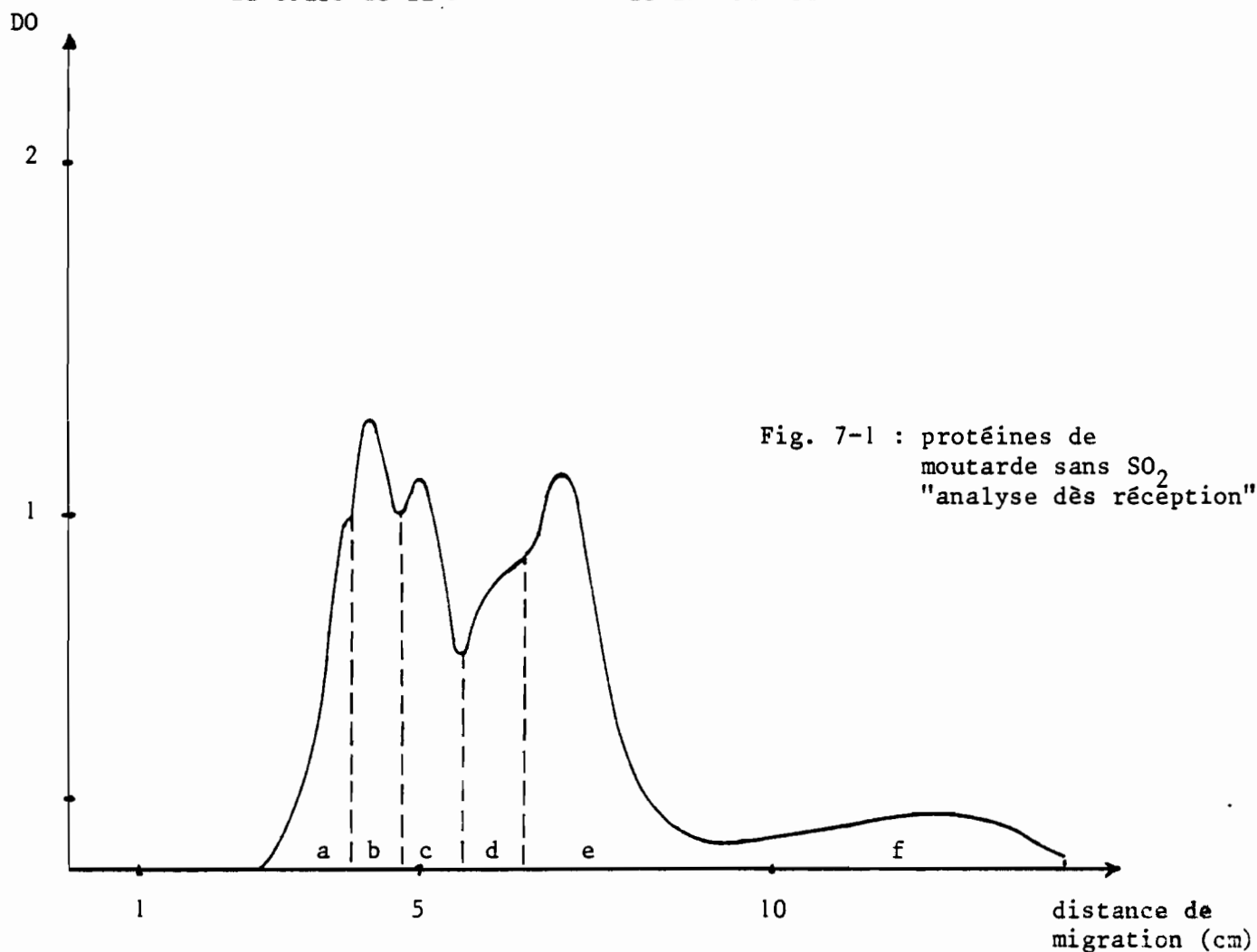
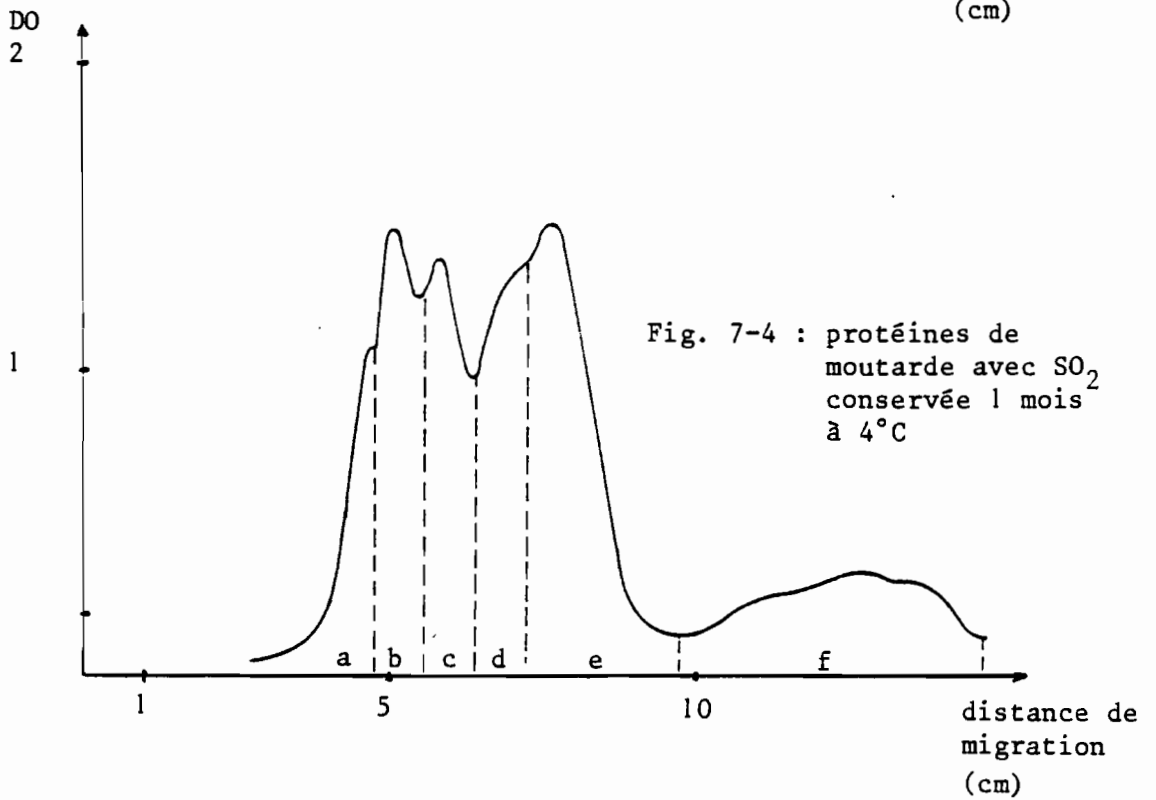
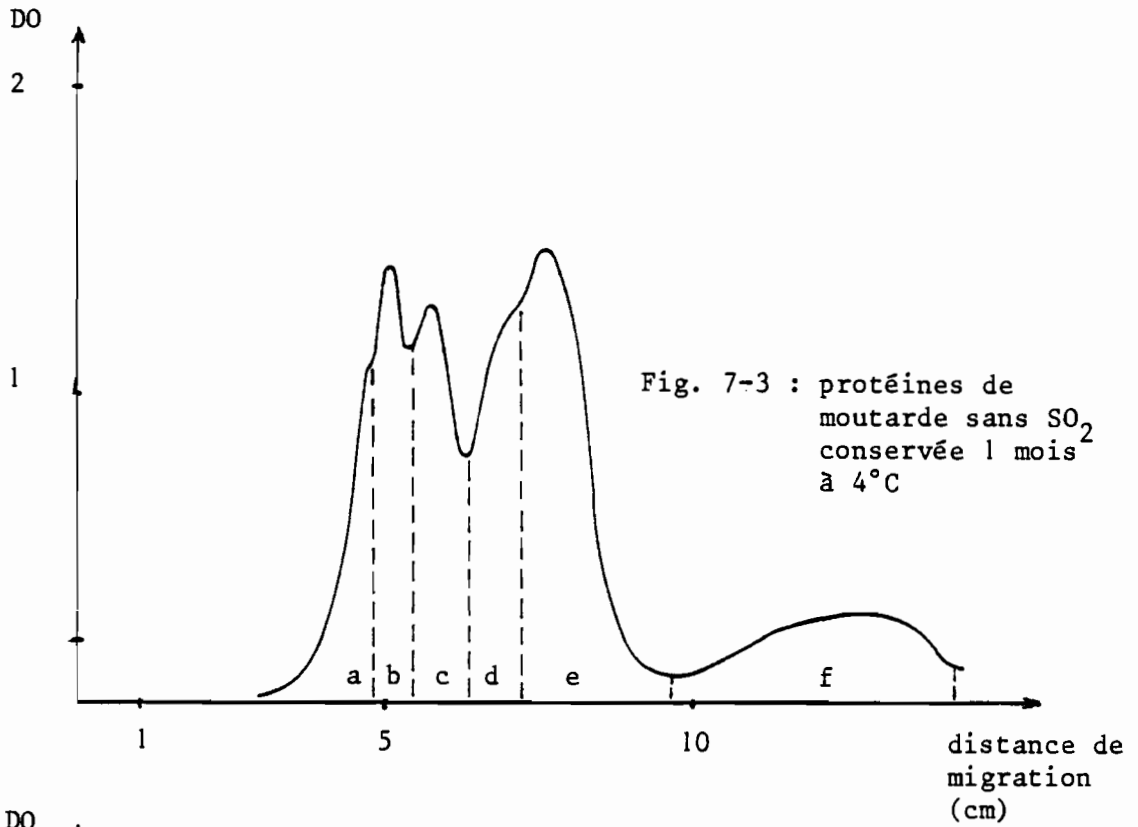
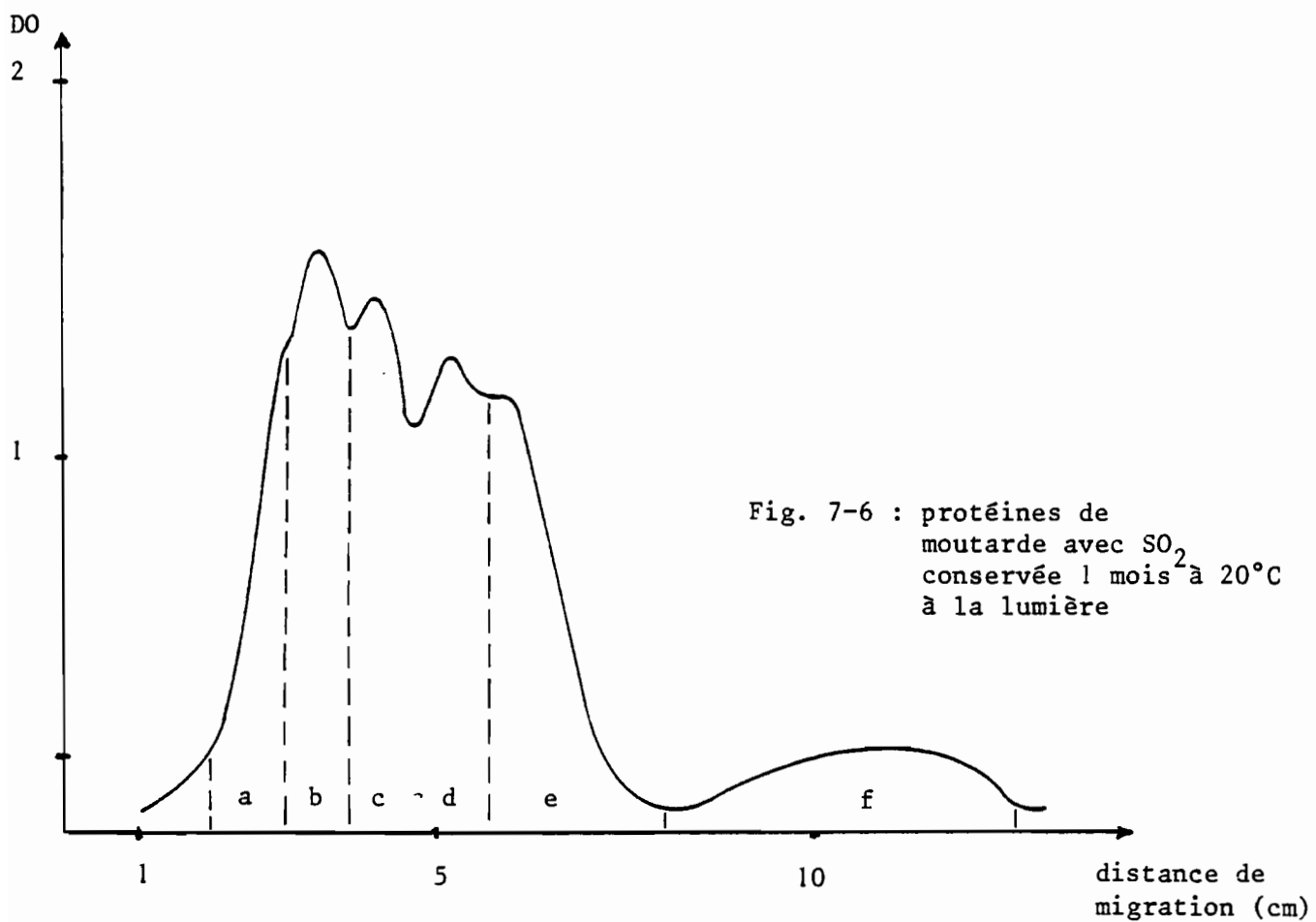
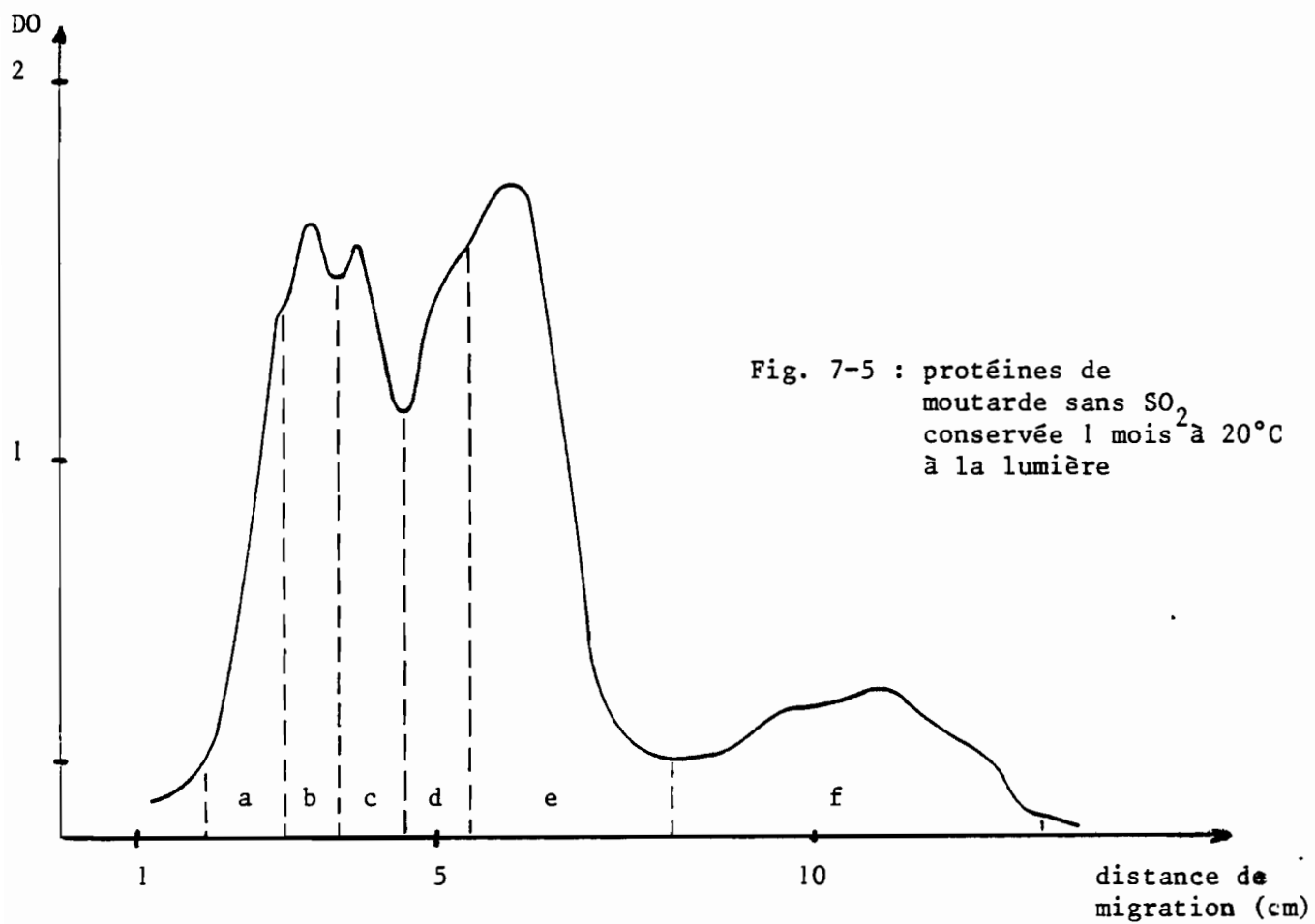
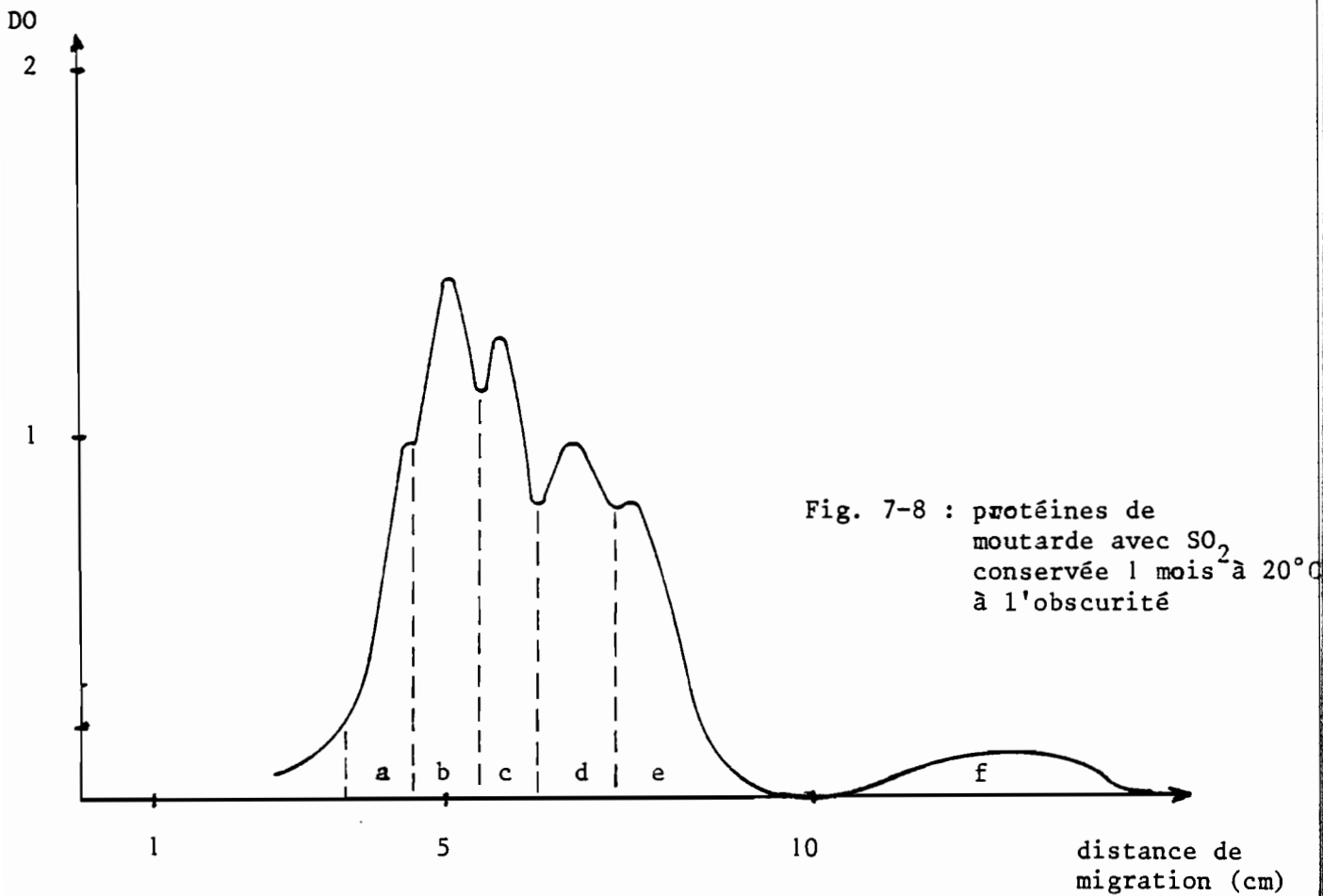
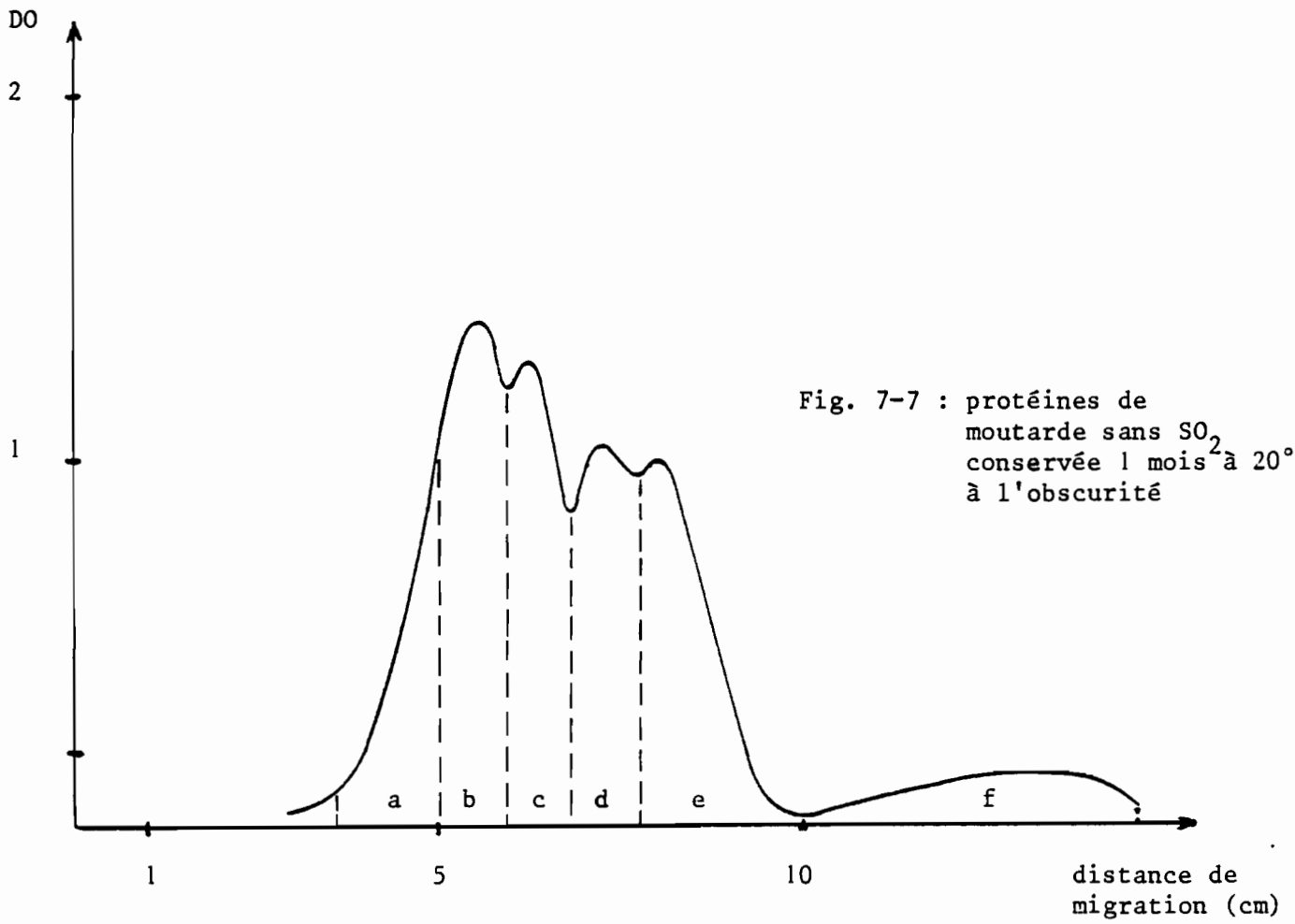


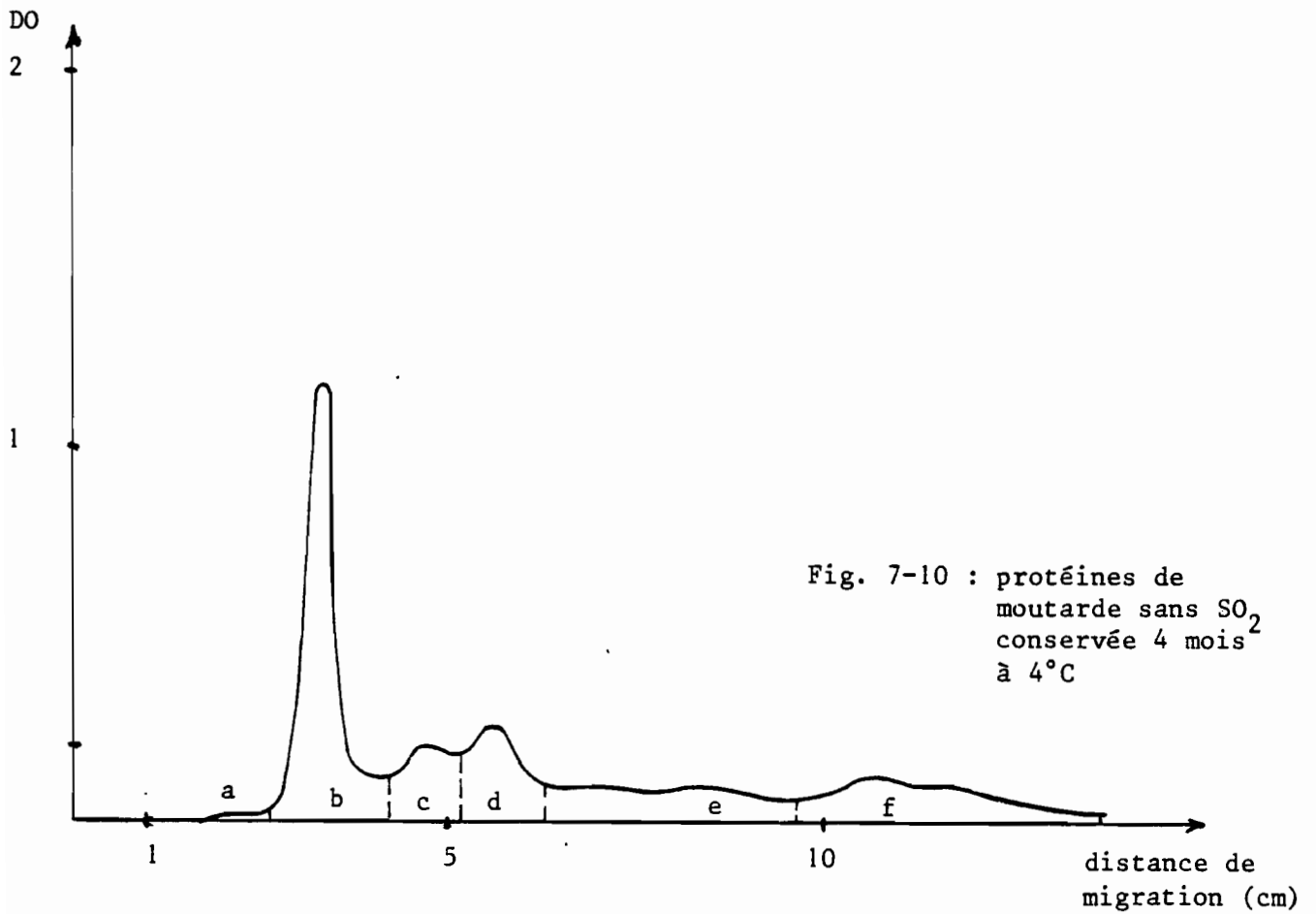
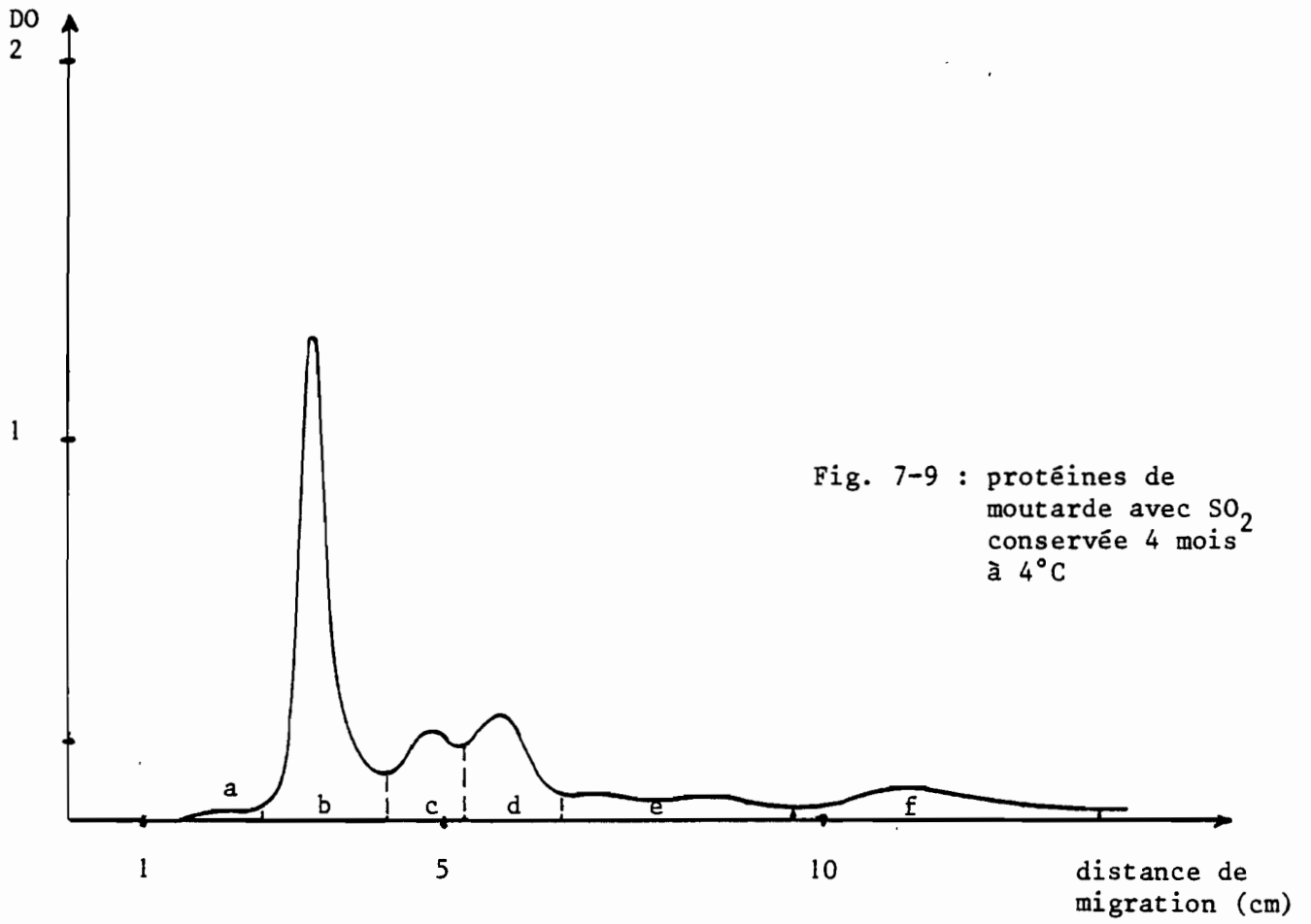
Figure 7 : Evolution des protéines solubles dans une solution de NaCl (0,5M), au cours de la conservation de la moutarde











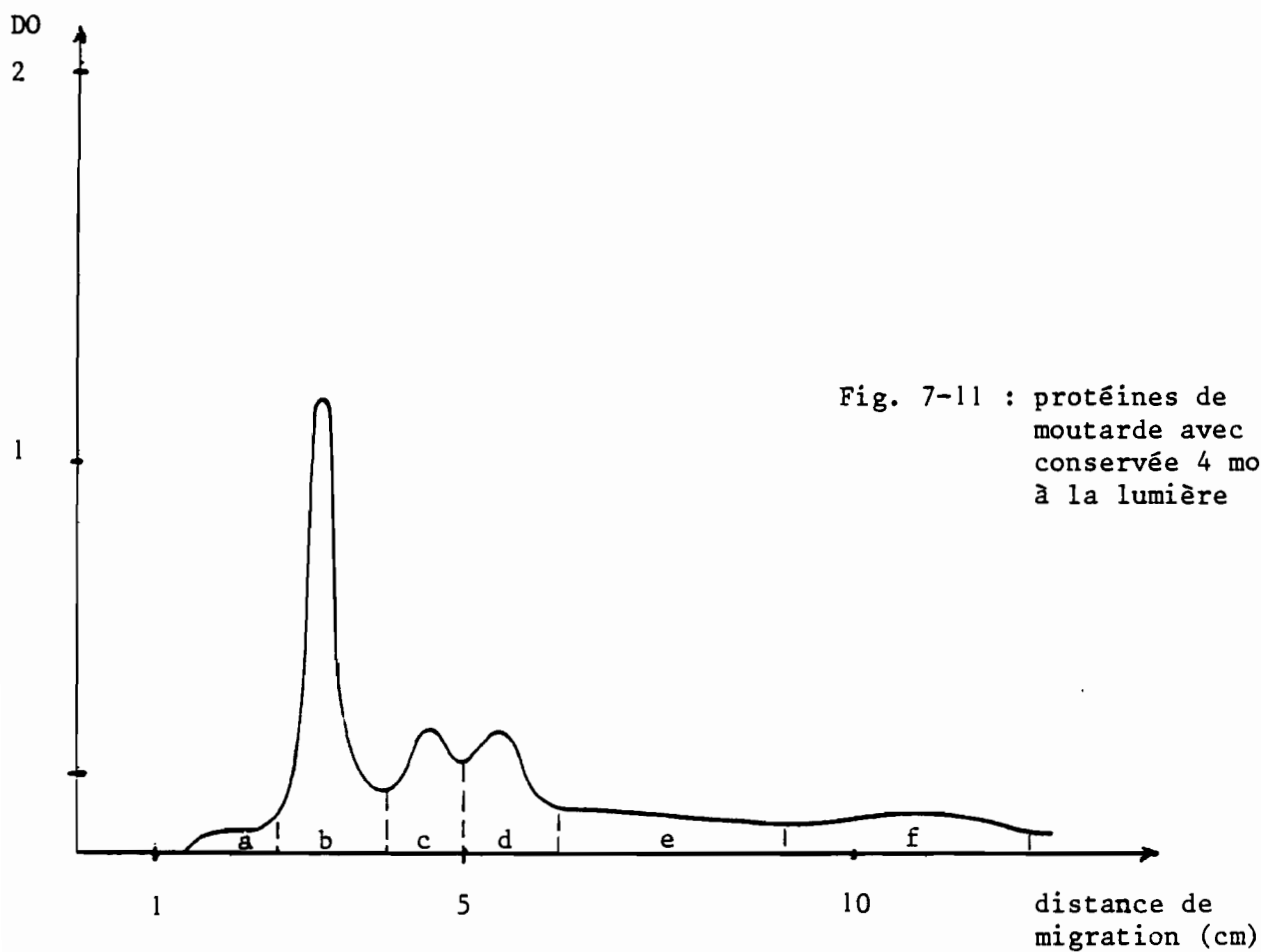


Fig. 7-11 : protéines de moutarde avec SO₂ conservée 4 mois² à 20°C à la lumière

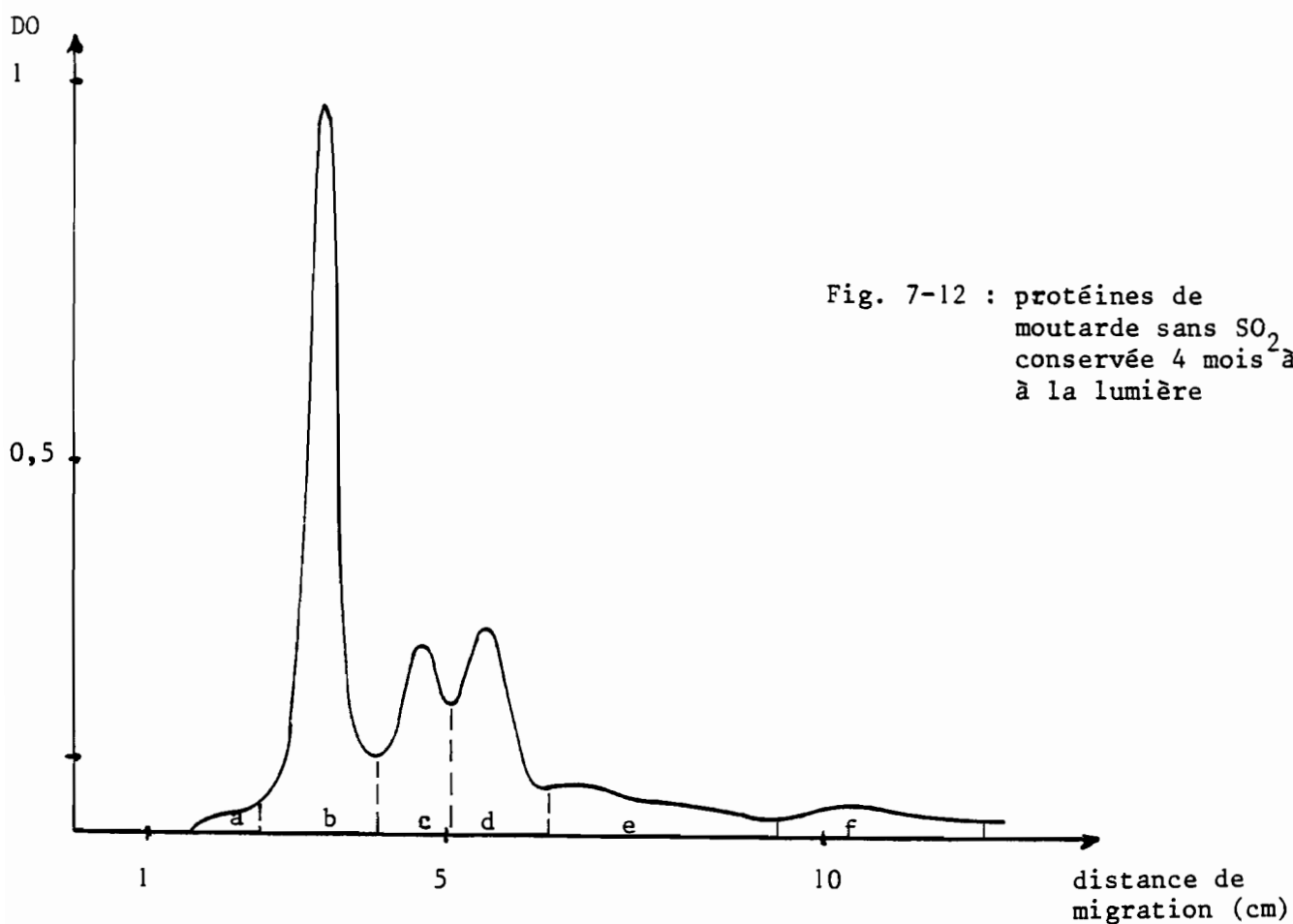


Fig. 7-12 : protéines de moutarde sans SO₂ conservée 4 mois² à 20°C à la lumière

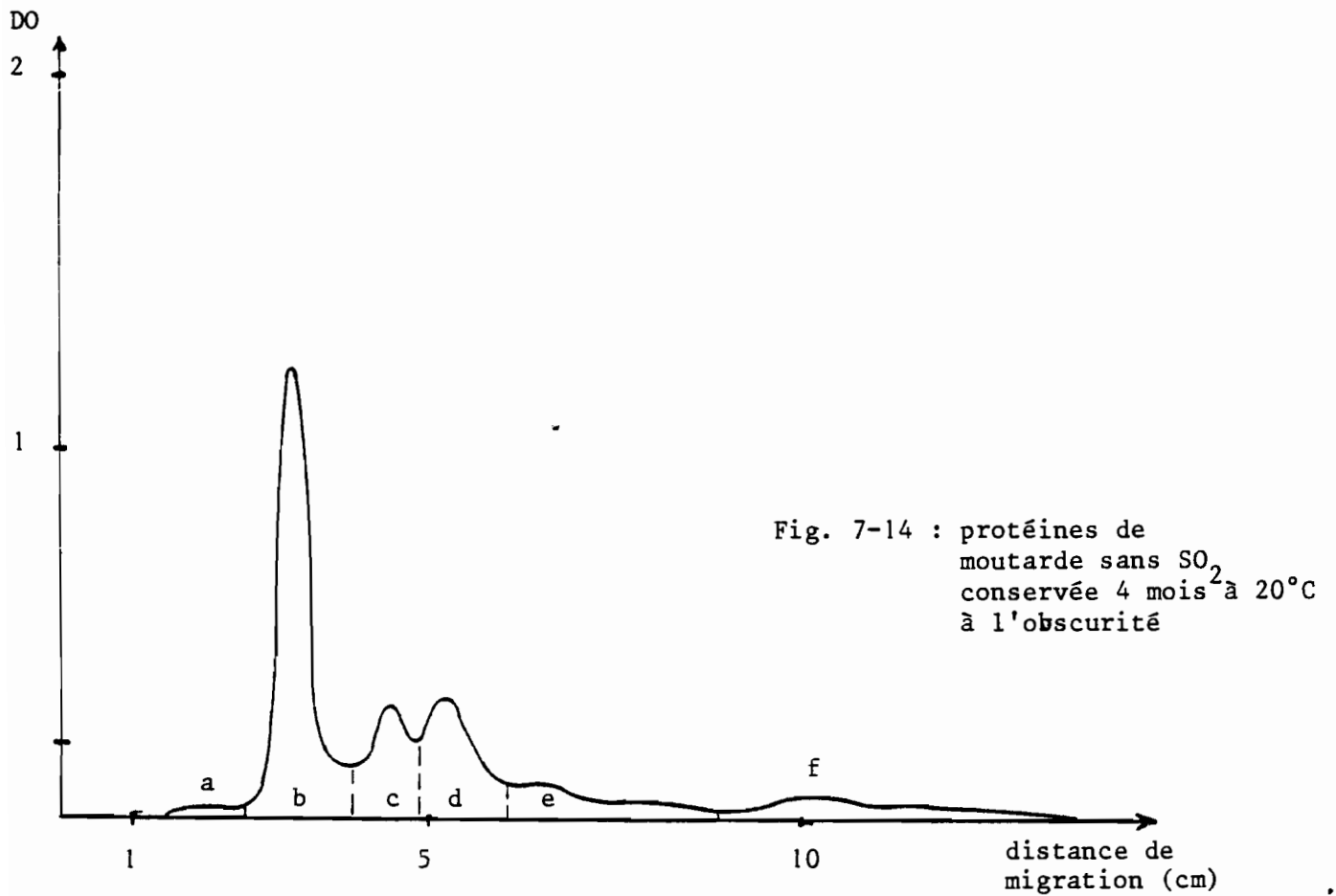
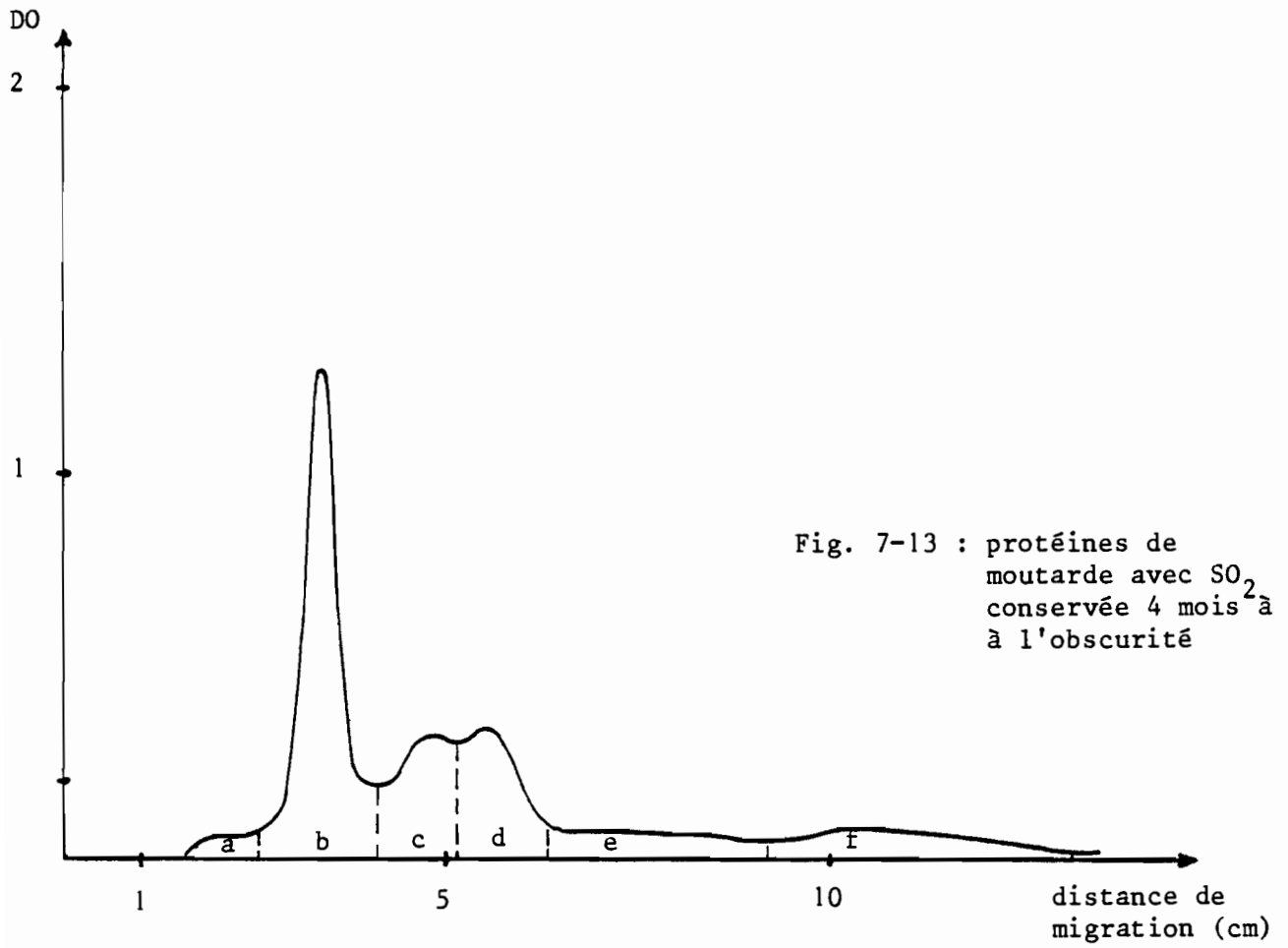


Tableau 6 : Pourcentage des fractions protéiques dans les parties anatomiques de la graine.

Echantillons Fractions	Graines entières	Amandes grosses	Amandes fines
1	6,8	7,1	7,2
2	12,7	14,4	15,2
3	25,1	22,3	22,1
4	17,0	16,9	16,4
5	7,4	12,6	15,8
6	14,8	14,5	14,6
7	16,2	12,2	8,7
Total	100 %	100 %	100 %

Tableau 7 : Pourcentage des fractions protéiques au cours de la conservation de la moutarde

Fractions	Moutardes analysées dès réception		Moutardes conservées 1 mois à 4°C		Moutardes conservées 1 mois à 20°C à la lumière		Moutardes conservées 1 mois à 20°C à l'obscurité		Moutardes conservées 4 mois à 4°C		Moutardes conservées 4 mois à 20°C à la lumière		Moutardes conservées 4 mois à 20°C à l'obscurité	
	Sans SO ₂	Avec SO ₂	Sans SO ₂	Avec SO ₂	Sans SO ₂	Avec SO ₂	Sans SO ₂	Avec SO ₂	Sans SO ₂	Avec SO ₂	Sans SO ₂	Avec SO ₂	Sans SO ₂	Avec SO ₂
a	6,9	7,8	8,9	9	8,9	10,3	10,2	10,2	1,8	1,6	3,7	2,5	3,6	3,5
b	21,6	20,1	22,8	21,5	18,1	22,9	36,4	38,5	43,8	44,1	41,9	42,4	42,3	42,4
c	17,8	17,9	16,1	16	16,3	20,8	17,5	17,3	15,5	15,9	16,8	16,3	15,7	15,4
d	20	20,2	18	19	20	21,5	20,6	20,3	16,0	17,6	17,4	19,0	17,4	17,9
e	31,3	31,4	31,8	31,9	33,7	21,5	12,1	10,6	12,7	12,8	12,8	10,5	9,2	8,8
f	2,4	2,6	2,4	2,6	3	3	3,2	3,1	5,2	8,0	7,4	9,3	11,8	12,0

les fractions a, b, c augmentent au moins jusqu'à un mois de conservation. On note aussi, une diminution de la fraction e. Cependant, après 4 mois, l'élévation de la température n'affecte pas la fraction c, alors qu'elle semble entraîner une diminution de la fraction b.

On peut, donc, penser que les protéines de la fraction e s'hydrolysent pour donner la fraction f, alors que les protéines des fractions a, b et c sont relativement stables. L'augmentation de ces dernières fractions proviendrait de la dégradation des éléments de la fraction f, qui se superpose à l'hydrolyse des protéines de la fraction e.

- Influence du temps de conservation.

Cette comparaison porte sur un même type de moutarde conservé dans les mêmes conditions. Il ressort que toutes les fractions, sauf la f, diminuent après 4 mois de conservation. Les fractions a, b et c sont stables, surtout en début de conservation.

On remarque que le froid ralentit les phénomènes d'hydrolyse des protéines au moins dans le premier mois de réfrigération.

- Influence de SO₂.

L'anhydride sulfureux n'a pas d'influence notable à 4°C.

A température ambiante, SO₂ réduit la quantité de la fraction e. Cette diminution est compensée, en présence de lumière naturelle, par l'augmentation des fractions a, b, c et d. Dans l'obscurité, seul le pourcentage de la fraction b augmente. Autrement dit, en présence de lumière, la stabilité des protéines des fractions a, b, c, d est accrue par le SO₂.

Les pâtes de moutarde avec SO₂ ont été préparées une semaine avant les pâtes de moutarde sans SO₂. Ce qui se traduit par une différence dans l'importance de l'hydrolyse des protéines pour les moutardes analysées dès réception ou conservées à 4°C. Cette différence s'estompe lorsque les produits sont placés à température ambiante.

3 - Composition en acides aminés des protéines.

31. Acides aminés totaux

Les résultats, exprimés en μ moles et en mg d'acide aminé pour 100 mg d'azote, sont consignés dans les tableaux n° 8 à 11. Les valeurs correspondent aux moyennes de 3 analyses dont les résultats sont groupés.

Au cours de l'hydrolyse, l'asparagine se transforme en acide aspartique. De même, l'acide glutamique dosé inclut la glutamine de l'échantillon.

Les acides aminés les plus représentés sont toujours l'acide glutamique, la proline et la glycine. Il est, en outre, important du point de vue nutritionnel de suivre l'évolution de la teneur en lysine. L'indice chimique de la lysine est 86,5 % pour les graines entières et de 87,9 % pour les pellicules.

Les acides aminés soufrés sont peu abondants (cependant, les teneurs indiquées sont probablement sous-estimées car notre méthode d'hydrolyse entraîne une destruction partielle de ces acides aminés). BOUQUET (1971) avait indiqué 8,6 % de cystéine dans un broyat de graine de moutarde.

Une étude comparative des résultats obtenus pour les différentes parties anatomiques de la graine révèle que :

- les amandes sont plus riches en acide glutamique, en leucine, en cystéine et en méthionine ; alors que la valine, la lysine et l'hydroxyproline sont plus abondantes dans les pellicules.

- la quantité d'acides aminés dosée est plus importante dans les pellicules. Autrement dit, la teneur en azote non protéique est plus élevée dans les amandes. Ce qui est en accord avec les résultats de VANGHEESDAELE et FOURNIER (1980) qui ont trouvé nettement plus de sinigrine dans les amandes que dans les pellicules.

Tableau 8 : Composition en acides aminés (AA) des graines entières

Acides Aminés	Quantité en μ moles d'AA pour 100 mg d'N	Pourcentage "molaire" des AA	Quantité en mg d'AA pour 100 mg d'N	Pourcentage "massique" des AA
ASP	285	7,6	37,9	7,7
HYPRO	9	0,2	1,2	0,2
THR	262	7	31,2	6,4
SER	166	4,4	17,4	3,6
GLU	432	11,5	63,6	13
PRO	416	11,1	47,9	9,8
GLY	410	10,9	30,8	6,3
ALA	238	6,4	21,2	4,3
VAL	167	4,5	19,6	4
CYS	66	1,8	15,9	3,3
MET	47	1,3	7	1,4
ILE	247	6,6	32,4	6,6
LEU	245	6,5	32,1	6,6
TYR	114	3	20,7	4,2
PHE	129	3,5	21,3	4,4
ORN	9	0,2	1,5	0,3
LYS	229	6,1	41,8	8,5
HIS	124	3,3	19,2	3,9
ARG	153	4,1	26,7	5,5
Total	3748	100 %	489,4	100 %

Tableau 9 : Composition en acides aminés (AA) des "amandes grosses"

Acides Aminés	Quantité en μ moles d'AA pour 100 mg d'N	Pourcentage "molaire" des AA	Quantité en mg d'AA pour 100 mg d'N	Pourcentage "massique" des AA
ASP	237	7,2	31,5	7,3
HYPRO	5	0,1	0,7	0,2
THR	161	4,9	19,2	4,4
SER	157	4,8	16,5	3,8
GLU	488	14,8	71,8	16,5
PRO	300	9,1	34,5	7,9
GLY	321	9,8	24,1	5,5
ALA	227	6,9	20,2	4,7
VAL	150	4,6	17,6	4,1
CYS	73	2,2	17,5	4
MET	59	1,8	8,8	2
ILE	245	7,4	32,1	7,4
LEU	250	7,6	32,8	7,6
TYR	95	2,9	17,2	4
PHE	104	3,2	17,2	4
ORN	12	0,4	2	0,5
LYS	165	5	30,1	6,9
HIS	81	2,5	12,6	2,9
ARG	157	4,8	27,3	6,3
Total	3287	100 %	433,7	100 %

Tableau 10 : Composition en acides aminés (AA) des "amandes fines"

Acides Aminés	Quantité en μ moles d'AA pour 100 mg d'N	Pourcentage "molaire" des AA	Quantité en mg d'AA pour 100 mg d'N	Pourcentage "massique" des AA
ASP	228	6,8	30,3	6,8
HYPRO	2	0,1	0,3	0,1
THR	161	4,8	19,2	4,3
SER	154	4,6	16,2	3,6
GLU	513	15,3	75,5	16,8
PRO	283	8,5	32,9	7,3
GLY	318	9,5	23,9	5,3
ALA	232	6,9	20,7	4,6
VAL	131	3,9	15,3	3,4
CYS	115	3,4	27,6	6,2
MET	83	2,5	12,4	2,8
ILE	243	7,2	31,9	7,1
LEU	310	9,2	40,7	9,1
TYR	85	2,5	15,4	3,4
PHE	104	3,1	17,2	3,8
ORN	12	0,4	2	0,4
LYS	163	4,8	29,8	6,7
HIS	71	2,1	11	2,5
ARG	148	4,4	25,8	5,8
Total	3359	100 %	448,1	100 %

Tableau 11 : Composition en acides aminés (AA) des pellicules

Acides Aminés	Quantité en μ moles d'AA pour 100 mg d'N	Pourcentage "molaire" des AA	Quantité en mg d'AA pour 100 mg d'N	Pourcentage "massique" des AA
ASP	307	7,4	40,9	7,6
HYPRO	83	2	10,9	2
THR	275	6,6	32,8	6,1
SER	254	6,1	26,7	5
GLU	400	9,6	58,9	11
PRO	440	10,6	50,7	9,5
GLY	447	10,8	33,6	6,3
ALA	243	5,8	21,6	4
VAL	314	7,5	36,8	6,9
CYS	50	1,2	12	2,2
MET	34	0,8	5,1	0,9
ILE	248	6	32,5	6,1
LEU	242	5,8	31,7	5,9
TYR	136	3,3	24,6	4,6
PHE	136	3,3	22,5	4,2
ORN	9	0,2	1,5	0,3
LYS	256	6,2	46,8	8,7
HIS	125	3	19,4	3,6
ARG	157	3,8	27,3	5,1
Total	4156	100 %	536,3	100 %

- la quantité totale des acides aminés des graines entières est comparable à celle trouvée par BOUQUET (1971), soit 3726 μ moles pour 100 mg d'azote. Cependant les pourcentages de certains acides aminés, comme l'acide glutamique et la proline, sont assez différents. BOUQUET rapporte 19 % d'acide glutamique et 6,4 % de proline ; alors que nous avons obtenu pour ces acides aminés respectivement 11,5 % et 11,1 %. La différence provient, sans doute, des variétés de *Brassica juncea* utilisées.

32. Cas de l'hydroxyproline.

321. Mise en évidence de l'hydroxyproline

Elle est effectuée par chromatographie sur couches minces de gel de silice. La proline et l'hydroxyproline produisent, en présence de la ninhydrine, un pigment jaune ; ce qui permet de distinguer nettement les taches qui leur correspondent et que nous avons identifiées sur les chromatogrammes.

3211. Chromatographie unidimensionnelle.

On observe pour l'hydrolysat des pellicules (figure 8-1) une seule grosse tache jaune située sur la zone de R_f comprise entre 0,55 et 0,67. Lorsqu'on compare avec les taches correspondant aux solutions pures de proline et d'hydroxyproline, la présence de ce dernier acide aminé dans l'hydrolysat de pellicules est démontrée de manière évidente.

3212. Chromatographie bidimensionnelle.

Une double migration d'une injection d'hydrolysat provoque le dédoublement de la tache jaune (figure 8-2). Les pellicules contiennent de la proline et de l'hydroxyproline qui sont identifiées par comparaison avec les R_f des substances étalons chromatographiées dans les mêmes conditions (RANDERATH - 1971).

Figure 8 : Mise en évidence de l'hydroxyproline par chromatographie sur couche mince

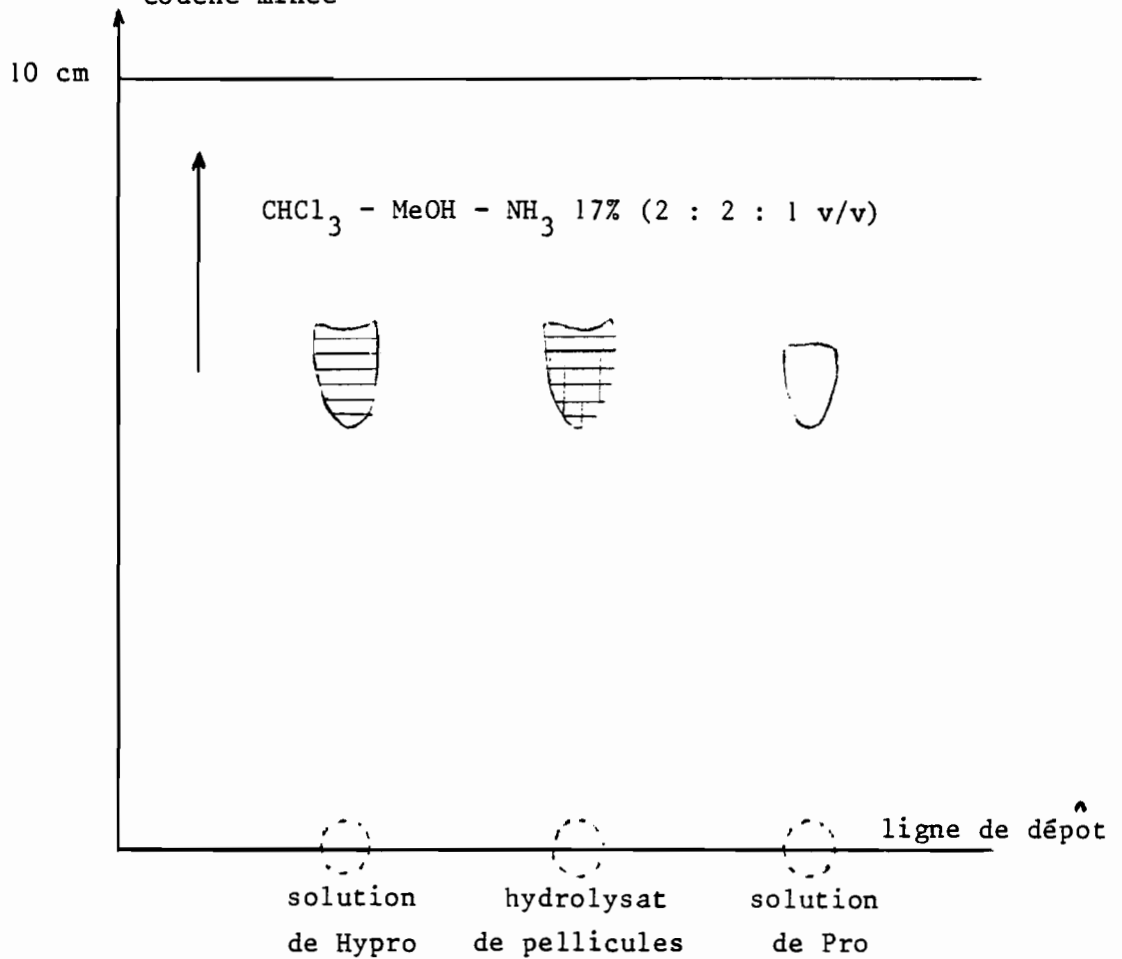


Fig. 8.1 : Chromatographie unidimensionnelle

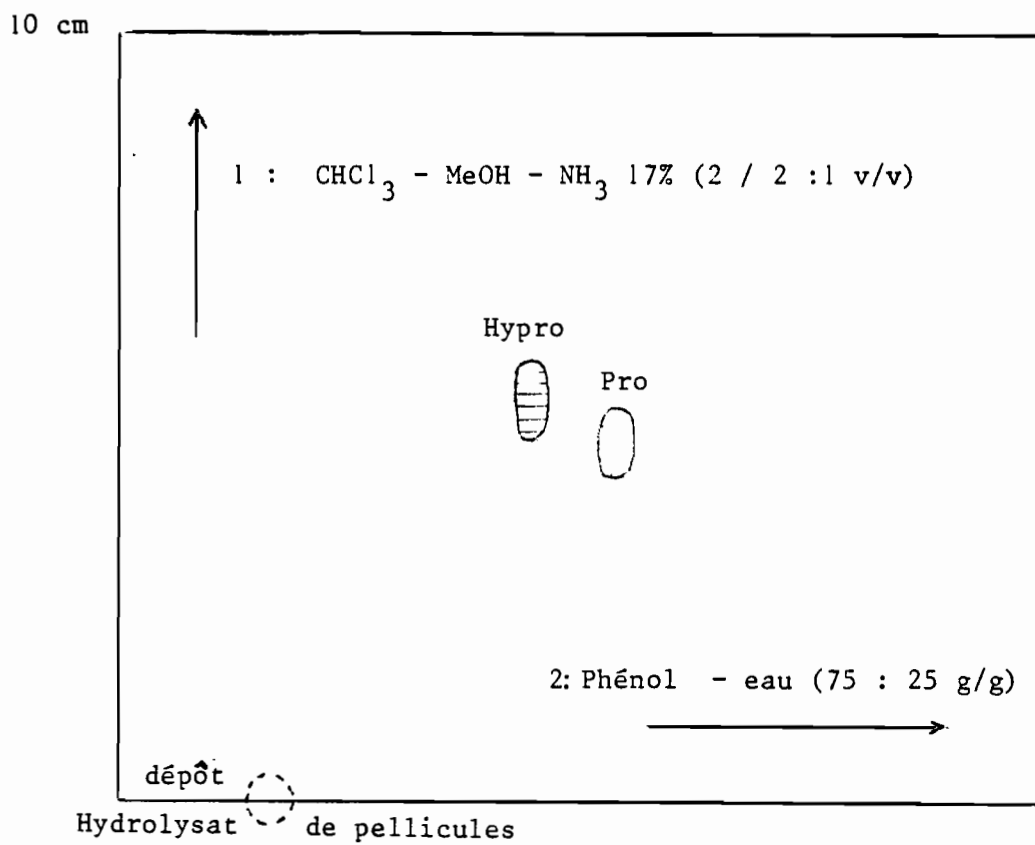


Fig. 8.2 : Chromatographie bidimensionnelle

La détermination des R_f donne les valeurs suivantes :

$$R_f = \frac{\text{Distance de migration de la substance}}{\text{distance de migration du front}}$$

Tableau 12 : R_f de la proline et de l'hydroxyproline dans la chromatographie bidimensionnelle

	Hydroxyproline	Proline
Première migration	0,52	0,46
Deuxième migration	0,38	0,45

322. Teneurs en hydroxyproline des parties anatomiques de la graine

Tableau 13 : Teneurs en hydroxyproline des parties anatomiques de la graine

	Pellicules	Graines entières	"Amandes grosses"	"Amandes fines"
Quantité d'Hypro (mg) pour 100 g d'azote	10 900	1 200	700	300
Quantité d'Hypro (mg) pour 100 g de matières premières	216	47	29	13

Ces valeurs sont obtenues à partir des résultats du triple dosage des acides aminés à l'autoanalyseur Technicon et de la détermination de la quantité d'azote de ces différents échantillons.

Si l'on tient compte du fait que la graine entière contient 20 % de pellicules et 80 % d'amande, on détermine que les téguments renferment 91 % de l'hydroxyproline de la graine.

Cet acide aminé peut être considéré, pratiquement comme "un marqueur" des sons dans la pâte.

Légalement, la moutarde doit contenir moins de 2 % de sons. La teneur en hydroxyproline doit être inférieure à 4,3 mg pour 100 g de pâte de moutarde.

Des protéines caractérisées par une forte teneur en hydroxyproline sont liées aux parois cellulaires des végétaux (LAMPART, 1970; CLELAND, 1971).

DARIMONT et al. (1973) affirment que, parmi les enzymes constitutives des parois cellulaires, seule la peroxydase paraît susceptible de contenir l'hydroxyproline.

ROTSTEIN (1982) a observé une activité peroxydasique insoluble dans les graines de moutarde. On peut donc penser que les pellicules contiennent une partie de la peroxydase.

Ceci plaide en faveur d'une dépelliculation des graines en début de fabrication de la moutarde ; cela d'autant plus que BONALY (1983) indique que les polyholosides de la pâte de moutarde provenant des pellicules sont très peu nombreux.

323. Dosage de l'hydroxyproline de la pâte de moutarde.

3231. Méthode de MOORE et STEIN.

C'est la méthode que nous avons utilisée dans le cadre de notre travail. Cependant, elle a des limites dans le cas du dosage de l'hydroxyproline en milieu industriel. D'une part, elle demande un investissement trop lourd pour la cadence des analyses nécessaires. D'autre part, elle n'est pas spécifique. D'où la difficulté de doser l'hydroxyproline dans la pâte de moutarde dont la teneur relative dans la composition en acides aminés est faible.

3232. Méthode de BERGMAN et LOXHEY (1963).

Cette méthode présente l'avantage d'être moins onéreuse et plus spécifique que la précédente. Elle est fondée sur l'oxydation de l'hydroxyproline en un composé proche du pyrole, suivie d'une condensation avec le p-diméthylaminobenzaldéhyde qui donne une coloration rouge.

Solutions :

- . Solution tampon acétate-citrate pH 6,0.
 - . 57 g Sodium acétate ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)
 - . 37,5 g Sodium citrate ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
 - . 5,5 g Acide citrique ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$)
 - . 385 ml Isopropanol
 - . On complète à 1000 ml avec de l'eau distillée.

- . Solution oxydante mère.

Chloramine T (Sel sodique de p-toluène sulfon-Chloramide) 7 % (p/v) dans de l'eau distillée. Cette solution est active pendant plusieurs semaines mais préparée journalièrement.

- . Solution oxydante prête à l'emploi.

Mélange de 1 volume de solution oxydante mère et 4 volumes de solution tampon acétate-citrate.

- . Solution d'Isopropanol.

- . Solutions HCl 6N et 0,001 N.

- . Solution mère de réactif d'Ehrlich.

On dissout 2 g de p-Diméthylamino-benzaldéhyde dans 3 ml d'acide perchlorique 60 %
Cette solution est stable dans une bouteille opaque pendant plusieurs semaines

. Solution standard d'hydroxyproline.

Solution à 400 ppm dans une solution de HCl 0,001 M pour minimiser le développement bactérien.

Cette solution est diluée au dixième avant le dosage.

Protocole.

Les protéines sont hydrolysées en présence de HCl 6 N, à 110°C pendant 24 heures (40 mg de farine délipidée dans 6 ml de HCl 5N). L'hydrolysate est évaporé sous vide puis récupéré dans 2 ml de solution HCl 0,001 N.

Le développement de la couleur rouge se fait dans des tubes à essai.

	Gamme étalon					Echantillon à analyser
numéro des tubes	1	2	3	4	5	6
Volume de solution diluée d'hydroxyproline (ml)	0	0,25	0,50	0,75	1	-
Volume d'eau distillée (ml)	1	0,75	0,50	0,25	-	-
Volume de solution à analyser (ml)	-	-	-	-	-	1

Chaque tube reçoit, ensuite, 2 ml de solution d'isopropanol et 1 ml de solution oxydante. Après agitation, on laisse les mélanges reposer pendant 4 minutes. Puis on ajoute 13 ml de réactif d'Ehrlich et les tubes sont placés pendant 25 mn, dans un bain-marie chauffé à 60°C. Ils sont refroidis pendant 2 à 3 minutes sous un robinet d'eau froide. Le contenu des tubes est ramené à 50 ml avec de l'isopropanol. L'absorption est lue à 558 nm dans les 4 heures.

33. Acides aminés libres.

Des échantillons de pâtes de moutarde sont prélevés, au cours du processus de fabrication et analysés une semaine après leur prélèvement. Les valeurs obtenues et consignées dans les tableaux 14, 15 et 16 sont celles d'une farine délipidée contenant 1 g d'azote et les moyennes de deux analyses.

L'examen de ces résultats nous inspire plusieurs observations :

- les acides aminés libres représentent un faible pourcentage des acides aminés totaux (1 %).

- Cependant , le broyat contient 9 fois plus d'acides aminés libres que les graines entières analysées par BOUQUET (1971). Les résultats sont de 438,6 μ moles contre 50,8 μ moles pour une farine contenant 1 g d'azote. Le broyage des graines de moutarde dans le verjus provoque une hydrolyse des protéines assez importante quand on sait que les acides aminés dosés par BOUQUET sont extraits à l'eau bouillante.

- Les acides aminés les plus représentés sont l'acide glutamique, l'acide aspartique, l'asparagine et la cystéine (l'abondance de ces acides aminés dans la graine et le caractère hydrophile et leurs chaînes latérales favorisant leur solubilisation) ; les acides aminés à chaînes latérales hydrophobes, notamment la proline, la valine et l'isoleucine, sont par contre, peu représentés .

- La teneur en cystéine du broyat semble confirmer le résultat de BOUQUET (1971) et corrobore la destruction partielle des acides aminés soufrés lors du dosage des acides aminés totaux.

- On constate une baisse de l'importance relative de certains acides aminés (acide glutamique, cystéine et méthionine), au cours de la fabrication de la moutarde. En fait, on distingue, d'une part, le broyat contenant les pellicules et d'autre part, les pâtes tamisées. Cette différence est imputable à l'hydrolyse des protéines des pellicules pendant le séjour d'une semaine dans ce milieu acide.

Tableau 14 : Compostion en acides aminés (AA) libres du broyat

Acides Aminés	Quantité en μ moles d'AA pour 1 g d'N	Pourcentage "molaire" des AA	Quantité en mg d'AA pour 1 g d'N	Pourcentage "massique" des AA
ASP	68	15,5	9,1	14,1
HYPRO	3,6	0,8	0,5	0,8
THR	11,9	2,7	1,4	2,2
SER	15	3,4	1,6	2,5
ASN	36,1	8,2	5,4	8,4
GLU	108,9	24,8	16	24,9
PRO	4	0,9	0,5	0,8
GLY	13,4	3,1	1	1,6
ALA	28,8	6,6	2,6	4
VAL	4,2	1	0,5	0,8
CYS	31,7	7,2	7,6	11,8
MET	12,4	2,8	1,9	3
ILE	5,7	1,3	0,7	1,1
LEU	24,8	5,7	3,3	5,1
TYR	9,2	2,1	1,7	2,6
PHE	9,6	2,2	1,6	2,5
ORN	9,4	2,1	1,6	2,5
LYS	11,9	2,7	2,2	3,4
HIS	8,2	1,9	1,3	2
ARG	21,8	5	3,8	5,9
Total	438,6	100 %	64,3	100 %

Tableau 15 : Composition en acides aminés (AA) libres de la pâte après tamisage

Acides Aminés	Quantité en μ moles d'AA pour 1 g d'N	Pourcentage "molaire" des AA	Quantité en mg d'AA pour 1 g d'N	Pourcentage "massique" des AA
ASP	58,2	15,5	7,7	14,3
HYPRO	3	0,8	0,4	0,7
THR	7,6	2	0,9	1,7
SER	12,5	3,3	1,3	2,4
ASN	38,5	10,3	5,9	11
GLU	107	28,5	15,7	29,2
PRO	3,7	1	0,4	0,7
GLY	12,4	3,3	0,9	1,7
ALA	28,5	7,6	2,5	4,7
VAL	3,6	1	0,4	0,7
CYS	19,7	5,2	4,7	8,8
MET	6,6	1,8	1	1,9
ILE	5,4	1,4	0,7	1,3
LEU	15,5	4,1	2	3,7
TYR	5,7	1,5	1	1,9
PHE	11,7	3,1	1,9	3,5
ORN	4	1,1	0,7	1,3
LYS	9,7	2,6	1,8	3,4
HIS	4,5	1,2	0,7	1,3
ARG	17,6	4,7	3,1	5,8
Total	375,4	100 %	53,7	100 %

Tableau 16 : Composition en acides aminés (AA) libres de la pâte de moutarde

Acides Aminés	Quantité en μ moles d'AA pour 1 g d'N	Pourcentage "molaire" des AA	Quantité en mg d'AA pour 1 g d'N	Pourcentage "massique" des AA
ASP	54	15,4	7,2	14,3
HYPRO	2,5	0,7	0,3	0,6
THR	6,6	1,9	0,8	1,6
SER	10,4	3	1,1	2,2
ASN	36,5	10,4	5,5	10,9
GLU	106	30,2	15,6	31,1
PRO	3,5	1	0,4	0,8
GLY	11,8	3,3	0,9	1,8
ALA	25	7,1	2,2	4,4
VAL	4,2	1,2	0,5	1
CYS	14,6	4,2	3,5	6,9
MET	4,8	1,4	0,7	1,4
ILE	5,5	1,6	0,7	1,4
LEU	10,5	3	1,4	2,8
TYR	5,5	1,6	1	2
PHE	12,5	3,5	2,1	4,2
ORN	3,8	1,1	0,6	1,2
LYS	9,7	2,8	1,8	3,6
HIS	4,8	1,4	0,7	1,4
ARG	18,4	5,2	3,2	6,4
Total	350,6	100 %	50,2	100 %

34. Evolution de la teneur en lysine libre au cours de la conservation de la pâte.

Tableau 17 : Teneur en lysine libre des pâtes au cours de la conservation

Echantillons	Analyse dès réception		Conservation à 4°C				Conservation à 20°C à la lumière			
			1 mois		4 mois		1 mois		4 mois	
	avec SO ₂	sans SO ₂	avec SO ₂	sans SO ₂	avec SO ₂	sans SO ₂	avec SO ₂	sans SO ₂	avec SO ₂	sans SO ₂
Quantité de lysine (moles) pour 1 g d'azote	40,7	31,3	43,1	33,5	52,4	42,0	97,4	42,0	126,6	115,6
Quantité de lysine (mg) pour 1 g d'azote	7,4	5,7	7,9	6,1	9,6	7,7	17,8	7,7	23,1	21,1

Les teneurs de lysine libre de la moutarde (échantillon "analyse dès réception") sont plus élevées que celles de la moutarde du tableau 16, après une période de conservation comparable.

Les différences proviendraient des conditions de traitement ou des variétés de *Brassica juncea* utilisées.

Les résultats nous inspirent plusieurs observations :

- la libération de la lysine s'accroît avec le temps de conservation.

- la température de conservation joue un rôle important. La teneur en lysine libre augmente faiblement à 4°C et fortement à température ambiante.

- l'effet de la présence de l'anhydride sulfureux est indécélable à 4°C alors qu'il est très net en début de conservation à température ambiante.

En conclusion, nous pouvons dire que la teneur en lysine libre dépend de la vitesse d'hydrolyse des protéines et de la disparition momentanée ou définitive de la lysine consécutive à la participation de cet acide aminé aux phénomènes de brunissement non enzymatique.

Ce type de brunissement provient de la condensation entre les composés carbonylés (sucres réducteurs...) et les acides aminés ou les protéines ayant un groupement ϵ -aminé de la lysine. Cette condensation aboutit à la formation de cétosamines ou aldosesamines. Ces derniers composés peuvent se transformer en polymères bruns par la dégradation de Strecker qui libère du gaz carbonique et de l'ammoniac. Ils peuvent, aussi, donner, par énolisations successives et en restituant l'acide aminé, des composés dicarboxylés qui sont de puissants facteurs de brunissement.

Il se passe, donc, une période dite "d'induction" entre le début de la condensation et l'apparition des composés bruns.

Les conditions de pH de la moutarde et l'élévation de la température de conservation accroissent la vitesse d'hydrolyse des protéines et donc la teneur en lysine libre. Mais, en même temps, elles catalysent les réactions du brunissement non enzymatique.

L'anhydride sulfureux, en réagissant avec les sucres réducteurs, retarde la condensation de Maillard, comme l'indique les teneurs en lysine libre des échantillons conservés un mois à température ambiante. La durée de l'efficacité de SO_2 est inférieure à 4 mois, durée au bout de laquelle, l'augmentation de la teneur en lysine libre est identique dans les échantillons avec et sans anhydride sulfureux.

Il faut noter que SO_2 réagit avec les composés dicarboxylés pour donner des acides sulfoniques stables. Il inhibe, de ce fait, l'apparition des composés bruns.

4 - Etude de la myrosinase.

41. Analyse qualitative de la myrosinase.

411. Détection du glucose sur gel d'agarose.

Le test est positif lorsqu'on met dans les trous périphériques une solution de protéines brutes ou de myrosinase de graines de *Brassica juncea* ou de *Sinapis alba*. Il est à noter que la couleur bleue de la ceinture qui se forme autour du trou central vire rapidement vers le brun indiquant un excès de glucose par conséquent d'eau oxygénée par rapport à la peroxydase.

Le test est négatif si l'on utilise les protéines brutes des pâtes de moutarde.

412. Détection du glucose après électrophorèse.

Cette méthode met en évidence l'activité de la myrosinase des graines mais ne permet pas la localisation de la ou des fractions possédant cette activité. En effet, il n'a pas été possible de contrôler l'atmosphère au-dessus de la feuille de papier où s'effectue l'oxydation de l'*o*-toluidine par la peroxydase. Ainsi la coloration bleue migre vers les bords du papier lorsque celui-ci se dessèche.

Nous n'avons pas observé de tache bleue avec les myrosinases des pâtes de moutarde.

413. Détection du sulfate acide par le chlorure de baryum.

Cette méthode n'est pas plus satisfaisante que la précédente. En effet, le pourcentage de polyacrylamide du gel utilisé ne permet pas une bonne séparation des fractions protéiques. On observe, sur la zone de migration des protéines des graines, des dépôts de sulfate de baryum.

414. Localisation de la myrosinase.

La myrosinase est localisée par comparaison des migrations des protéines brutes et des myrosinases purifiées. Il apparaît hautement probable que la fraction b possède une activité thioglucosidasique.

42. Détermination quantitative de l'activité de la myrosinase.

421. Méthode de SCHWIMMER.

4211. Calcul des coefficients d'extinction molaire.

Les longueurs d'onde d'absorption maximale de la sinigrine et l'isothio-
cyanate d'allyle sont comprises respectivement entre 227 et 228 nm et
entre 242 et 243 nm.

Les coefficients d'extinction molaire sont déterminés selon la loi de
BEER-LAMBERT : $DO = \epsilon \cdot l \cdot c$

où DO est la densité optique de la solution

ϵ : coefficient d'extinction molaire de la substance

l : largeur de la cuve (l = 1 cm)

c : concentration molaire de la solution

Tableau 18 : Coefficients d'extinction molaire de la sinigrine et de
l'allylisothiocyanate à 227,5 nm

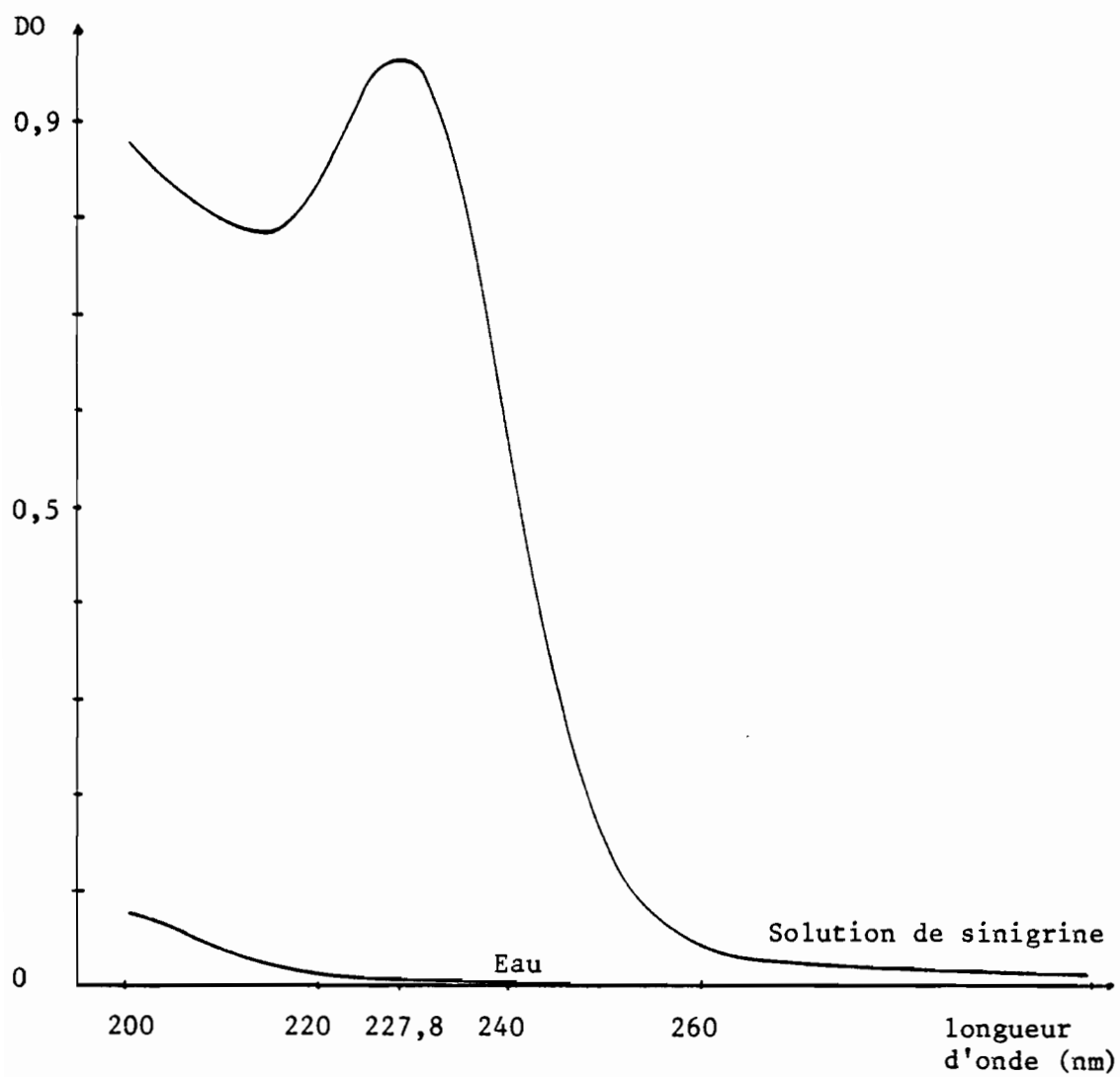
	Sinigrine	Allylisothiocyanate
ϵ l mole ⁻¹ cm ⁻¹	7360	520
ϵ (l mole ⁻¹ cm ⁻¹) d'après SCHWIMMER (1961)	7800	564
ϵ (l mole ⁻¹ cm ⁻¹) d'après HENDERSON et EWEN (1972)	6900	565

Ces résultats sont obtenus à partir des figures 9 , 10 et 11.

4212. Calcul des activités spécifiques.

L'activité spécifique de la myrosinase est la quantité de sinigrine
dégradée par unité de masse d'enzyme et par minute.

Figure 9 : Spectre de la sinigrine
(solution de sinigrine à 128,81 μ moles
par litre dans l'eau)



$\lambda = 227,8$
 $DO = 0,945$
 $\epsilon = 7340 \text{ l.mole}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

Figure 10 : Spectre de la sinigrine
(solution de sinigrine à 133,34 μ moles
par litre dans du tampon phosphate-acide
citrique pH 5,69)

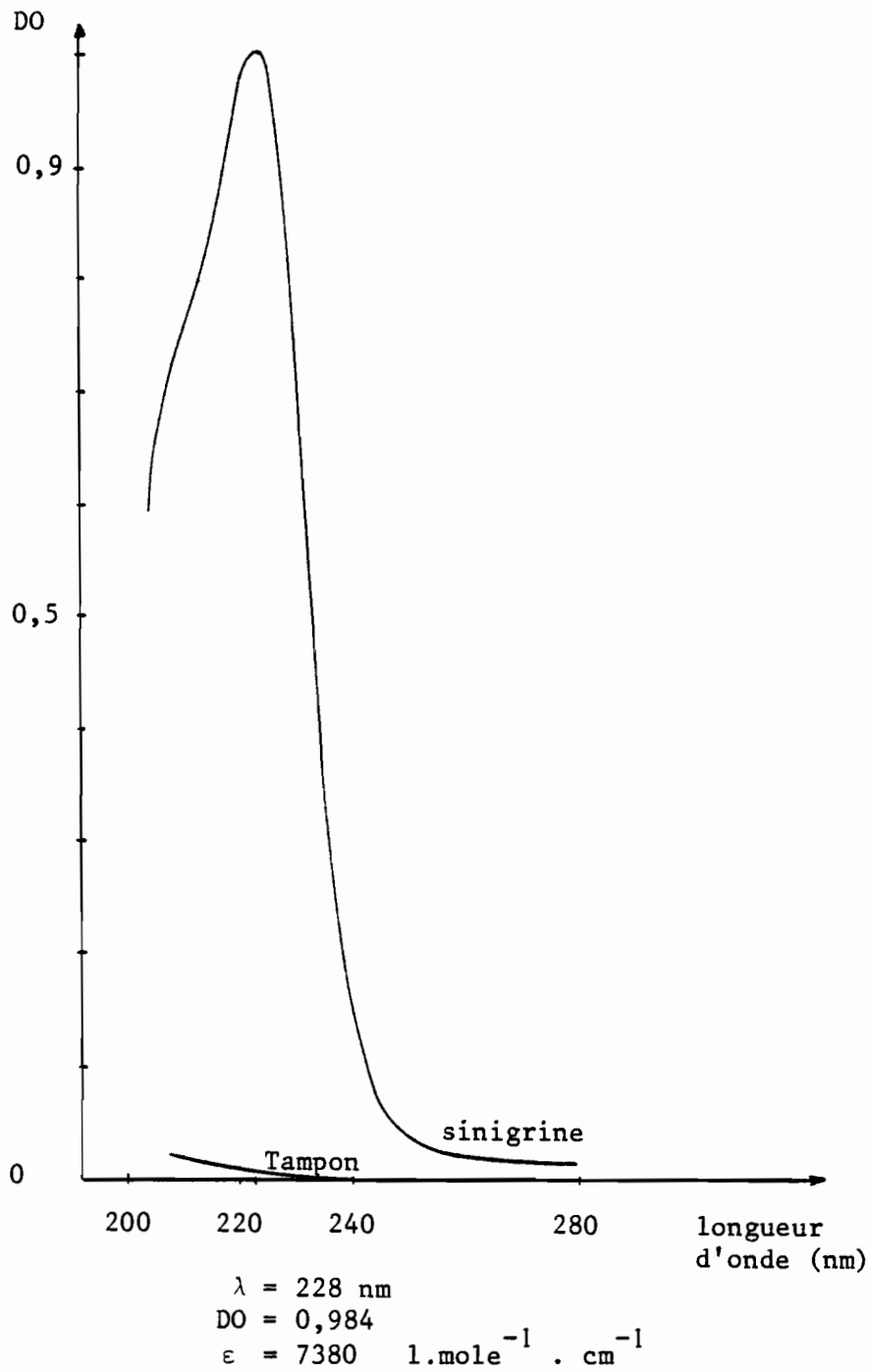
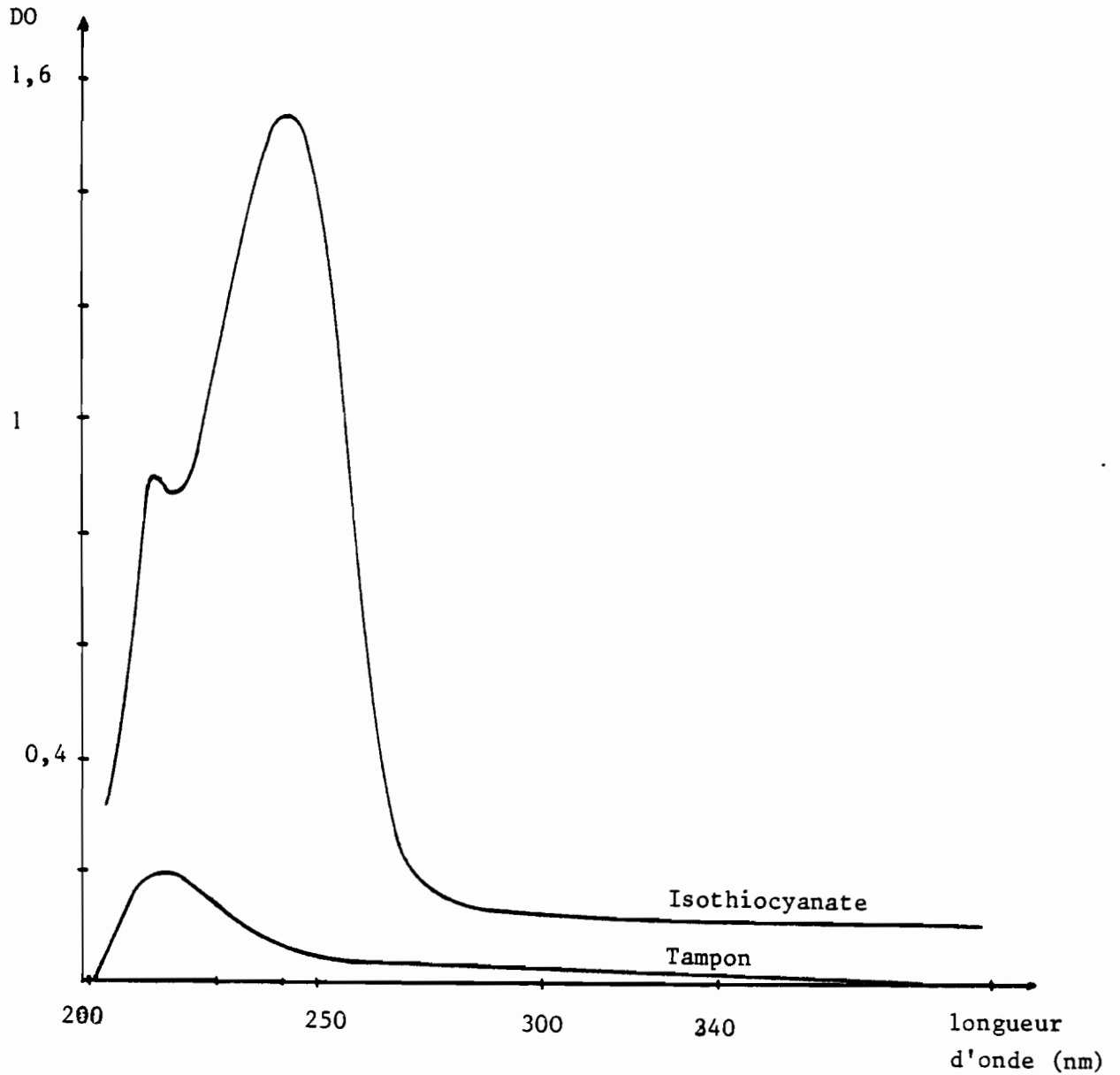


Figure 11 : Spectre de l'isothiocyanate d'allyle
(solution d'isothiocyanate 2 mM dans le
tampon citrate pH 5,40)



$\lambda_{\max} = 242,5\text{nm} ; \epsilon = 710 \text{ l mole}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

$\lambda_{\max} = 228 \text{ nm} ; \epsilon = 520 \text{ l mole}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Les cinétiques enzymatiques des myrosinases des graines de *Sinapis alba* et de *Brassica juncea* sont enregistrées dans les figures 12, 13 et 14.

La constatation de SCHWIMMER (1961), à savoir que la dégradation de la sinigrine se fait de façon linéaire en début d'hydrolyse, est vérifiée.

Les activités spécifiques sont déterminées au niveau des portions droites des courbes soit :

- entre 1 et 15 mm pour la myrosinase de *Sinapis alba*
- et entre 2 et 60 mm pour la myrosinase de *Brassica juncea*

Tableau 19 : Activités spécifiques des myrosinases des graines de *Brassica juncea* et de *Sinapis alba*.

	Myrosinase de <i>Sinapis alba</i>	Myrosinase de <i>Brassica juncea</i>
Activité spécifique $\frac{\mu\text{moles sinigrine}}{\text{mm} \cdot \text{mg de myrosinase}}$	0,15 ± 0,002	$4,8 \cdot 10^{-3}$ ± $0,0210^{-3}$
Activité spécifique $\frac{\mu\text{g sinigrine}}{\text{mm} \cdot \text{mg de myrosinase}}$	59,6 ± 0,9	1,92 ± 0,09

Dans les conditions de notre expérience, la myrosinase de *Sinapis alba* est 30 fois plus active que celle de *Brassica juncea*. De plus, ANDRE et DUROU-CARBOUERES (1957) indiquent que les graines de *Sinapis alba* ne contiennent pas de désulfurase des sénévols. L'utilisation de la myrosinase de *Sinapis alba* dans la fabrication de la moutarde peut favoriser à double titre, le développement de l'arôme.

Notons que cette utilisation est interdite dans la confection de la moutarde de Dijon.

En outre, dans le même ordre d'idées, l'utilisation de myrosinase de microorganismes est envisageable après des travaux préliminaires de sélection.

En effet, la littérature disponible sur ce sujet fait état de l'hétérogénéité de ces myrosinases. Si l'action β -thioglucosidasique est identique pour toutes ces enzymes, leurs comportements vis-à-vis de certains ions sont tout à fait différents. De plus, REESE et al (1958) notent que la sinigrinase d'*Aspergillus sidowi* hydrolyse, outre les

Figure 12 : Cinétique de la myrosinase de *Sinapis alba* à 40°C
(solution : myrosinase 12,2 mg/l
sinigrine 132,84 μ moles/l
dans tampon phosphate - acide citrique pH 5;70)

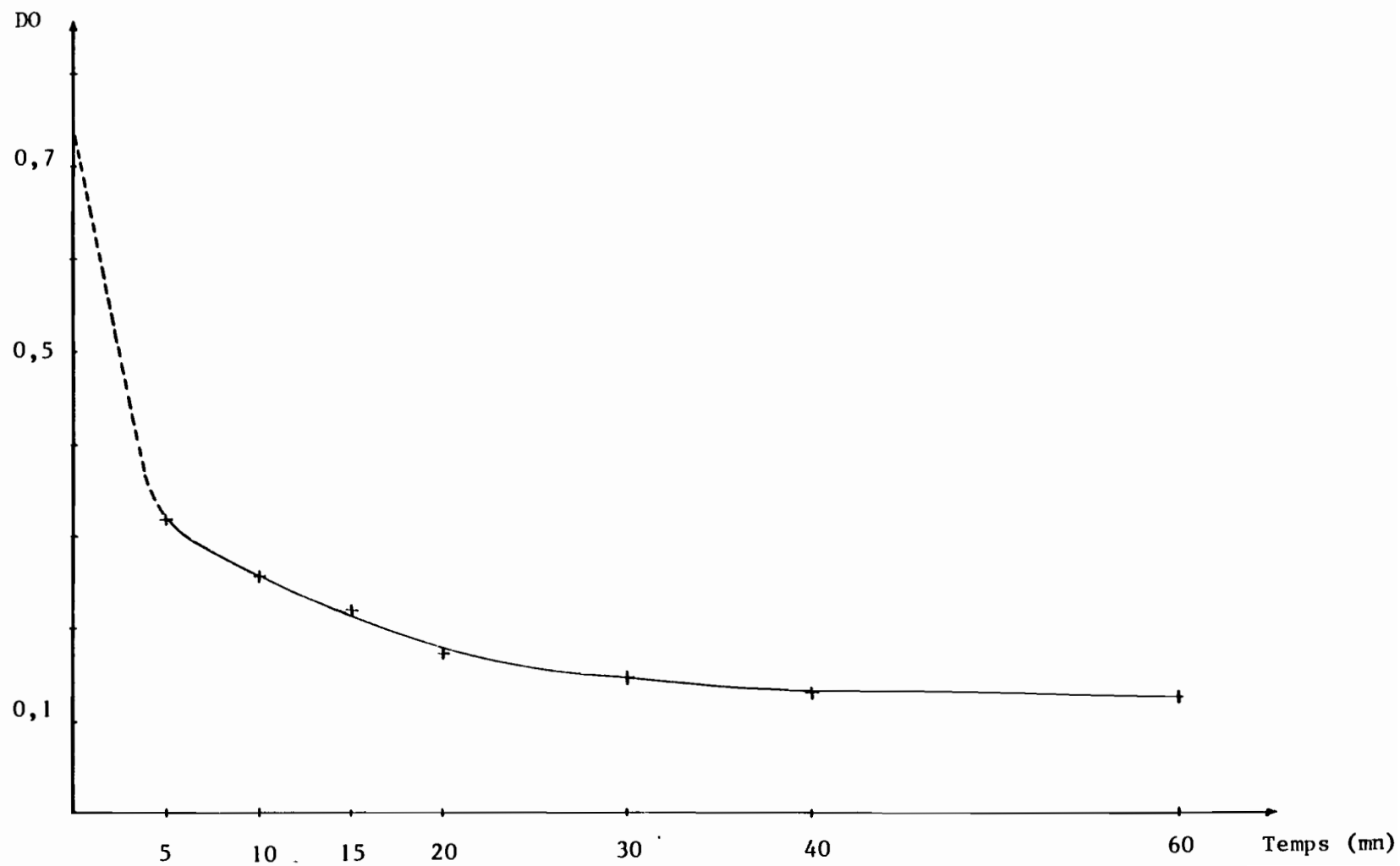


Figure 13 : Cinétique de la myrosinase de *Sinapis alba* à 40°C
(solution : myrosinase 19,2 mg/l
sinigrine 128,94 μ moles/l
dans tampon phosphate - acide citrique pH 5,70)

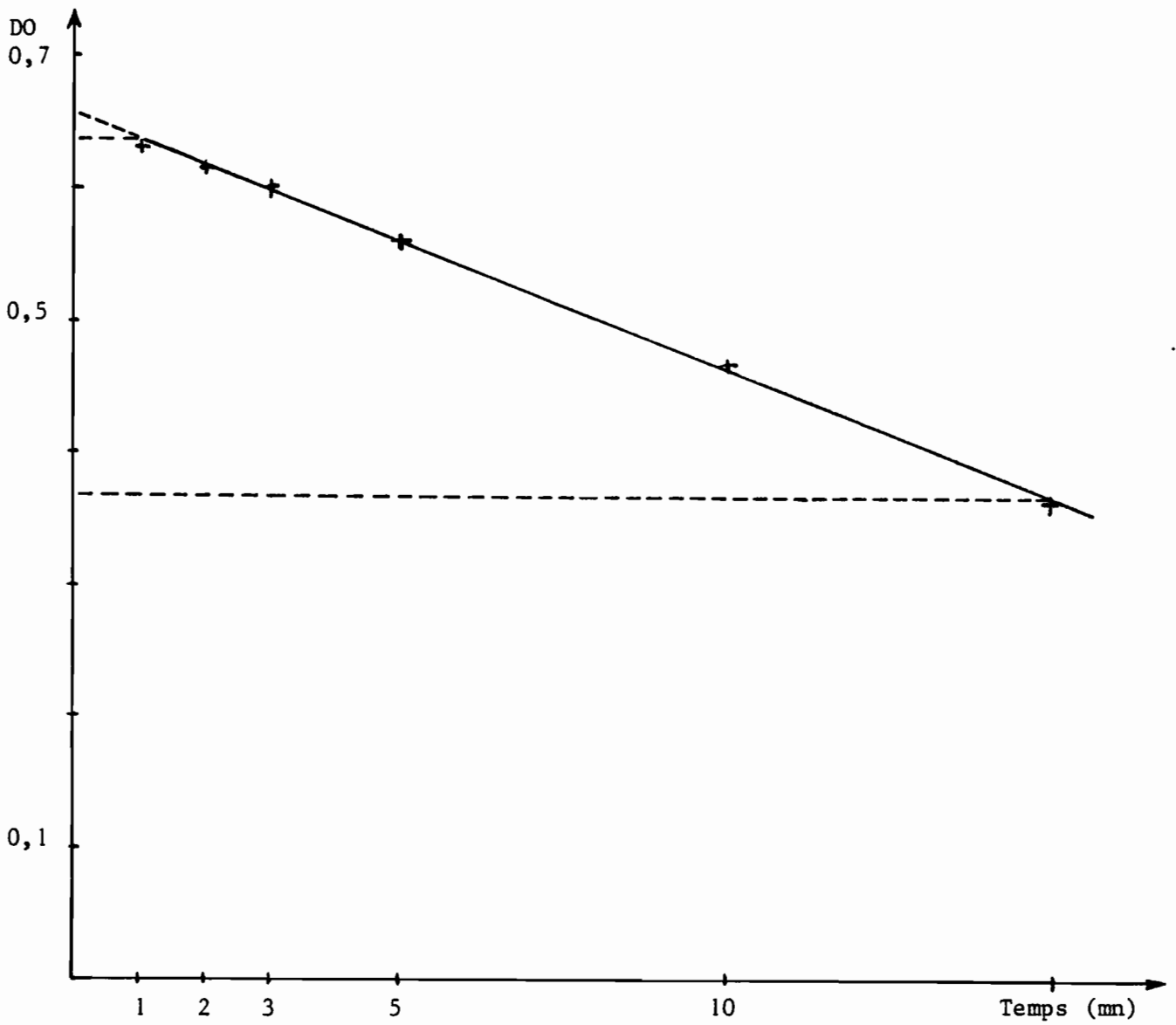
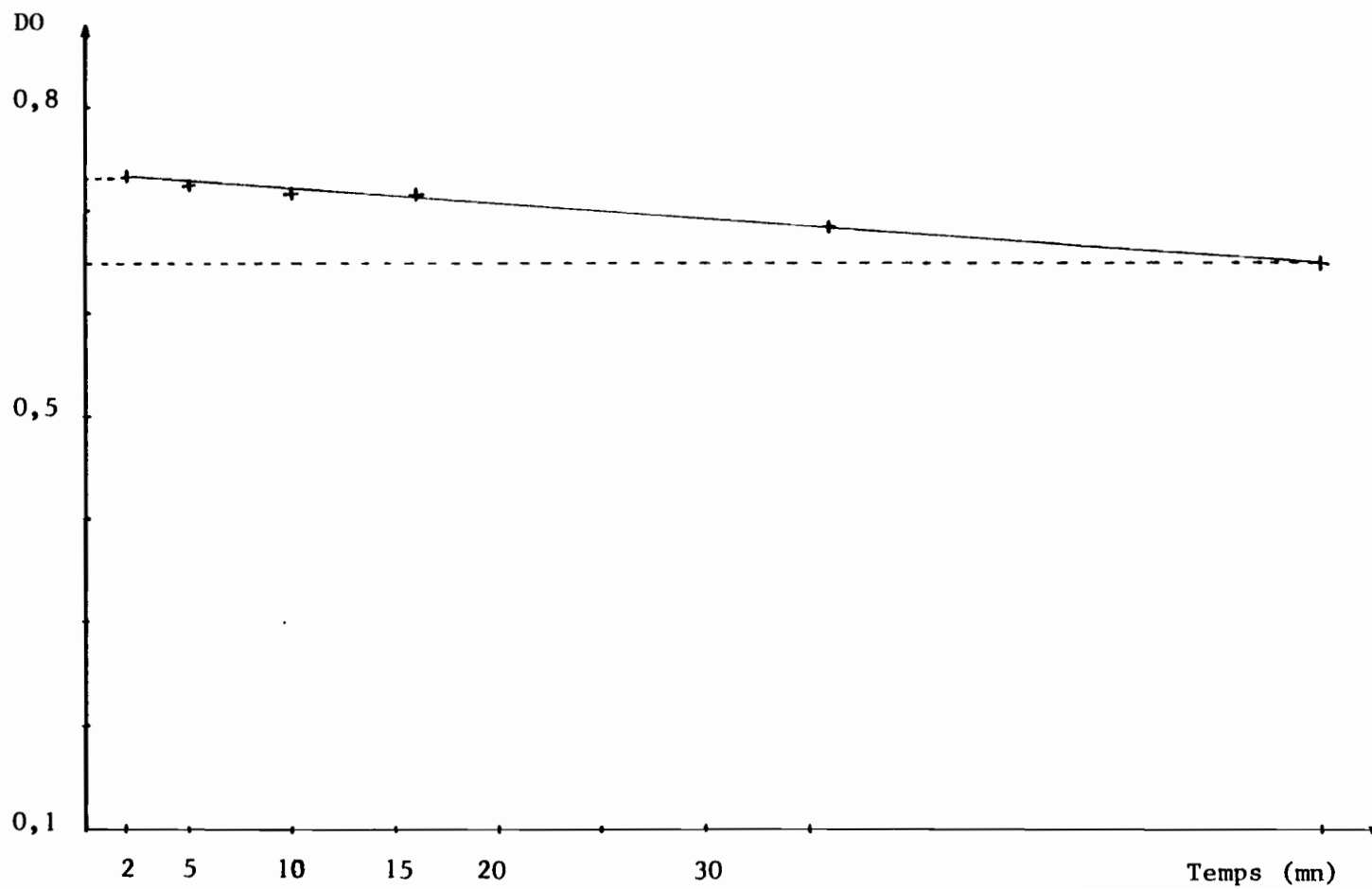


Figure 14 : Cinétique de la myrosinase de *Brassica juncea* à 40°C
(solution : myrosinase 42,7 mg/l
sinigrine 132,08 µmoles/l
dans tampon phosphate - acide citrique pH 5,70)



β -glucosides testés, le maltose, l'amidon et le saccharose. Ce qui pourrait avoir une incidence sur la texture de la pâte. S'agit-il d'un problème de purification de la solution enzymatique ?

L'expérimentation apportera la réponse.

4213 Evolution de l'activité enzymatique de la myrosinase des pâtes de moutarde au cours de la conservation.

Les activités spécifiques des myrosinases sont déterminées après incubation à 40°C pendant 30 minutes.

Tableau 20 : Activités spécifiques de myrosinases des pâtes de moutarde au cours de la conservation.

	Analyse dès réception		Conservation 1 mois à 4°C		Conservation à 20°C, 1 mois à l'obscurité		Conservation à 20°C, 1 mois à la lumière	
	Sans SO ₂	Avec SO ₂	Sans SO ₂	Avec SO ₂	Sans SO ₂	Avec SO ₂	Sans SO ₂	Avec SO ₂
Activité spécifique $\pm 0,3$ ($\frac{10^3 \mu\text{moles sinigrine}}{\text{mm} \cdot \text{mg myrosinase}}$)	1,7	0,9	1,1	0,6	0,9	0,3	1,0	0,4
Activité spécifique $\pm 0,1$ ($\frac{\mu\text{g sinigrine}}{\text{mm} \cdot \text{mg myrosinase}}$)	0,7	0,4	0,4	0,2	0,3	0,1	0,4	0,2

L'activité spécifique de la myrosinase de la pâte de moutarde baisse considérablement au cours de la conservation. La dégradation de l'enzyme est beaucoup plus rapide dans les premiers jours qui suivent la préparation de la moutarde. En une semaine l'activité spécifique baisse de plus de 65 %.

Les activités enzymatiques des myrosinases des moutardes contenant l'anhydride sulfureux sont plus faibles. Le délai, d'une semaine, qui sépare les dates de préparation des deux types de moutarde ne suffit pas à expliquer ces différences.

4214. Influence de l'acide ascorbique.

L'acide ascorbique stimule la myrosinase. C'est la raison pour laquelle nous l'avons utilisé pour accroître l'activité des thioglucosides glucosylhydrolases des pâtes de moutarde. Ces essais sont effectués à 40°C et à 50°C.

Le spectre de l'acide ascorbique (fig. 15) montre que l'acide absorbe à 227,5 nm. La figure 16 indique que l'ascorbate se dégrade considérablement à 266 nm, et de façon non négligeable à 227,5 nm dans les conditions de conservation à température ambiante et en présence de la lumière.

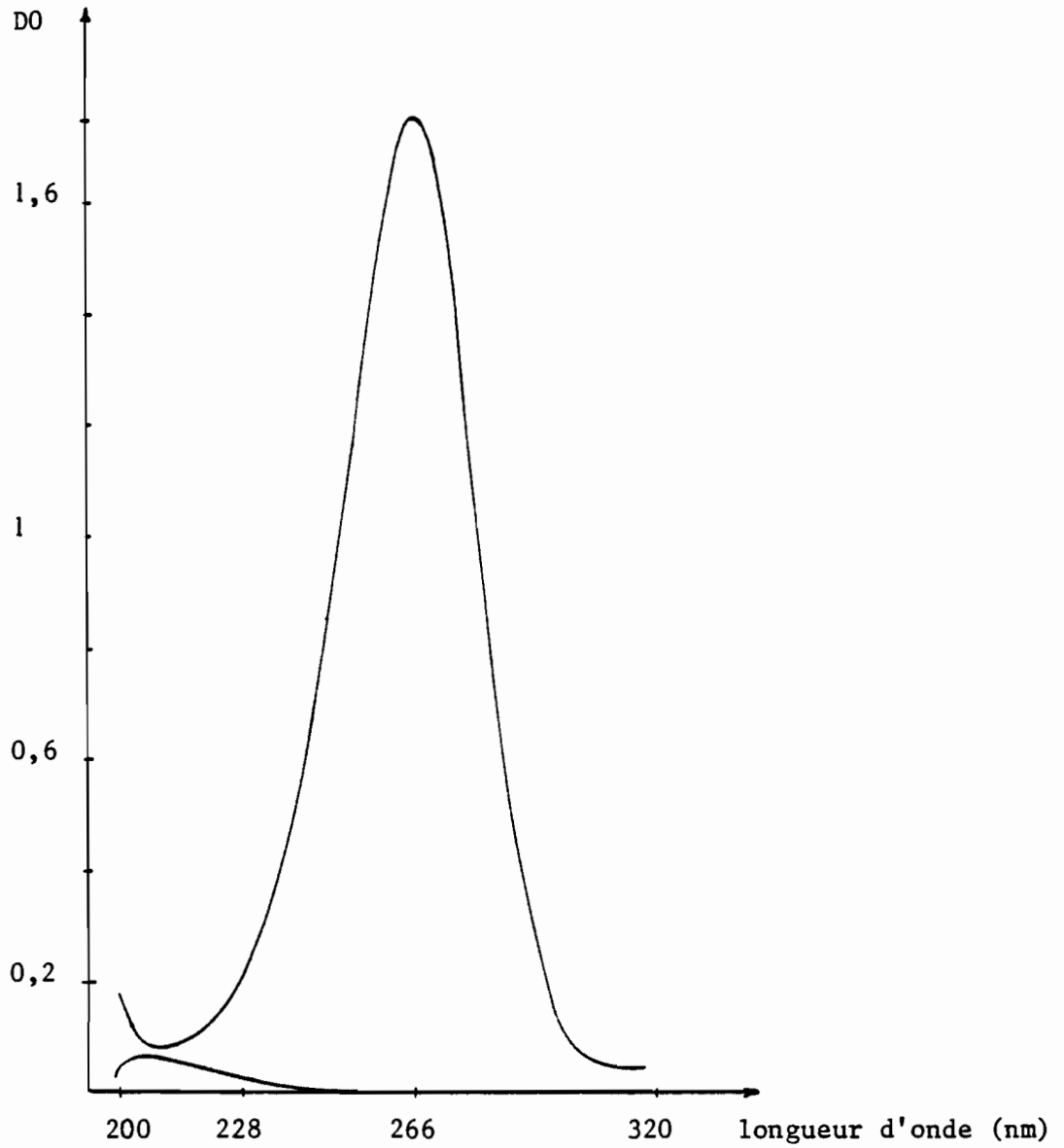
La figure 17 montre que l'acide ascorbique se dégrade à 40°C de façon identique dans le tampon et dans la solution enzymatique. En présence de sinigrine, cette dégradation est atténuée et cela d'autant plus que la teneur en thioglucoside est grande. Nous observons que la courbe représentant la moyenne des densités optiques de la solution de sinigrine et de la solution enzymatique coïncide pratiquement avec la courbe du mélange. Autrement dit, l'action de l'acide ascorbique sur la myrosinase des pâtes de moutarde est imperceptible. Elle est également, indécélable à 50°C où la dégradation de l'ascorbate est encore plus importante.

422. Méthode du dosage du glucose.

A la longueur d'onde d'absorption maximale de NADPH (340 nm), les solutions de sinigrine, d'enzyme et d'isothiocyanate d'allyle n'absorbent pratiquement pas ; comme l'indiquent les spectres de ces solutions. Voir figures 11, 18, 19 et 20.

Les activités spécifiques des myrosinases sont déterminées après incubation, à 40°C pendant 30 minutes, d'une solution de sinigrine et d'enzymes de concentrations respectives de 20 µmoles/ml et 2 mg/ml environ.

Figure 15 : Spectre de l'acide ascorbique
(solution d'acide ascorbique à 20 mg/l
dans le tampon phosphate - acide citrique pH 5,70
conservée 30 mn à 20°C à la lumière)



$\lambda = 266 \text{ nm}$, DO = 1,75
 $\lambda = 228 \text{ nm}$, DO = 0,23

Figure 16 : Dégradation de l'acide ascorbique
(solution d'acide ascorbique à 20 mg/l
dans tampon phosphate - acide citrique pH 5,70
conservée à 20°C à la lumière)

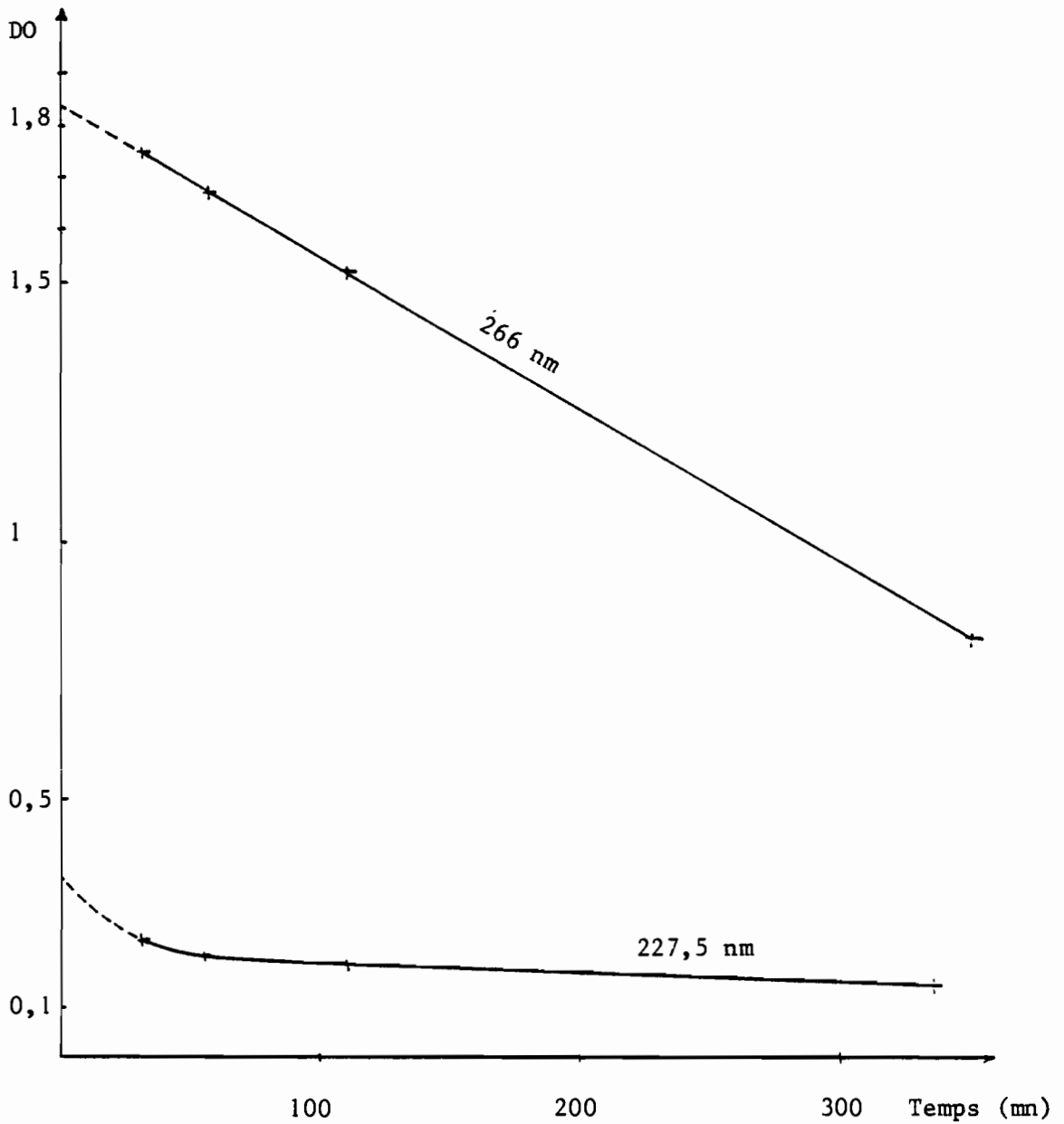
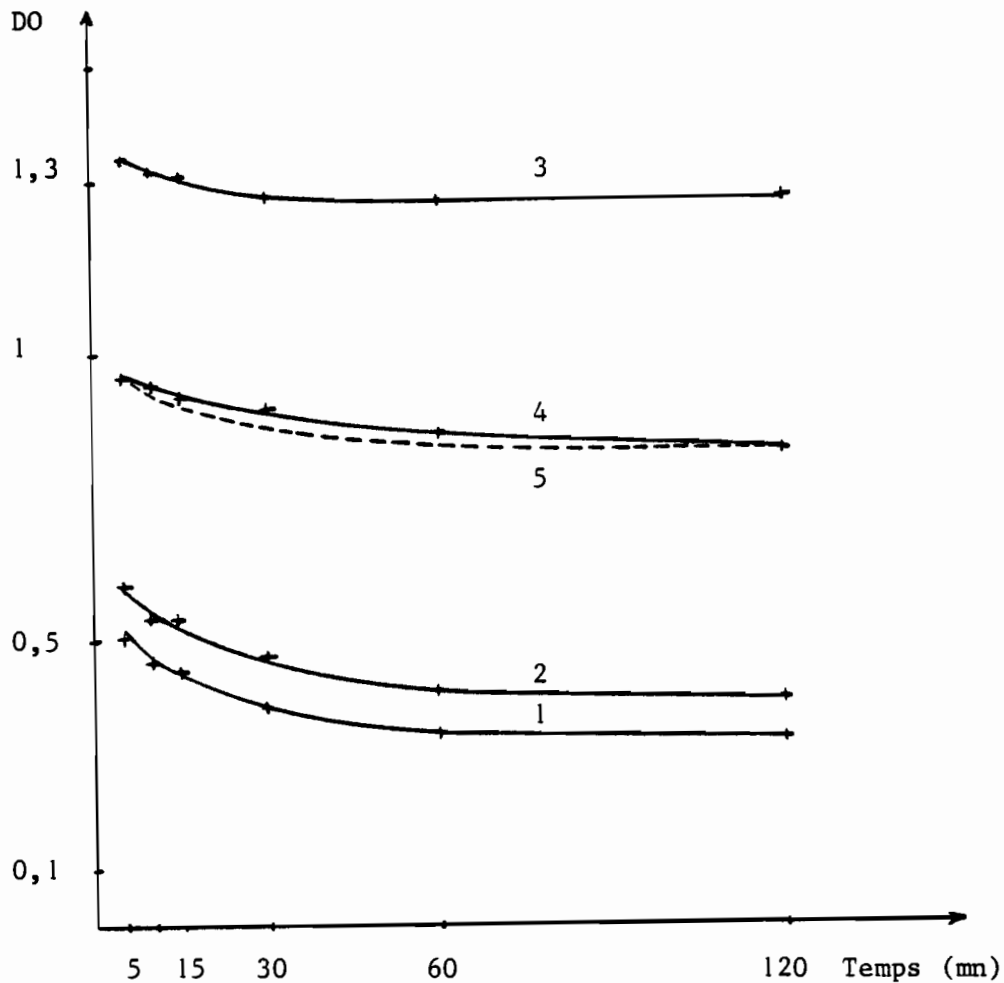


Figure 17 : Effet de l'acide ascorbique
à 50°C sur la myrosinase
de la pâte de moutarde avec SO₂
conservée 1 mois à 4°C



DO déterminée à 227,5 nm contre de l'eau distillée

- 1 : Tampon pH 5,65
(acide ascorbique 0,375 mM + tampon phosphate - acide citrique)
- 2 : Enzyme "moutarde avec SO₂ conservée 1 mois à 4°C"
(solution enzyme 120,96 mg/l dans le tampon)
- 3 : Sinigrine
(solution de sinigrine 126,20 moles/l dans le tampon)
- 4 : Mélange : 1 volume de solution d'enzyme + 1 volume de solution de sinigrine
- 5 : Courbe en pointillé : moyenne des DO des solutions initiales d'enzyme et de sinigrine

Figure 18 : Spectre de la sinigrine
(solution de sinigrine à 127,18 moles/l
dans tampon citrate - acide citrique pH 5,38)

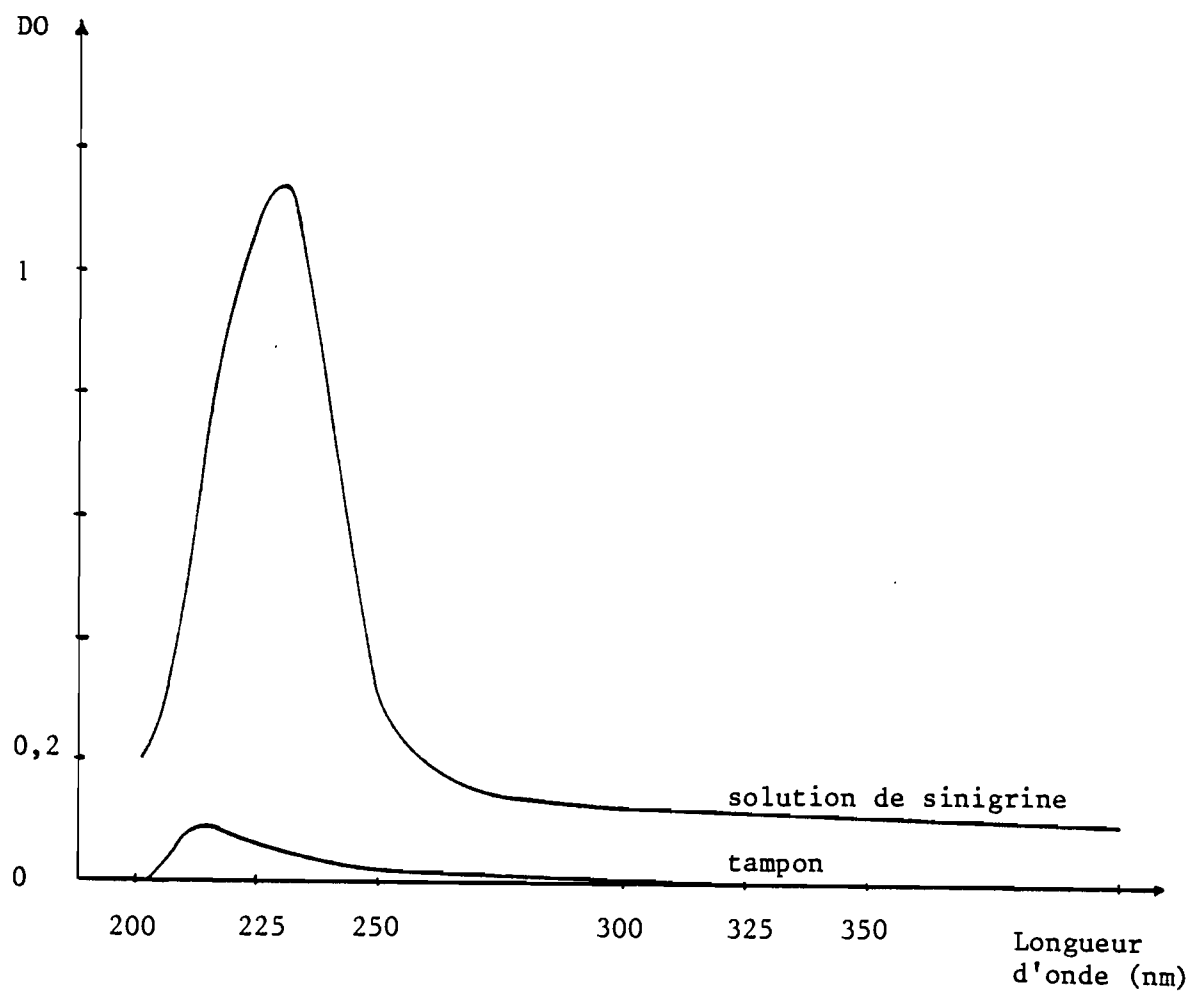


Figure 19 : Spectre des protéines brutes
(solution de protéines de moutarde avec SO₂
"analyse dès réception" à 121,1mg/l dans
tampon citrate - acide citrique pH 5,38)

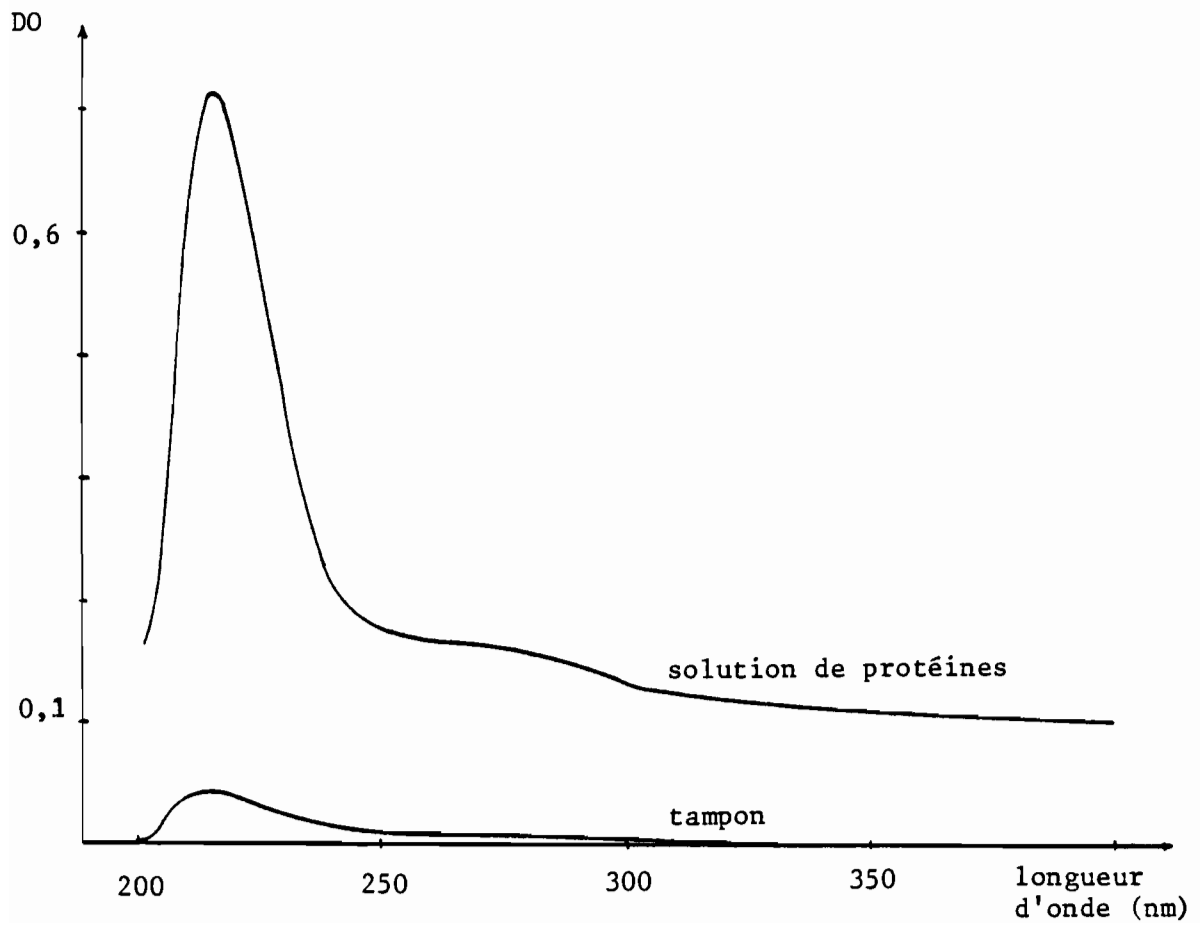
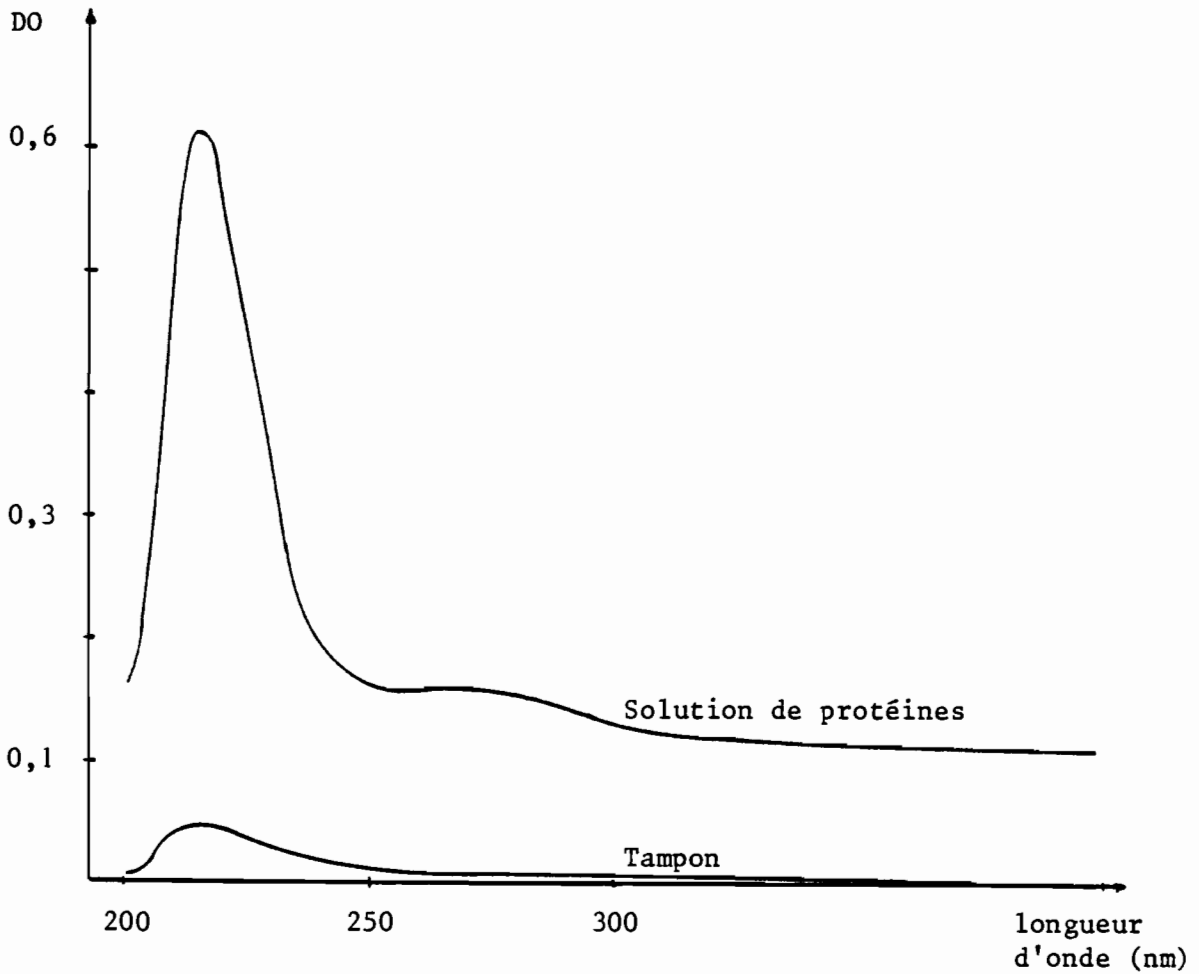


Figure 20 : Spectre des protéines brutes
(solution de protéines de moutarde sans SO₂
"analyse dès réception" à 122,28mg/l dans²
tampon citrate - acide citrique pH 5,38)



Les résultats sont consignés dans le tableau suivant :

Tableau 21 : Activités spécifiques de diverses myrosinases.

	Myrosinase de graines de <i>Brassica juncea</i>	Myrosinase de graines de <i>Sinapis alba</i>	Myrosinase de pâte de moutarde conservée 4 mois
Activité spécifique en μ moles de sinigrine par mm et par mg d'enzyme ($\pm 10^{-4}$)	0,010 0,014	0,391 0,398	inférieure à 10^{-4} inférieure à 10^{-4}
Activité spécifique en μ g de sinigrine par mm et par mg d'enzyme ($\pm 0,05$)	3,97 5,46	155,4 158,3	inférieure à 0,05 inférieure à 0,05

Ces résultats sont supérieurs à ceux trouvés par la méthode spectrophotométrique. Les teneurs en myrosinases utilisées, plus importantes dans la deuxième méthode expliquent ce phénomène.

La dégradation de la myrosinase des pâtes de moutarde au cours de la conservation se confirme.

CONCLUSION

La graine de *Brassica juncea* contient 80 % d'amandes et 20 % de pellicules dont les teneurs azotées sont respectivement 4,43 % et 2,37 % de la matière sèche.

Les protéines solubles dans une solution de chlorure de sodium (0,5M) représentant plus de 75 % des protéines totales ont été partiellement identifiées par BOUQUET (1971). Elles sont formées d'un tiers de globulines et de deux tiers d'albumines.

Le fractionnement dans un gel à 10 % de polyacrylamide donne dix fractions dont l'identification n'a pas été effectuée. Les 3 fractions ayant migré, le plus rapidement correspondent, sans doute, à des produits d'hydrolyse partielle. Ces dernières fractions sont peu abondantes dans les protéines des matières premières biologiques. La comparaison des électrophorégrammes des protéines des parties anatomiques de la graine indique que les amandes sont plus riches en fractions 2 et 5 et plus pauvres en fractions 3 et 7.

La fabrication de la moutarde entraîne une hydrolyse partielle plus ou moins importante des protéines. Ceci se traduit par l'augmentation des 3 fractions les plus mobiles. Elle entraîne, également, une désamination des protéines et probablement une diminution de la solubilité de certaines fractions.

L'électrophorèse des protéines des pâtes de moutarde montre que l'hydrolyse des protéines augmente avec la température et le temps de conservation.

L'effet de SO₂ n'est pas significatif à 4°C ; par contre à température ambiante et à la lumière, SO₂ semble accroître la stabilité des quatre fractions les moins mobiles.

Le dosage des acides aminés totaux montre que :

- les amandes contiennent davantage d'azote non protéique.
- les acides aminés les plus représentés dans les parties ana-

tomiques de la graine sont l'acide glutamique, la proline et la glycine.

- les amandes sont plus riches en acide glutamique, en leucine, alors que la valine, la lysine et l'hydroxyproline sont plus abondantes dans les pellicules.

- l'hydroxyproline peut être considérée comme un "marqueur" des pellicules.

Une méthode de dosage de routine de cet acide aminé a été proposée.

De plus, nous avons remarqué que l'hydroxyproline est concentrée surtout dans les téguments. Il découle, de ces observations, que la présence d'activité peroxydasique est hautement probable dans les pellicules de *Brassica juncea*. L'élimination des pellicules avant le broyage peut donc limiter les phénomènes d'oxydation enzymatique, mais elle peut, également, simplifier le procédé de fabrication en supprimant le tamisage.

Ainsi, nous avons vérifié par le calcul que la dépelliculation peut permettre l'obtention d'une moutarde répondant aux recommandations réglementaires. Néanmoins, des études, complémentaires sont nécessaires pour s'assurer que la dépelliculation n'élimine pas des facteurs indispensables aux qualités organoleptiques de la pâte.

Les acides aminés libres sont un indicateur de l'hydrolyse des protéines. Ils peuvent intervenir dans des processus qui dégradent les propriétés organoleptiques de la pâte (ainsi, la lysine peut participer au brunissement non enzymatique qui aboutit à l'apparition de pigments bruns).

L'analyse des acides aminés libres au cours de la fabrication de la moutarde montre que :

- les acides aminés libres représentent un faible pourcentage des acides totaux (1 %)

- une hydrolyse partielle mais rapide des protéines au contact du verjus. Les acides aminés, à chaîne latérale hydrophile sont les plus représentés (acide glutamique, asparagine, cystéine, etc...).

L'analyse de l'évolution de la lysine libre, au cours de la conservation, montre que cet acide aminé participe effectivement dans les phénomènes de brunissement non enzymatique. Ce brunissement semble faible à 4°C et s'accroît avec la température et le temps de conservation.

L'action de SO₂ est peu importante à 4°C alors qu'elle est considérable à température ambiante ; comme on pouvait s'y attendre.

La myrosinase a fait l'objet d'investigations. L'électrophorèse d'une solution purifiée de myrosinase et des protéines de graines solubles dans la solution saline, rend hautement probable la présence de l'enzyme dans la fraction 2. Cependant, cette présence n'a pas pu être confirmée par les méthodes de détection de l'activité de l'enzyme.

L'analyse quantitative de l'activité de la myrosinase montre que celle-ci baisse rapidement, dans les premiers jours après la fabrication de la moutarde. Cette baisse semble plus importante dans les moutardes contenant SO₂. L'anhydride sulfureux aurait une action sur la myrosinase. SO₂ réagit, à pH acide, sur les ponts disulfures ou sur les groupements sulfhydryles (DUPUY, 1959). Il peut, donc réagir sur le site actif de la myrosinase qui possède 4 groupements sulfhydryles. L'action de SO₂ sur une solution purifiée de myrosinase pourrait faire l'objet de travaux futurs.

On observe que la myrosinase de *Sinapis alba* est 40 fois plus active que celle de *Brassica juncea*. La graine de *Sinapis alba* ne contenant pas de désulfurase des sénévols, l'introduction de la myrosinase de *Sinapis alba* dans la fabrication de la moutarde paraît intéressante pour l'industrie, mais ceci nécessiterait une modification de la réglementation en vigueur pour la moutarde de Dijon.

De même, l'utilisation de myrosinases de microorganismes est envisageable après des travaux préliminaires de sélection.

L'addition de myrosinases exogènes purifiées permettrait de supprimer SO₂ dans la fabrication de la moutarde. Il serait, en effet possible d'éviter le brunissement enzymatique, en dénaturant au préalable les enzymes des graines de *Brassica juncea* par un traitement thermique.

BIBLIOGRAPHIE

ANDRE E. et DUROU-CARBOUERES M. (1957)

Sur la présence dans les graines de moutarde noire, de colza et de navette d'un enzyme qui possède une action destructrice sur les sénévols.

C.R. Acad. Sci. Paris 244, 3080-3082.

BARKER H.M. (1936)

The blood cyanate in the treatment of hypertension.

J. Am. Med. Assoc. 106, 762-767.

BENGTSONN L. (1970)

Recherche sur la teneur en pellicules des crucifères.

Sveriges Utsädesförenings Tidskrift 80, 186-192.

BENSON J.V. Jr., GORDON M.J and PATTERSON J.A. (1967)

Accelerated chromatographic analysis of amino acids in physiological fluids containing glutamine and asparagine.

Anal. Biochem. 18, 228-240.

BERGMAN I. and LOXLEY R. (1963)

Two improved and simplified methods of the spectrophometric determination of hydroxyproline.

Analytical Chemistry 35, 1961-1965.

BJÖRKMAN R. (1976)

Properties and function of plant myrosinases.

In the biology and chemistry of cruciferae, 191-205

Ed. by J.G. VAUGHAN, A.J. MAC LEOD, B.M.G. JONES

Acad. Press London.

BJÖRKMAN R. and JANSON J.C. (1972)

Purification and characterization of a myrosinase from white mustard seed (*Sinapis Alba*).

Biochim. Biophys. Acta 276, 508-518.

BJÖRKMAN R. and LÖNNERDAL B. (1973)

Enzymatic properties of myrosinases from *Sinapis alba* and *Brassica napus* seeds.

Biochim. Biophys. Acta 327, 121-131.

BONALY R. (1983)

Les glucides de *Brassica juncea*.

Communication réunion du GERAUD.

BOUQUET C. (1971)

Etude des fractions azotées d'un broyat de graines de moutarde brune *Brassica juncea*.

Thèse DIJON

BUSSY A. (1840)

Sur la formation de l'huile essentielle de moutarde.

J. Pharmac. Chim. 26, 39-48.

CLELAND R. (1971)

Cell wall extension.

Annu. Rev. Plant Physiol. 22, 197-222.

COUTON Y. (1977)

Les lipides de la moutarde.

Rapport de stage I.N.R.A. Dijon (non publié).

DARIMONT E., SCHWACHHOFER K. et GASPAR TH. (1973)

Isoperoxydase et hydroxyproline dans les parois cellulaires des racines de lentilles.

Biochim. Biophys. Acta 321, 461-466.

DELRUE V. (1981)

Analyse en chromatographie phase gazeuse des acides gras des lipides de la graine et de la pâte de moutarde.

Mémoire E.N.S.B.A.N.A. Dijon.

DIAHAM B. (1981)

Effets du méthylmercure sur les interactions histone-histone du nucléosome.

Mémoire E.N.S.B.A.N.A. Dijon.

DUPUY P. (1959)

Inhibition par l'acide sulfureux de l'oxydation de l'éthanol par *Acetobacter ranceus*.

Thèse de Docteur Ingénieur Paris.

ETTLINGER M.G. and LUNDEEN A.J. (1956)

The structures of sinigrin and sinalbin ; an enzymatic rearrangement.

J. Amer. Chem. Soc. 78, 4172-4173.

ETTLINGER M.G., DATEO G.P., HARRISON B.W., MABRY T.J. and THOMPSON C.P. (1961)

Vitamin C as coenzyme : The hydrolysis of mustard oil glucosides. Proc. Natl. Acad. Sci. 47, 1875-1880.

EULER H.V. und ERIKSON S.E. (1926)

Zur Kenntnis der enzymatischen Spaltung des Sinigrins.

Fermentforsch. 8, 518-523.

FLORKIN M. and STOTZ E.H. (1965)

Nomenclature of enzymes and coenzymes.

Comprehensive Biochemistry Vol. 13, 2nd Ed.

Ed. FLORKIN M. and STOTZ E.H.

Amsterdam, London, New York : Elsevier Publishing compagny.

GAINES R.D. and GOERING K.J. (1960)

New evidence for a two enzyme system in myrosinase.

Biochem. Biophys. Res. Comm. 2, 207-212.

GAINES R.D. and GOERING K.J. (1962)

The specificity of the myrosinase system.

Arch. Biochem. Biophys. 96, 13-19.

- GMELIN R. and VIRTANEN A.I. (1959)
A new type of enzymatic cleavage of mustard oil glucosides :
Formation of allyl thiocyanate in *Thlaspi arvense* L. and benzyl
thiocyanate in *Lepidium ruderale* L. and *Lepidium sativum* L.
Acta Chem. Scand. 13, 1474-1475
- GOODMAN I., FOUTS J.R., BRESNIK E., MENEGAS R. and HITCHINGS G.H. (1959)
A mammalian thioglucosidase.
Science 130, 450-451.
- GREER M.A. (1962)
Natural occurrence of goitrogenic agents.
Recent Progr. Hormone Res. 18, 187-219.
- GRUENWEDEL D.W. and DIAHAM B. (1982)
Methylmercury-induced histone perturbations in nuclei isolated
from calf thymus.
Molecular Pharmacology 22, 121-126.
- GUIGNARD L. (1890)
Recherches sur la localisation des principes actifs des cruci-
fères.
J. Botanique 4, 385-394.
- HENDERSON H.M. and MC EWEN T.J. (1972)
Effect of ascorbic acid on thioglucosidases from different
crucifers.
Phytochemistry 11, 3127-3133.
- IVERSEN T.H. and BAGGERUD C. (1980)
Myrosinase activity in differentiated and undifferentiated plants
of Brassicacea.
Z. Pflanzenphysiol. 97, 399-407.
- IVERSEN T.H., BAGGERUD C. and BEISVAAG (1979)
Myrosin cells in Brassicacea roots.
Z. Pflanzenphysiol. 94, 143-154.

KJAER A. (1960)

Naturally derived isothiocyanates and their parent glucosides.
Fortschr. Chem. Org. NatStoffe 18, 122-176.

LAMPORT D.T.A. (1970)

Cell wall metabolism.
Annu. Rev. Plant Physiol. 21, 235-270.

LANGER P. (1964)

Relations between thiocyanate formation and goitrogenic effect
of food : VI Thiocyanate activity of allyl isothiocyanate, one
of the most frequently occurring mustard oils in plants.
Physiol. Chem. 339, 33-35.

LANGER P. and STOLC V. (1965)

Goitrogenic activity of allyl isothiocyanate. A widespread na-
tural mustard oil.
Endocrinology 76, 151-159.

LÖNNERDAL B. and JANSON J.C. (1973)

Purification and characterization of a myrosinase from rapeseed
(*Brassica napus*).
Biochim. Biophys. Acta 315, 421-429.

LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. and RANDALL R.J. (1951)

Protein measurement with the Folin reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265-275.

MAC GIBBON D.B. and ALLISON R.M. (1970)

A method for the separation and detection of glucosinolases
(myrosinases).
Phytochemistry 9, 541-544.

MAC KENZIE S.L. and BLAKELY J.A. (1972)

Purification and characterization of seed globulins from *Brassica
juncea*, *Brassica nigra* and *Brassica hirta*.
Can. J. Bot. 50, 1825-1834.

MATILE P. (1980)

The "mustard oil bomb" compartmentalization of myrosinase systems.
Biochem. Physiol. Pflanz. 175, 722-731.

MOORE S. and STEIN W.H. (1951)

Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins.
J. Biol. Chem. 192, 663-681.

MOORE S. and STEIN W.H. (1954)

A modified ninhydrin reagent for photometric determination of
amino acids and related compounds.
J. Biol. Chem. 211, 907-913.

NAGASHIMA Z. (1959)

Examinations on the inhibition of myrosinase.
Nippon Nogei Kagaku Kaishi 33, 881.

NAGASHIMA Z. and UCHIYAMA M. (1959a)

Possibility that myrosinase is a single enzyme and mechanism
of decomposition of mustard oil glucoside by myrosinase.
Bull. Agr. Chem. Soc. Japan 23, 555-556.

NAGASHIMA Z. and UCHIYAMA M. (1959b)

Mechanism of decomposition of mustard oil glucoside by myrosinase.
Bull. Agr. Chem. Soc. Japan 24, A11-A12.

OGINSKY E.L., STEIN A.E. and GREER M.A. (1965)

Myrosinase activity in bacteria demonstrated by the conversion
of progoitrin to goitrin.
Proc. Soc. Expt. Med. 119, 360-364.

OHTSURU M. and HATA T. (1972)

Molecular properties of multiple forms of plant myrosinase.
Agr. Biol. Chem. 36, 2495-2503.

OHTSURU M. and HATA T. (1973a)

Studies on the functional groups of plant myrosinase.
Agr. Biol. Chem. 37, 269-275.

OHTSURU M. and HATA T. (1973b)

Studies on the activation mechanism of the myrosinase by
L-ascorbic acid .

Agr. Biol. Chem. 37, 1971-1972.

OHTSURU M. and HATA T. (1973c)

General characteristics of the intracellular myrosinase from
Aspergillus niger.

Agr. Biol. Chem. 37, 2543-2548.

OHTSURU M. and HATA T. (1975)

Measurement of binding of ascorbic acid to myrosinase by rate
of dialysis.

Agr. Biol. Chem. 39, 1505-1506.

OHTSURU M. and HATA T. (1979)

The interaction of L-ascorbic acid with the active center of
myrosinase.

Biochim. Biophys. Acta 567, 384-391.

OHTSURU M., TSURUO I. and HATA T. (1969a)

Studies on fungous myrosinase : production, purification and
some characteristics.

Agr. Biol. Chem. 33, 1309-1314.

OHTSURU M., TSURUO I. and HATA T. (1969b)

Studies on fungous myrosinase : effects of various reagents on
its enzymatic activities.

Agr. Biol. Chem. 33, 1315-1319.

OHTSURU M., TSURUO I. and HATA T. (1973)

Production and stability of intracellular myrosinase from
Aspergillus niger.

Agr. Biol. Chem. 37, 967-971.

PECHE K. (1913)

Mikrochemischer Nachweis des Myrosins.

Ber. dtsh. bot. Ges. 31, 458-462.

- PHELAN J.R. and VAUGHAN J.G. (1980)
Myrosinase in *Sinapis alba* L.
J. Exp. Bot. 31, 1425-1433.
- PIHAKASKI K. and PIHAKASKI S. (1978)
Myrosinase in Brassicacea (Cruciferae).
J. Exp. Bot. 29, 335-345.
- RANDERATH K. (1971)
Chromatographie sur couches minces, 110 - 131.
Ed. Gauthier-Villars Paris.
- REESE E.T., CLAPP R.C. and MANDELS M. (1958)
A thioglucosidase in fungi.
Arch. Biochem. Biophys. 75, 228-242.
- ROTSTEIN S. (1982)
Contribution à l'étude des constituants phénoliques et des activités oxydasiques dans la graine et la pâte de moutarde (*Brassica juncea*).
D.E.A. Nancy I.
- SANDBERG M. and HOLLY O.M. (1932)
Note on myrosin
J. Biol. Chem. 96, 443-447
- SCHACTERLE G.R. and POLLACK R.L. (1973)
A simplified method for quantitative assay of small amounts of protein in biological material.
Anal. Biochem. 51, 654-655.
- SCHWEIDLER J.H. (1905)
Die systematische Bedeutung der Eiweiss-oder Myrosinzellen der Cruciferen nebst Beiträgen zu ihrer anatomisch-physiologischen Kenntnis.
Ber. dtsch. bot. Ges. 23, 274-285.

SCHWIMMER S. (1960)

Myrosin-catalyzed formation of turbidity and hydrogen sulfide from sinigrin.

Acta Chem. Scand. 14, 1439-1452.

SCHWIMMER S. (1961)

Spectral changes during the action of myrosinase.

Acta Chem. Scand. 15, 535-544.

SEARLE L. M., CHAMBERLAIN K., RAUSCH T. and BUTCHER D. N. (1982)

The conversion of 3-indolylmethylglucosinolate to 3-indolylacetonitrile by myrosinase, and its relevance to the clubroot disease of Cruciferae.

J. Exp. Bot. 33, 935-942.

TANI N., OHTSURU M. and HATA T. (1974a)

Bacterial myrosinase : isolation of myrosinase producing micro-organism.

Agr. Biol. Chem. 38, 1617-1622.

TANI N., OHTSURU M. and HATA (1974b)

Bacterial myrosinase : purification and general characteristics of bacterial myrosinase produced by *Enterobacter cloacae*.

Agr. Biol. Chem. 38, 1623-1630.

TSURUO I. and HATA T. (1967)

Studies on the myrosinase in mustard seed : on the activation mode of the myrosinase by L-ascorbic acid.

Agr. Biol. Chem. 31, 27-32.

TSURUO I. and HATA T. (1968a)

Studies on the myrosinase in mustard seed : on the effects of neutral salts.

Agr. Biol. Chem. 32, 479-483.

TSURUO I. and HATA T. (1968b)

Studies on the myrosinase in mustard seed : sugars and glucosides as competitive inhibitors.

Agr. Biol. Chem. 32, 1420-1424.

TSURUO I. and HATA T. (1968c)

Studies on the myrosinase in mustard seed : on the β -glucosidase activity of myrosinase and the interaction of ascorbate with myrosinase.

Agr. Biol. Chem. 32, 1425-1431.

TSURUO I., YOSHIDA M. and HATA T. (1967)

Studies on the myrosinase in mustard seed : the chromatographic behaviors of the myrosinase and some of its characteristics.

Agr. Biol. Chem. 31, 18-26.

VAN ETTEN C.H., DAXENBICHLER M.E., PETERS J.E. and TOOKEY H.L. (1966)

Variation in enzymatic degradation products from mayor thioglucosides in *Crambe abyssinica* and *Brassica napus* seed meals.

J. Agr. Food Chem. 14, 426-430.

VAN ETTEN C.H., DAXENBICHLER M.E. and WOLFF I.A. (1969)

Natural glucosides in foods and feeds.

J. Agr. Food Chem. 17, (3), 483-491.

VANGHEESDAELE G. et BICHOT I. (1970)

Formation des isothiocyanates dans la graine de moutarde broyée, application analytique.

Industr. alim. agr. 2, 125-131.

VANGHEESDAELE G. et FOURNIER N. (1977)

La dégradation des thioglucosides par les sels de cuivre.

Ann. Technol. Agric. 26, 499-510.

VANGHEESDAELE G. et FOURNIER N. (1980)

Composition chimique de la *Brassica juncea* utilisée dans la fabrication de la moutarde de Dijon.

Revue Française des Corps Gras 27, (1), 15-22.

VAUGHAN J.G. and DENFORD K.E

An acrylamide gel electrophoretic study of the seed proteins of *Brassica* and *Sinapis* species, with special reference to their taxonomic value.

J. Exp. Bot. 19, 724-732.

VAUGHAN J.G., GORDON E. and ROBINSON D. (1968)

The identification of myrosinase after the electrophoresis of *Brassica* and *Sinapis* seed proteins.

Phytochemistry 7, 1345-1348.

VAUGHAN J.G. and WAITE A. (1967)

Comparative electrophoretic studies of seed proteins of certain amphidiploid species of *Brassica*.

J. Exp. Bot. 18, 269-276.

VIRTANEN A.I. (1965)

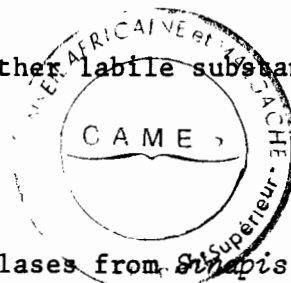
Organic sulfur compounds and other labile substances in plants.

Phytochemistry 4, 207-228.

VOSE J.R. (1972)

Fractionation of two glucosinolases from *Sinapis alba* seed by isoelectric focusing.

Phytochemistry 11, 1649-1653.



RESUME

Les protéines de *Brassica juncea*, extraites à l'aide d'une solution de chlorure de sodium (0,5 M) ont été fractionnées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 10 %.

L'étude des protéines de graines et de différentes pâtes de moutarde (avec et sans SO₂), a mis en évidence une hydrolyse partielle de ces protéines au cours de la fabrication et de la conservation de la moutarde.

Ces phénomènes d'hydrolyse s'accroissent avec la température et le temps de conservation de la pâte. A température ambiante et à la lumière, la présence de SO₂ semble accroître la stabilité des fractions les moins mobiles.

Le dosage des acides aminés totaux montre que 91 % de l'hydroxyproline de la graine provient des téguments.

Cet acide aminé peut donc être considéré comme un "marqueur" de sons de la moutarde. Un dosage de routine de l'hydroxyproline a été proposé.

L'analyse de l'évolution de la lysine libre au cours de la conservation de la pâte indique que cet acide aminé participe aux phénomènes de brunissement non enzymatiques.

La présence de SO₂ retarde, toutefois, le brunissement. L'efficacité de SO₂ dure entre 1 et 4 mois.

L'activité de la myrosinase a été étudiée. Il apparaît que :

- cette activité enzymatique baisse rapidement au cours de la conservation de la pâte.
- SO₂ diminue l'activité de la myrosinase de *Brassica juncea*
- la myrosinase de *Sinapis alba* est 30-40 fois plus active que celle de *Brassica juncea*.

MOTS CLES : *Brassica juncea* - graines de moutarde - pâte de moutarde - fabrication - conservation - dépelliculation - acides aminés - protéines - hydroxyproline - myrosinase - électrophorèse sur gel de polyacrylamide.