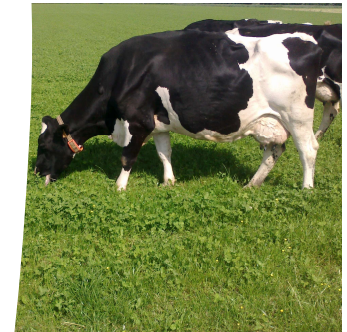


# Composition et structure d'isolats commerciaux de protéines de pois en comparaison aux protéines natives



Véronique Solé-Jamault  
Adeline Boire



## RECOMMANDATION (ANSES)

**0,83 g / kg / j** de protéines

chez les adultes en bonne santé ; soit **58 g/jour** pour 70 kg

~ **10-20 %** de l'apport énergétique total



*Rapport de l'ANSES de décembre 2016 :*

“

La consommation moyenne actuelle de légumineuses est **insuffisante et devrait être considérablement augmentée**. Elle devrait être pluri-hebdomadaire.

“

une nouvelle catégorisation est proposée [...]. Les légumineuses sont **dissociées du groupe des féculents** du fait de leur richesse en protéines et en fibres et constituent un nouveau groupe.



# Accroître la part des protéines végétales dans l'alimentation

## Quels leviers?

1

Faciliter l'utilisation des graines de légumineuses



### Questions de recherche :

- Optimiser de nouveaux critères de qualité des graines  
= Variétés x biologie structurale x procédés
- Exploiter la complémentarité de composition en AA avec les céréales (Exemple: Projet Pastaleg, Pr Micard, Montpellier)



# Accroître la part des protéines végétales dans l'alimentation

## Quels leviers?

2

Fractionner les matières premières :  
Ingrédients protéiques



### VOIE SECHE

Nettoyage  
Décortiquage

Broyage  
Tamisage

Farine

Turboséparation

Concentré

### Questions de recherche :

- Fonctionnalités souvent inférieures à l'œuf/lait/gélatine
- Goûts et textures souvent indésirables
- Un cracking, mais jusqu'où?

Delipidation  
Solubilisation  
Coagulation...

### VOIE HUMIDE

Concentré

Solubilisation  
Précipitation / UF

Isolat



# Questions de recherche

2

Fractionner les matières premières :  
Ingrédients protéiques



*VOIE SECHE*

Quelle solubilité ?

*VOIE HUMIDE*

Comment déterminer la  
solubilité?

Questions de recherche :

- Fonctionnalités souvent inférieures à l'œuf/lait/gélatine
- Goûts et textures souvent indésirables
- Un cracking, mais jusqu'où?

# Matériel

## Caractérisation



### Isolats commerciaux

2 voies humides

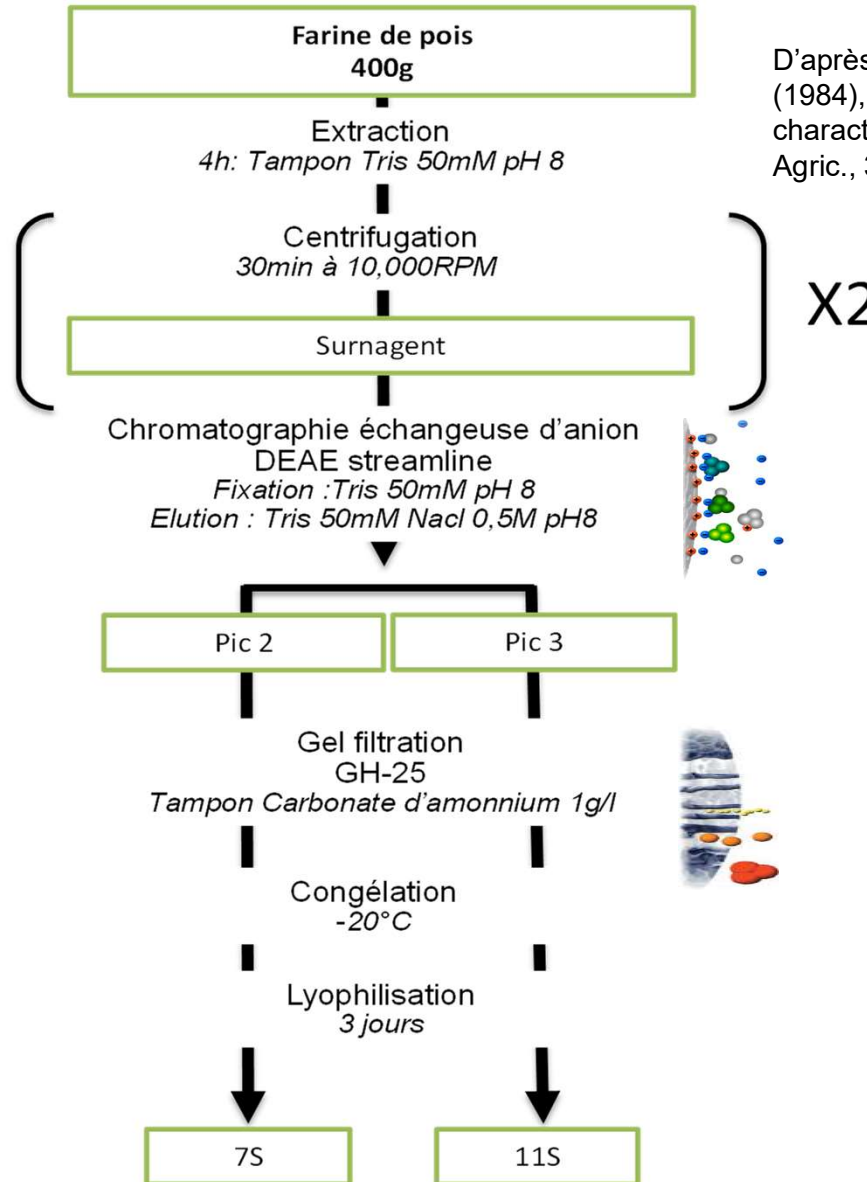
1 voie sèche

### Isolats laboratoire

Fraction 11S

Fraction 7S

# Purification des protéines natives



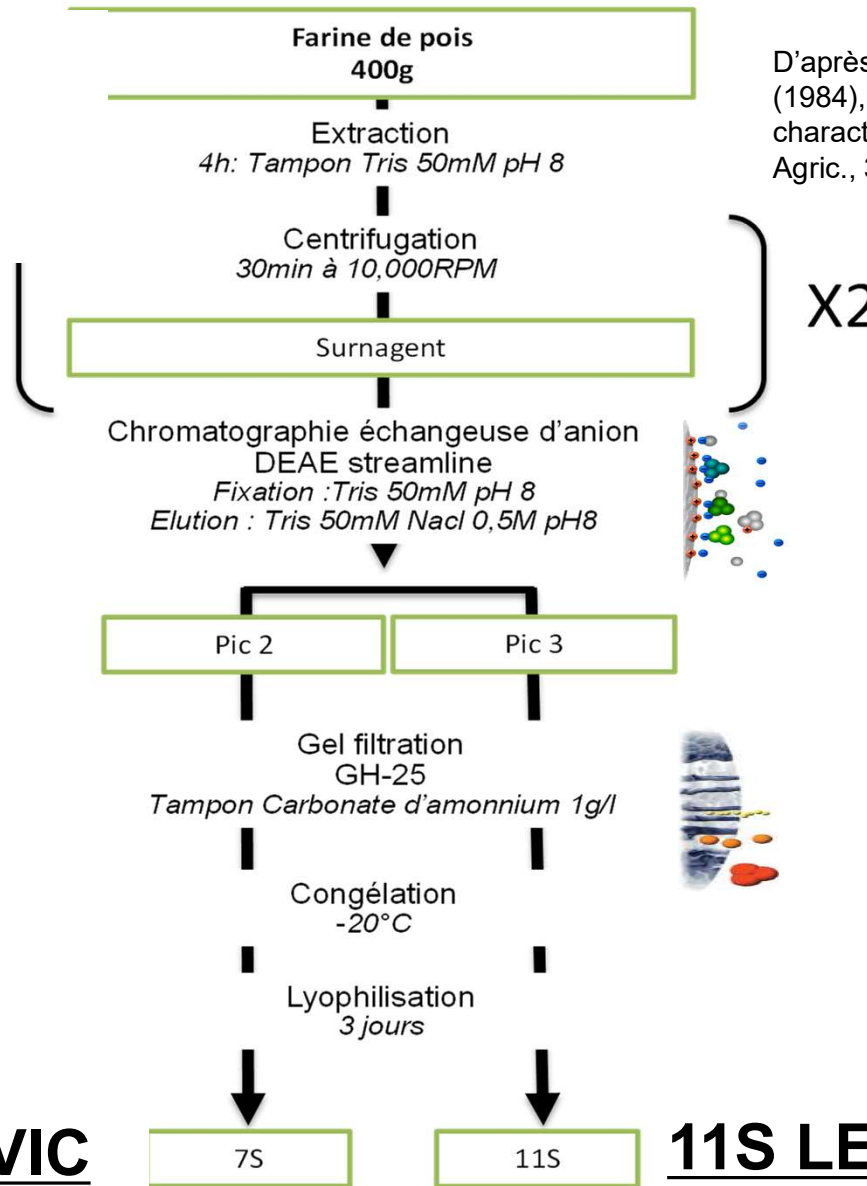
D'après Gueguen, J., Vu, A. T. and Schaeffer, F. (1984), Large-scale purification and characterisation of pea globulins. J. Sci. Food Agric., 35: 1024–1033





# Purification des protéines natives

**Cinq  
extractions**



D'après Gueguen, J., Vu, A. T. and Schaeffer, F. (1984), Large-scale purification and characterisation of pea globulins. J. Sci. Food Agric., 35: 1024–1033

**Au total**

25 g ⇐ **7S VIC**

7S

11S

**11S LEG** ⇒ 12 g





# Caractérisation des fractions

## Teneur en protéines :

*par la méthode Dumas Nx5,7 % MS*

-7S VIC = 94,5%

-11S LEG = 95,3 %

-Isolat 1 (voie humide VH1) = 70 %

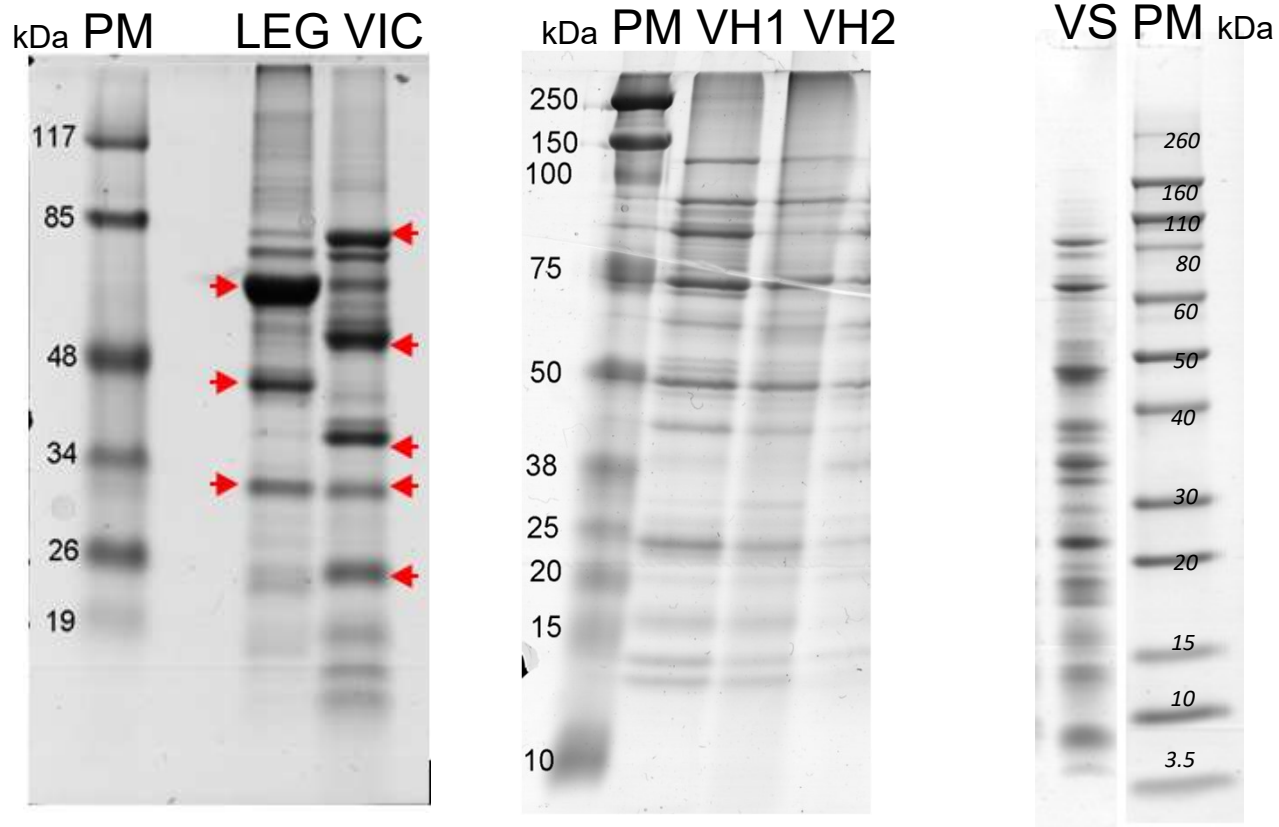
-Isolat 2 (voie humide VH2) = 69 %

-Isolat 3 (procédé voie sèche VS) = 49%



# Caractérisation des fractions

Composition en protéines :  
(SDS-PAGE)



**Comment déterminer la solubilité?**

**=**

**Comment quantifier de façon fiable  
la concentration en protéines ?**

**x**

**Comment déterminer la taille?**



# Comment quantifier de façon fiable la concentration en protéines ?

- Dosage d'azote
- Absorbance UV
- Dosage colorimétrique

Méthode	N x 5,7	A280	BCA
<b>Avantages</b>	Référence	Rapide	Quantitative
<b>Inconvénients</b>	Contaminants	Mélange Contaminants	Longue Nombreux composés pouvant interférer



# Comment déterminer la taille?

- Turbidité
- Diffusion de lumière
- Electrophorèse
- Exclusion stérique
- Microscopie

## Structure

Méthode	A600	DLS	SEC	SDS	Microscopie
<b>Avantages</b>	Rapide Quantitative	Rapide	Quantitatif Natif	Insoluble	Rapide
<b>Inconvénients</b>	-	Traitement des données difficile	Long Cisaillement	Dénaturant	Prise d'essai



# Quelle solubilité?

- Paramètres

- Concentration
- Solvant
- Température
- Cinétique
- Vitesse d'agitation
- Séparation soluble / insoluble



# Quelle solubilité?

- Paramètres
  - Concentration
  - Solvant
  - Température
  - Cinétique
  - Vitesse d'agitation
  - Séparation soluble / insoluble





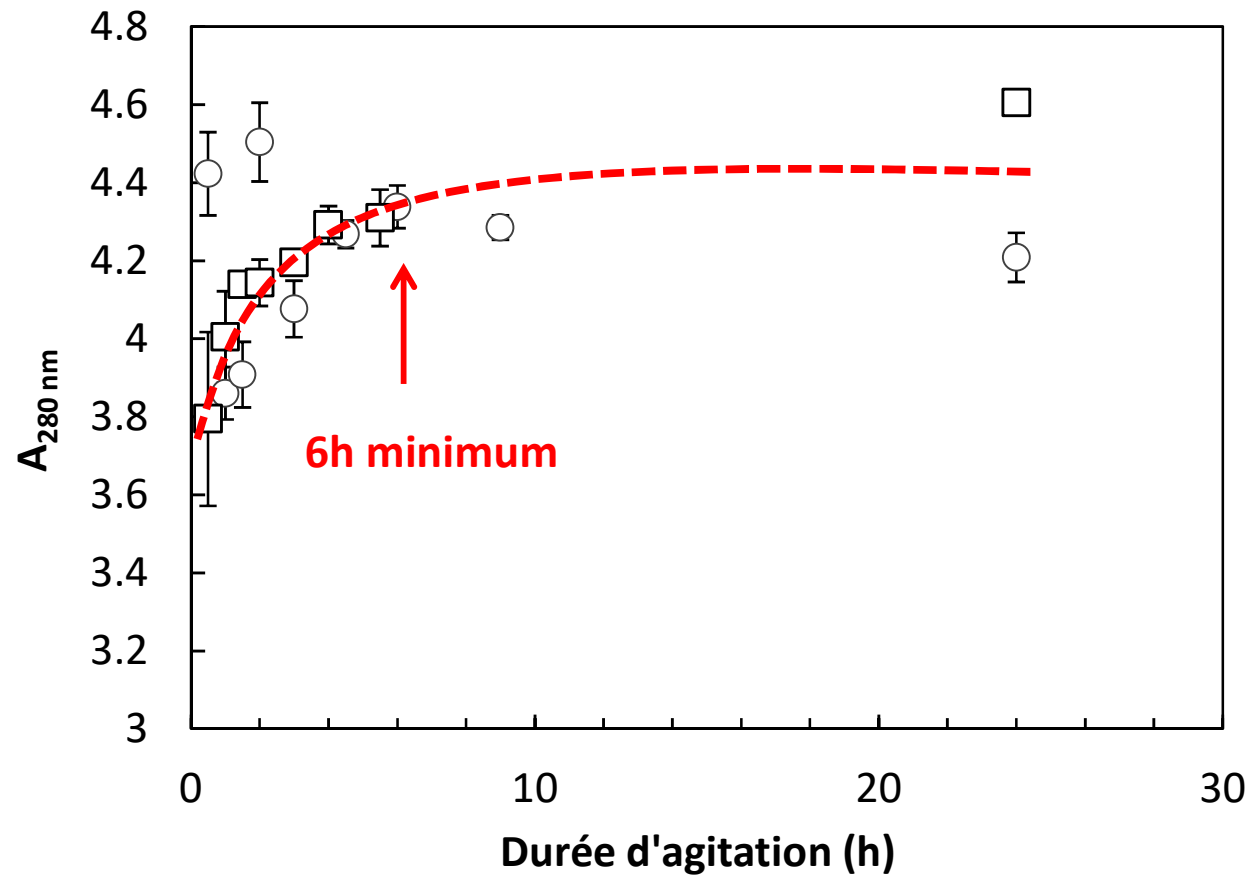
# Cinétique: Isolats voie humide

## Paramètres fixes :

T= 20° C ; pH = 8,5 ; FI = 500 mM  
Concentration en poudres : 1% m/v  
Centrifugation : 16 000 g x 45 min

## Paramètre variable :

Durée de solubilisation



# Fraction soluble / insoluble: isolats VH

## Paramètres fixes :

T = 20° C ; pH = 8,5 ; FI = 500 mM  
Concentration en poudres : 1% m/v  
Durée d'agitation : nuit (16h)

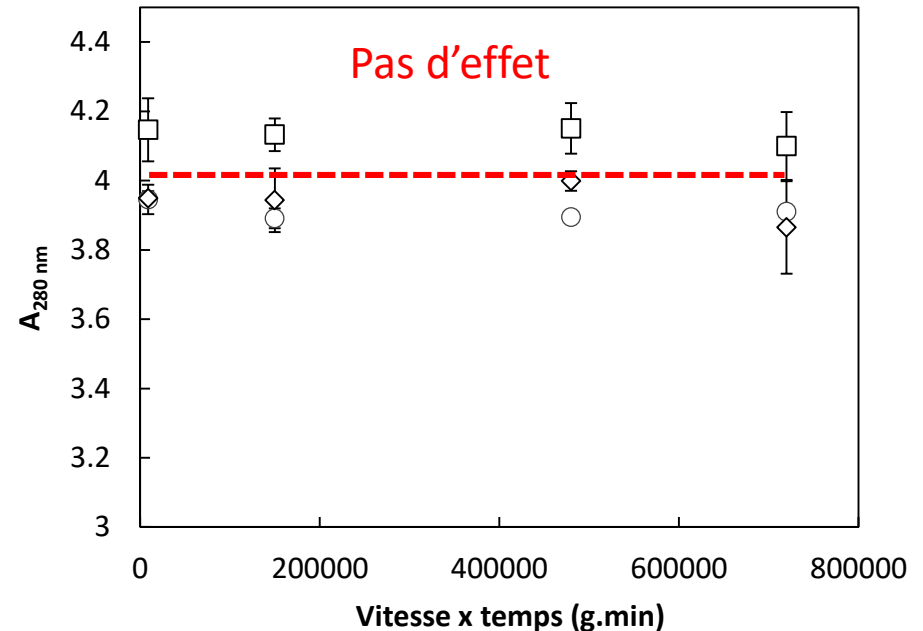
## Paramètres variables :

Durée & vitesse de centrifugation

### Isolat voie humide

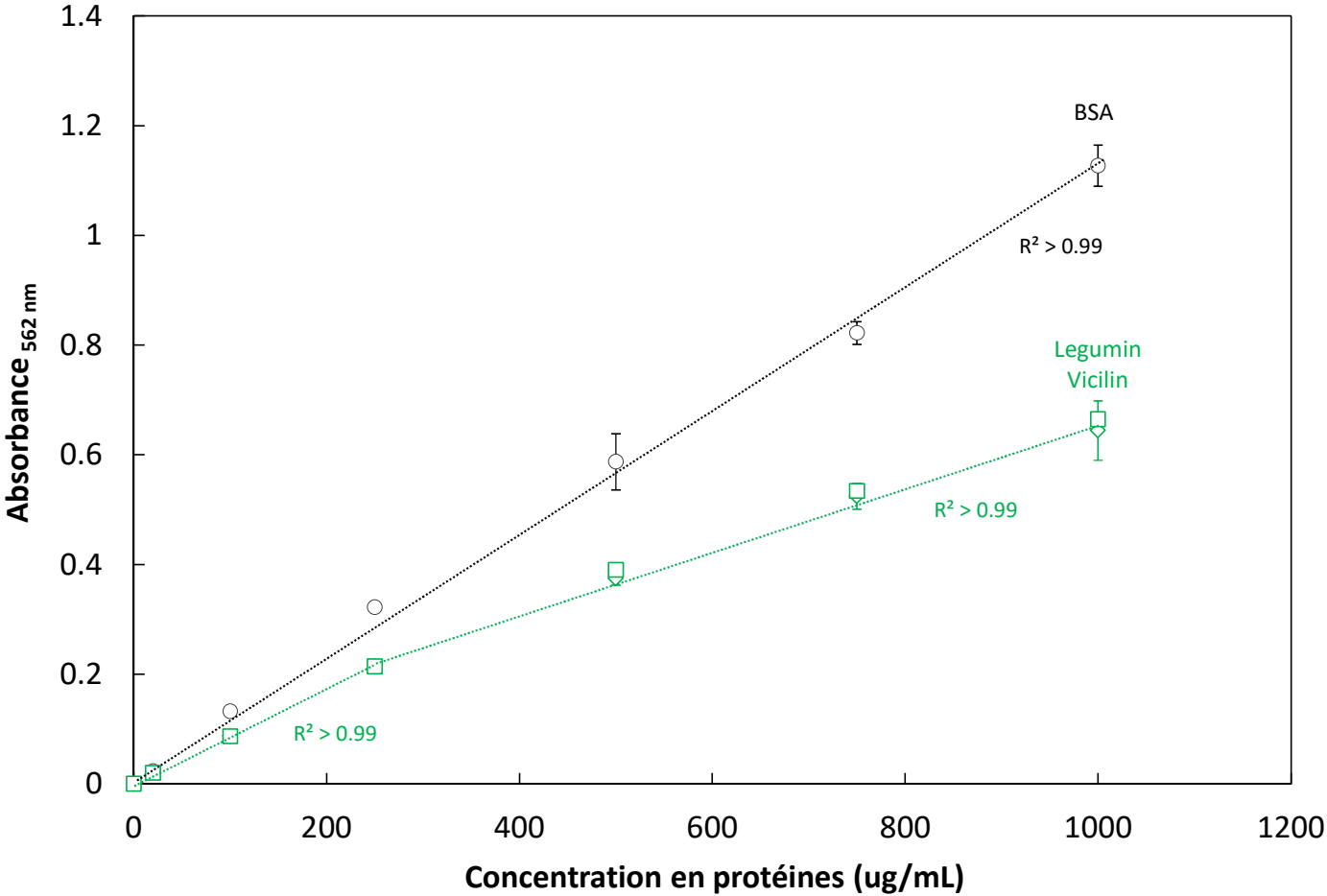
v.t (g.min)	A600	
	moyenne (U.A.)	Ecart-type
0	1,161	0,162
9000	0,039	0,031
150000	0,009	0,001
480000	0,008	0,004
720000	0,006	0,003

Effet majeur dès la première centrifugation



# Concentration

Dosage BCA → normalisé par dosage d'azote



# Concentration

## Paramètres fixes :

T° C = 20° C ; pH = 8,5 ; FI = 500 mM

Durée d'agitation : nuit (16h)

Durée & vitesse de centrifugation

## Paramètres variables :

Concentration en poudres : 1% m/v

	Moyenne	Ecart-type	CV* (%)
Légumine	81,4 %	3,6	4%
Viciline	84,2 %	1,9	2%

	Moyenne	Ecart-type	CV* (%)
Voie humide 1	14,8%	1,1	7%
Voie humide 2	17,2 %	1,0	6%

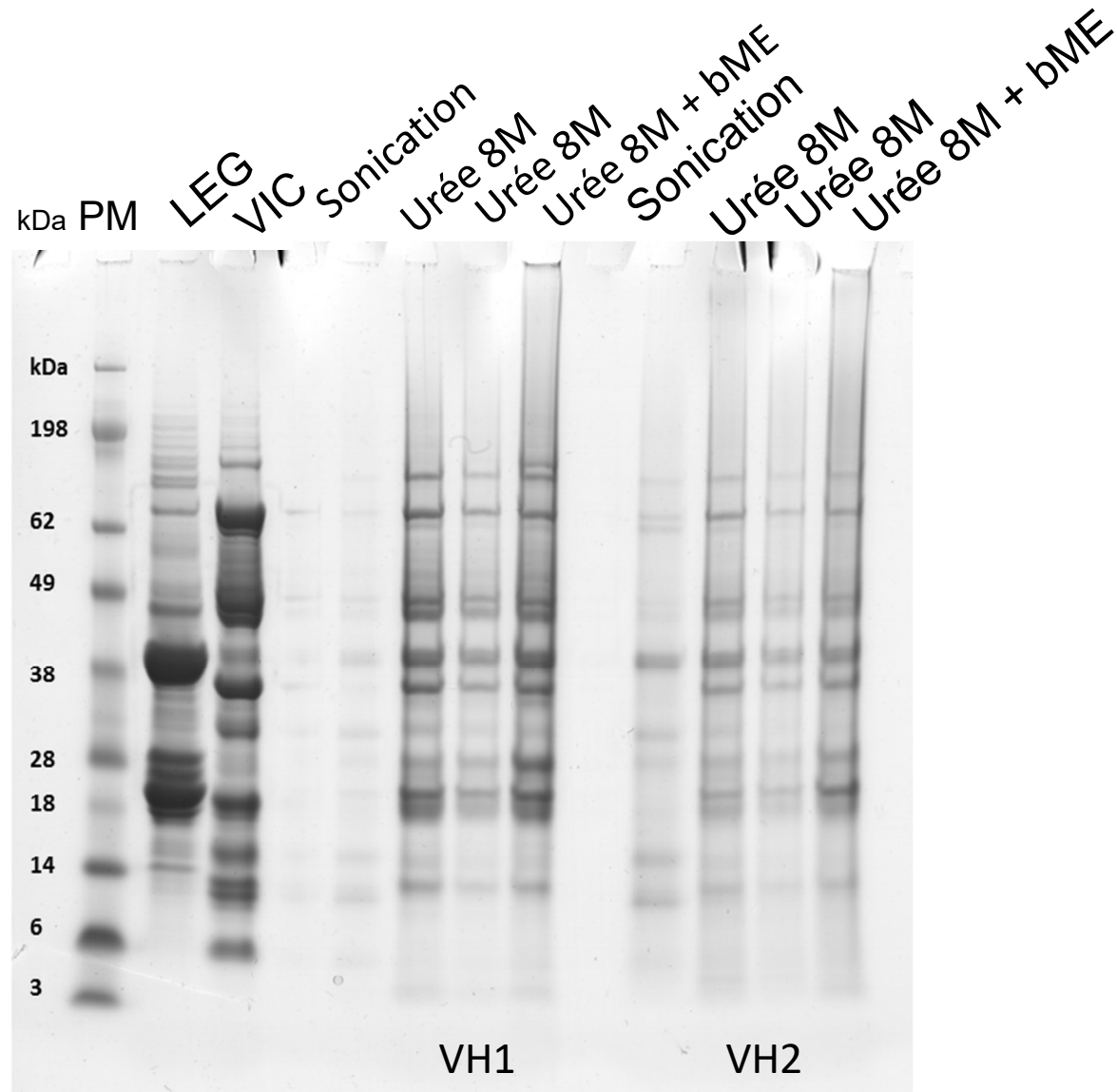
	Moyenne	Ecart-type	CV* (%)
Voie sèche	60 %	1,1	7%



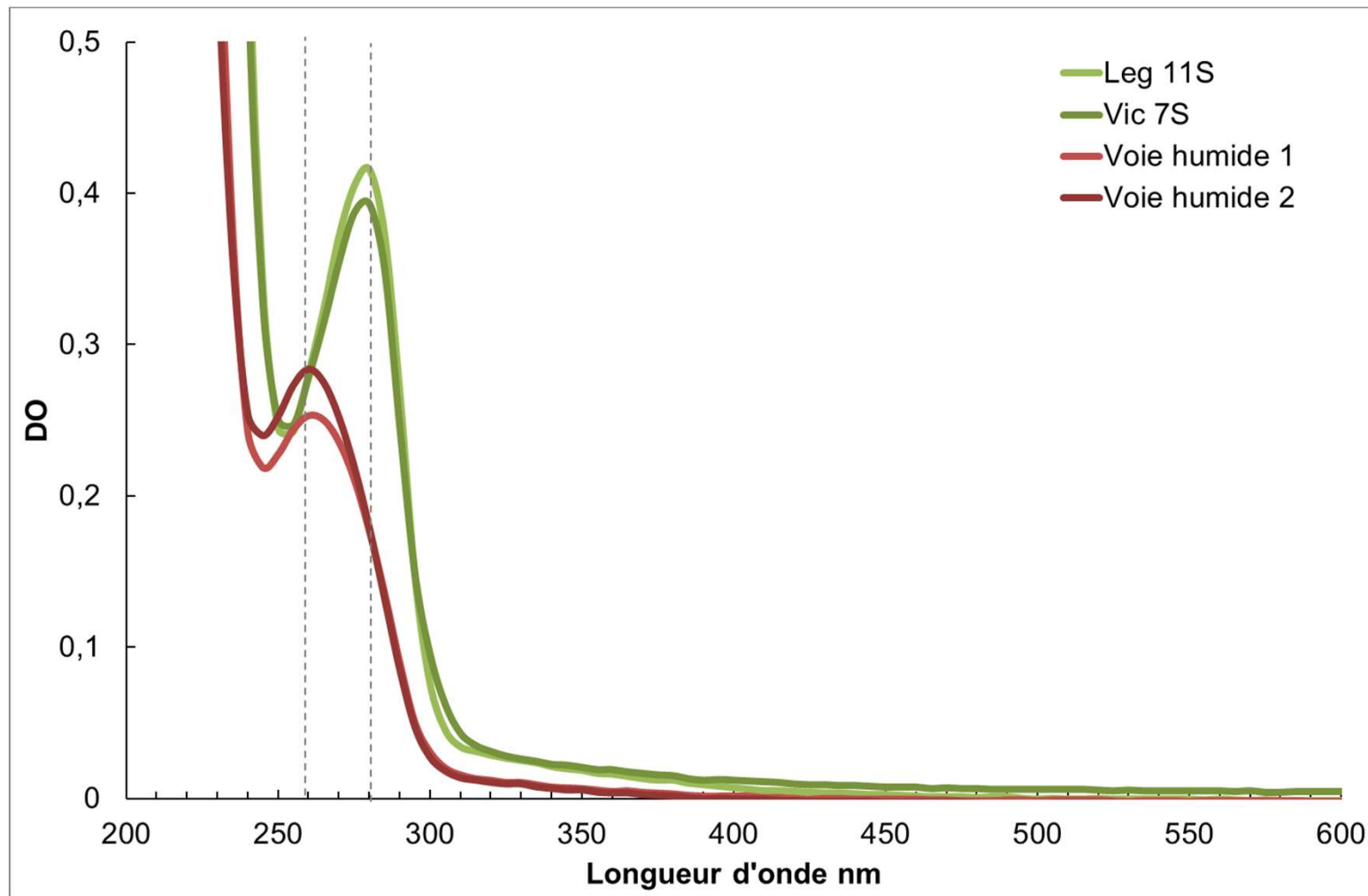
Faible solubilisation :  
partie fortement agrégée

Solubilité	1%	2,5%	5%
Voie humide 1	14,8 %	12,9	13,9
Voie humide 2	17,2 %	13,7	16,4 %

# Nature des protéines insolubles



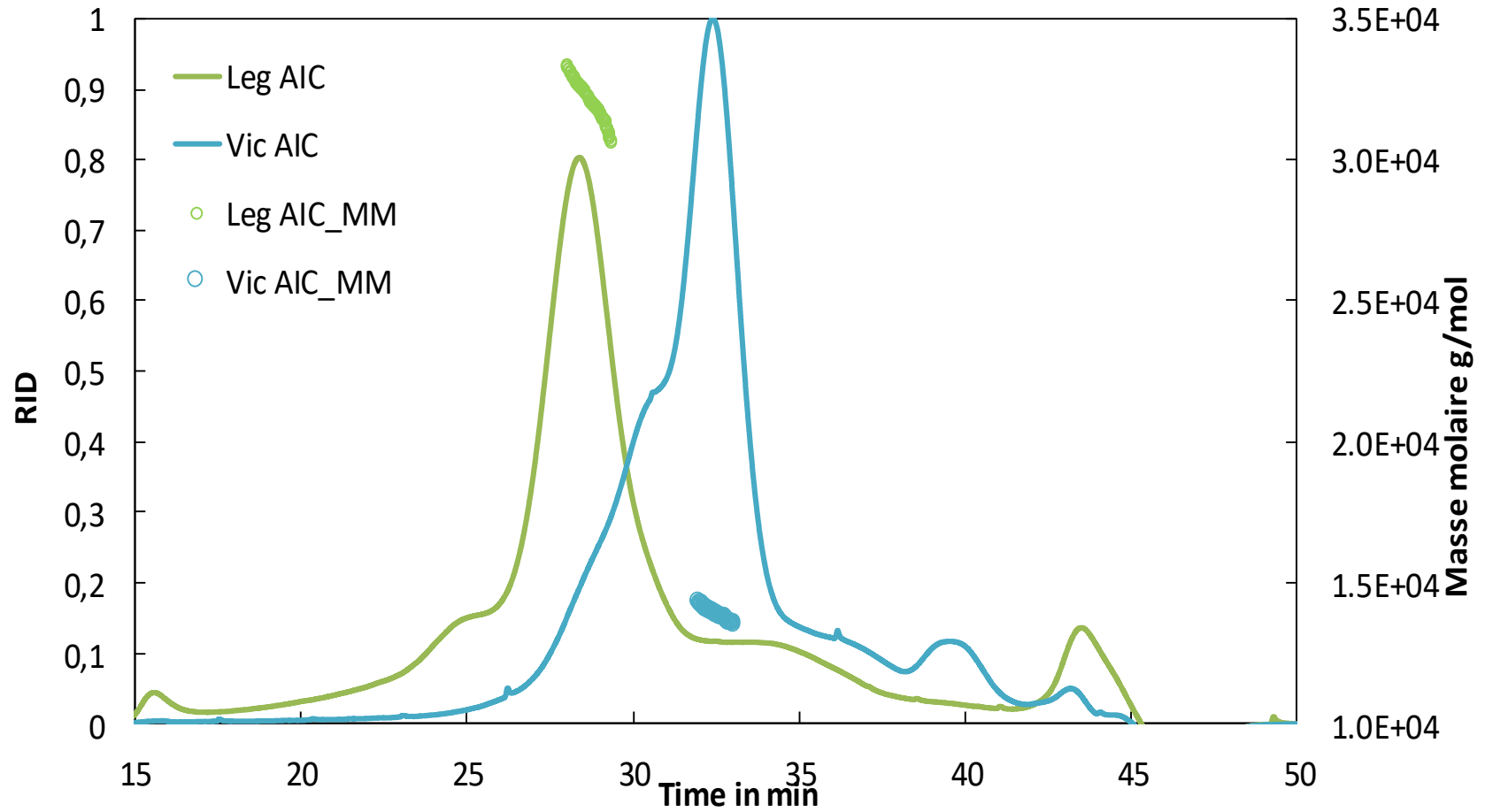
# Concentration Spectre UV



Longueur d'onde max 280 nm → 260nm

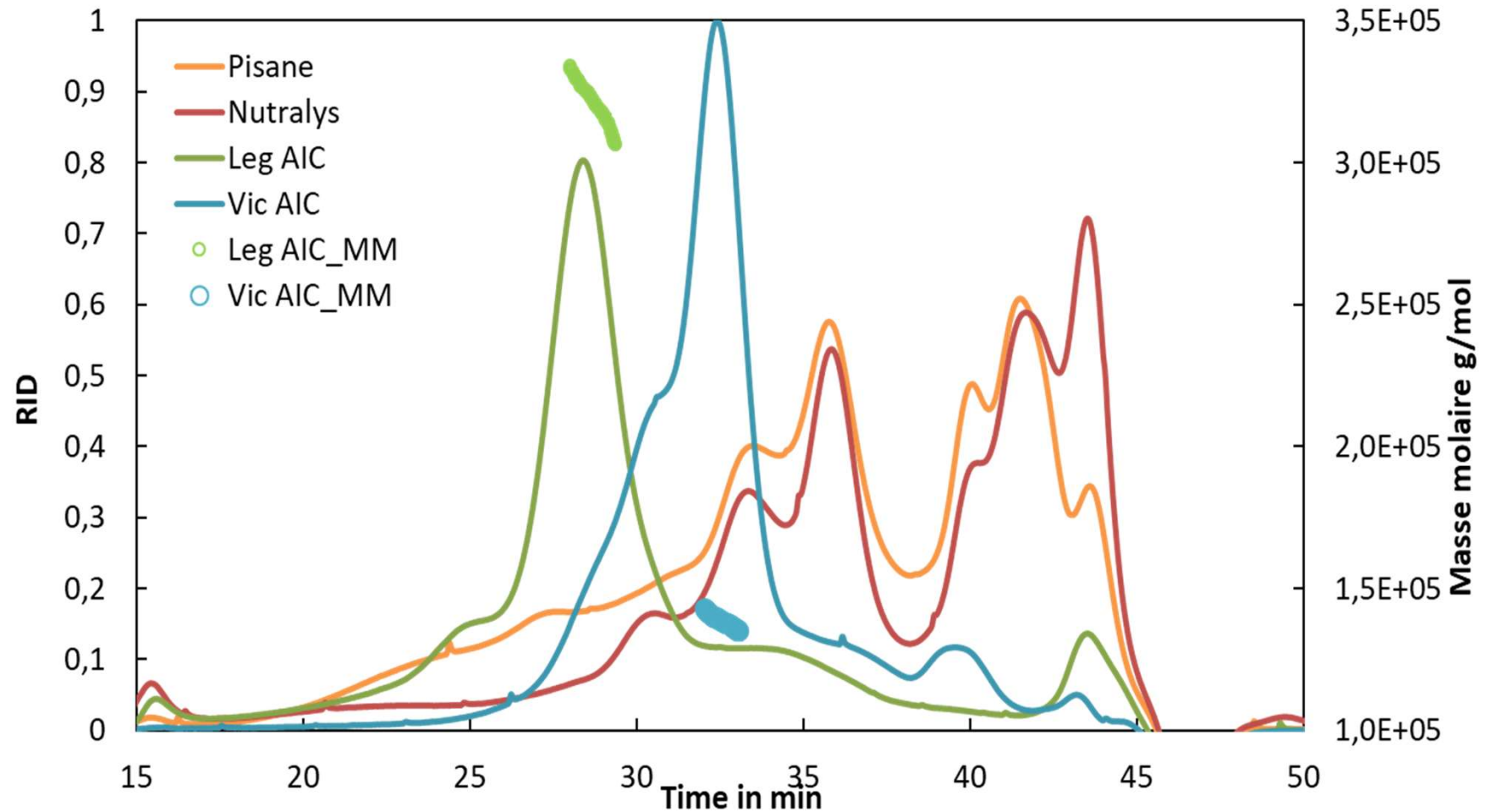


# Taille SEC-MALS



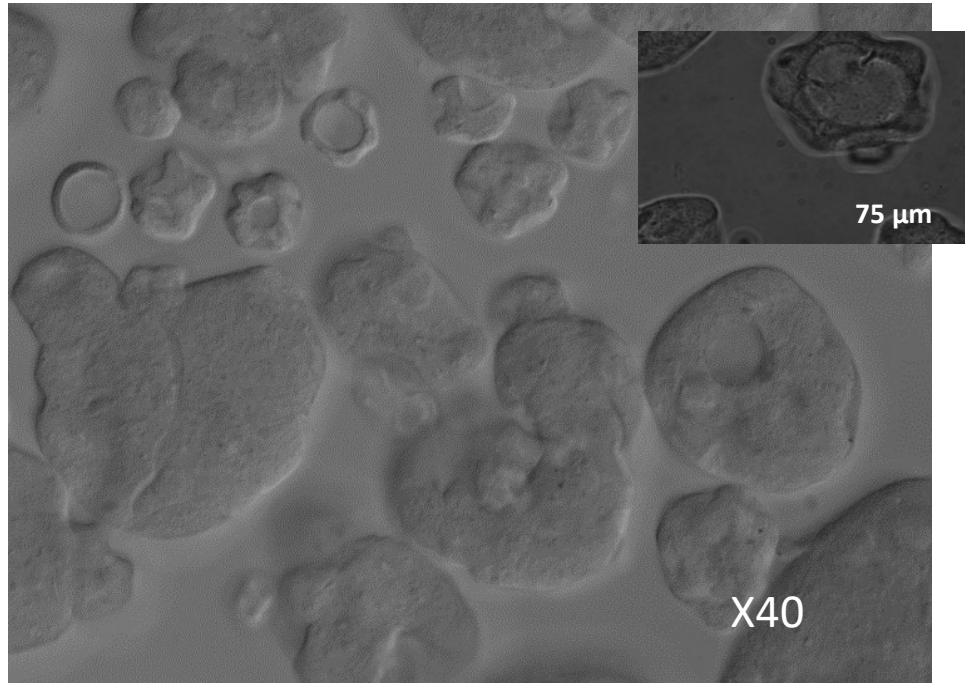


# Taille SEC-MALS

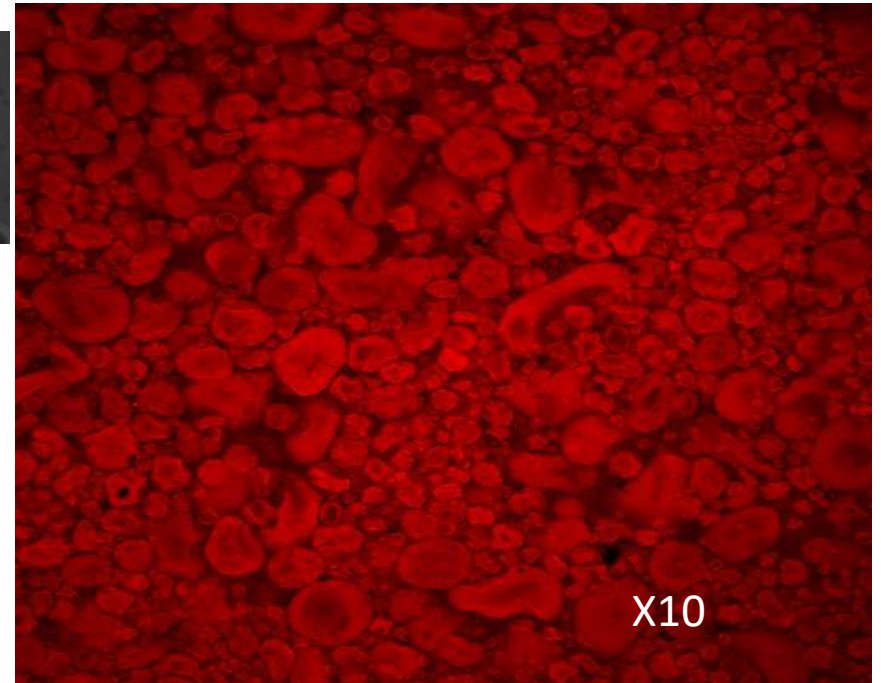


## Dissociation des protéines natives

# Taille Microscopie



VH1 après 5H de solubilisation dans l'eau millipore



VH1 seul ans l'eau millipore marqué à l'ALEXA 488

Tailles variables de 70 à 280  $\mu\text{m}$

# Conclusions & Perspectives

- **Influence du procédé sur la solubilité**
  - Labo > Voie sèche > Voie humide
- **Quelle étape influence la solubilité?**
  - Traitement thermique?
  - Précipitation?
- **Fonctionnalité: gélification**



## Merci

BIBS

Equipe ISD

Lucile

Adeline



Lucas



Des questions ?





# A Collaborative Study to Develop a Standardized Food Protein Solubility Procedure

C.V. MORR, B. GERMAN, J.E. KINSELLA, J.M. REGENSTEIN,  
J.P. VAN BUREN, A. KILARA, B.A. LEWIS, and M.E. MANGINO

## ABSTRACT

A collaborative study was conducted to develop a rapid, simple and reliable procedure for determining the solubility of food protein products, e.g., spray-dried whey protein concentrate, sodium caseinate, egg white protein and soy protein isolate. The procedure was developed by modifying the nitrogen solubility index (NSI) procedure. Protein content and soluble protein were determined by micro-Kjeldahl or biuret procedures with standard deviations of  $\pm 0.83$ – $4.12$  for all proteins except caseinate which had a value of  $\pm 13.95$ . Although the biuret and micro-Kjeldahl procedures generally provided comparable accuracy and precision for protein content and solubility of certain proteins, the biuret procedure exhibited considerable error and variability for other proteins.

## INTRODUCTION

COMMERCIAL food protein products are important functional ingredients in a number of formulated food products (Kinsella, 1976; Pour-EI, 1979; Cherry, 1981; Morr, 1982). These protein products, which are customarily spray-dried, must in most cases provide a high degree of solubility in order to be useful and functional. The solubility of these protein products is dependent upon the physicochemical state of their protein molecules, which are either favorably or adversely affected by heating, drying and other processing treatments during their manufacture and storage.

Protein solubility is commonly expressed as water-soluble nitrogen, nitrogen solubility index, water-soluble protein or protein dispersibility index (Wolf and Cowan, 1975). These latter methods utilize different dispersion media and procedures and different experimental conditions for recovering and quantitating the soluble proteins. These procedures are generally tedious and time-consuming and are unsatisfactory for routine work. Thus, researchers commonly resort to short-cut solubility methods which frequently fail to correlate well with the physicochemical and functional properties of the protein products (Shen, 1976).

This collaborative study was undertaken to develop a rapid, convenient and reliable protein solubility procedure that would be suitable for characterizing large numbers of protein prod-

Only data collected during the final year of the study are included in this paper.

## MATERIALS & METHODS

### Reference food proteins

Spray-dried commercial food protein products included: whey protein concentrate (WPC) prepared from sweet cheese whey by ultrafiltration to contain 35% protein (Land O' Lakes, Minneapolis, MN); Alanate 110 sodium caseinate (SC) prepared from edible casein to contain 94% protein as N  $\times$  6.38 (New Zealand Milk Products, Inc., Petaluma, CA); Supro 620 soy protein isolate (SPI) to contain 92.5% protein as N  $\times$  6.25 (Ralston Purina Company, St. Louis, MO); and egg white protein (EWP) containing  $\leq 0.1\%$  sodium dodecylsulfate (Ballas Egg Solids Div., Zanesville, OH). Each reference protein was divided into sublots, packaged in plastic containers and distributed to each of the collaborators. The proteins were stored at  $\leq 5^\circ\text{C}$ .

### Protein determination

The protein content of reference food protein products was determined by both micro-Kjeldahl (AOAC, 1980) and biuret (Gornall et al., 1949) procedures. The micro-Kjeldahl procedure was conducted on 10–40 mg of dry protein product and protein content was computed using nitrogen conversion factors of 5.71 for soy protein, 6.38 for milk proteins, and 6.25 for egg protein.

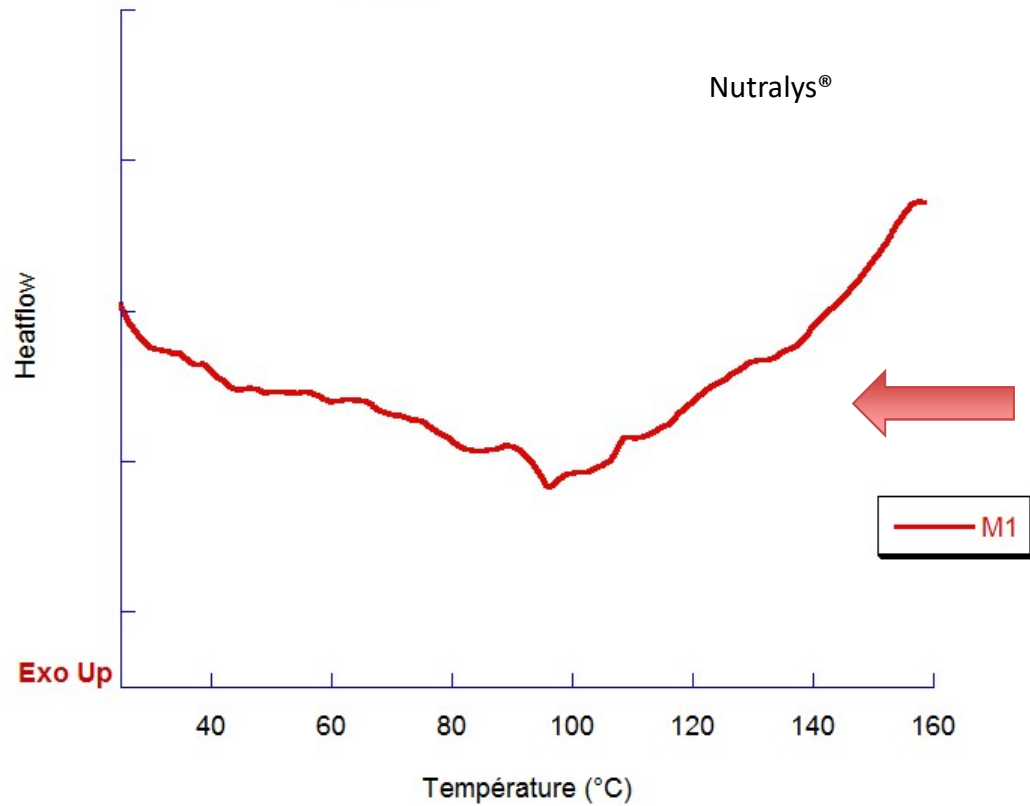
The biuret procedure was performed by accurately weighing about 100 mg of protein sample into a 10 mL beaker and adding 6 mL of 1N NaOH solution in small increments with stirring to provide a smooth paste that was free of lumps. The protein dispersion was transferred to a 10 mL volumetric flask, diluted to the mark with 1N NaOH solution and mixed by inverting and swirling several times. Appropriate aliquots of the dispersion (0.1–1.0 mL) were pipetted into separate spectrophotometer cuvettes and distilled water was added to bring the volume to 1.0 mL. Four milliliters of biuret reagent were added, and the cuvettes were vortexed. The absorbance of the solutions was determined at 540 nm after holding for 15–30 min for color development. Protein contents were determined from a standard curve of absorbance at 540 nm vs protein concentration prepared with bovine serum albumin (A-7638, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO).

### Protein solubility



# DSC

P100W90\_E1\_060916 15:35:40 07/09/2016



Pas de pic visible de dénaturation en DSC = protéines déjà dénaturées ou non accessibles...

