

ÉTUDE DU GLUTEN DE FROMENT*

I. SOLUBILITÉ

par

R. H. DE DEKEN ET A. MORTIER

Laboratoire de Microbiologie et Biochimie du Centre d'Enseignement et de Recherche des Industries Alimentaires (CERIA), Bruxelles (Belgique)

INTRODUCTION

Dans une note préliminaire¹ nous avons insisté sur la difficulté que représente l'insolubilité du gluten pour l'étude de sa structure. Les fractions classiques gliadine et gluténine, ne peuvent en effet convenir à une étude de structure, étant donné que ces fractions ne possèdent plus les propriétés caractéristiques du gluten (cohésion et élasticité). Nous avons, par conséquent, tenté d'effectuer une solubilisation du gluten total.

Les caractères les plus marquants du gluten sont son insolubilité dans l'eau et les solutions salines, sa solubilité partielle dans l'alcool 70°² et ses propriétés mécaniques. L'ensemble de ces propriétés ou une partie d'entre elles, peuvent être expliquées de différentes manières.

1. Une nature lipoprotéique du gluten rendrait compte de ses caractères de solubilité; cette idée fut avancée pour la gluténine par OLCOTT ET MECHAM³ et Mc CALLA⁴. Par contre, sa richesse en proline (imino-acide soluble dans l'alcool) ne peut être tenue pour responsable de ces caractères, étant donné le comportement du collagène, protéine nettement plus riche en proline et insoluble dans l'alcool⁵.

2. Le comportement du gluten pourrait être dû à un phénomène d'hydratation des molécules protéiques, accompagné d'une polymérisation donnant naissance à un réseau insoluble et élastique.

3. L'absence de groupes polaires pourrait être la raison de l'insolubilité du gluten dans les solvants ionisants et de sa solubilité dans un solvant à constante diélectrique faible tel que l'alcool 70°.

4. Une structure semblable à celle de la kératine, c'est-à-dire constituée par des molécules unies par des ponts-S-S- expliquerait à la fois les propriétés mécaniques et l'insolubilité du gluten.

* Ce travail a été entrepris à l'initiative de Mr. le Professeur J. M. WIAME et avec l'aide du "Comité pour l'Etude des Froments indigènes et de leur Utilisation" et de l'"Institut pour l'Encouragement de la Recherche Scientifique dans l'Industrie et l'Agriculture" (IRSA). Le but de ces travaux est de comprendre les propriétés mécaniques du gluten et des pâtes au niveau moléculaire.

Bibliographie p. 360.

RÉSULTATS

Avant de tester chacune de ces possibilités, une méthode de conservation du gluten à dû être mise au point. Le gluten et les farines deviennent en effet rapidement le siège de dégradations protéolytiques et oxydatives ou d'infections bactériennes nuisant à la reproductibilité et à la valeur des essais. Le gluten, isolé par lixiviation, a été lyophilisé suivant une technique décrite plus bas, et conservé sous vide. Ce gluten réacquiert toutes ses propriétés initiales après hydration; toutes les expériences ont d'ailleurs été vérifiées sur gluten frais.

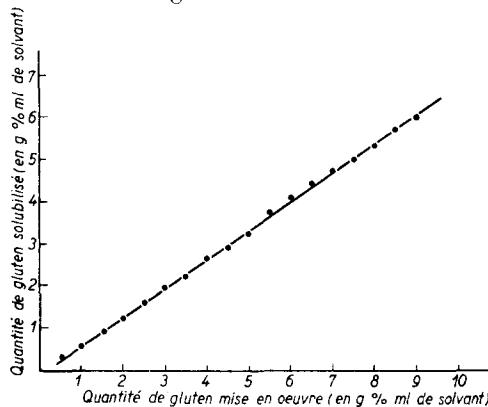


Fig. 1. Courbe de solubilité du gluten dans un mélange pyridine-eau (64 volumes de pyridine pour 100 volumes de mélange).



Fig. 2. Courbe de solubilité du gluten dans l'alcool éthylique 70°.

Pour vérifier le premier point (lipoprotéines), du gluten lyophilisé a été délipidé par différents solvants dans un appareil de Soxhlet. Les quantités de lipides extraites sont tout à fait insuffisantes pour rendre cette hypothèse vraisemblable: respectivement 5.4 et 8.0 mg de lipides par g de gluten anhydre sont extraits par l'éther et l'acétone. Le gluten délipidé possède d'ailleurs les mêmes propriétés de solubilité qu'avant traitement.

Nous avons toutefois voulu tester la solubilité du gluten dans les solvants des lipides miscibles à l'eau, autres que l'alcool. Par simple agitation mécanique à température ordinaire, le gluten se solubilise lentement dans les mélanges d'eau et de solvants organiques tels que la pyridine, le dioxane, l'acétone, l'éthanolamine et l' α -picoline. Les résultats obtenus pour la pyridine sont donnés par la Fig. 1. 50 à 60 % des protéines d'un échantillon donné sont solubles et cette solubilité reste constante dans les limites de concentrations testées, c'est-à-dire entre 10/00 et 10 % de protéines; on assiste donc à une séparation du type gliadine-gluténine telle qu'elle a été décrite pour l'alcool 70° (Fig. 2). Toutefois dans les solvants testés, les propriétés élastiques disparaissent: la lente solubilisation doit être considérée comme étant le résultat d'une dégradation progressive.

Nous avons tenté d'obtenir une solubilisation plus complète et surtout plus rapide,

Bibliographie p. 360.

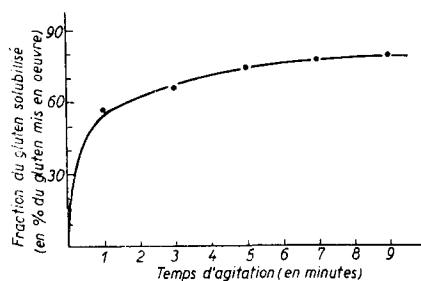


Fig. 3. Solubilité du gluten dans un mélange pyridine-eau en fonction du temps d'agitation (Mix-blendor).

dans les mêmes solvants, en dispersant le gluten à l'aide d'un Mix-blendor*. La Fig. 3 donne la quantité de gluten mis en solution en fonction du temps d'agitation. La solubilisation est presque complète: 80%. De ces solutions opalescentes le gluten peut être reprécipité soit par dilution par l'eau, soit par addition de solvant organique: ce précipité a conservé les propriétés initiales du gluten. Il n'est toutefois pas possible de réaliser un fractionnement du gluten par précipitation fractionnée de ces solutions. Nous avons d'ailleurs montré par la suite que ces solutions ne sont pas des dispersions moléculaires vraies; elles sont donc peu utiles à l'étude physico-chimique du gluten. L'action du Mix-blendor consiste probablement en une rupture de liaisons intermicellaires de faible énergie.

Une vérification du second point (hydratation) a été tentée en dispersant le gluten lyophilisé dans l'eau distillée à l'aide du Mix-blendor. On pouvait espérer favoriser la solubilisation des protéines plutôt que leur hydratation accompagnée d'une éventuelle polymérisation. En moyenne 15% des protéines du gluten peuvent être mises en solution dans l'eau distillée par cette méthode; la solution obtenue est caractérisée par un fort pouvoir de diffusion de la lumière et une précipitation des protéines pour des concentrations salines très faibles.

Cependant un des échantillons de gluten testés, n'était soluble qu'à raison de 3%. Nous avons attribué cette faible solubilité à une oxydation des protéines, cet échantillon ayant, en effet, été exposé à l'air au cours de sa lyophilisation, à un moment où il était encore humide et présentait une grande surface. Nous avons donc supposé que *le degré d'oxydation des protéines du gluten était responsable non seulement de leur solubilité variable, mais encore de leur insolubilité en général.*

Cette nouvelle hypothèse a été vérifiée en testant la solubilité du gluten dans différentes solutions réductrices ou oxydantes de même concentration molaire ($M/100$). En effectuant les essais à $0^\circ C$ et à pH 11, le gluten peut être dissous quantitativement par la plupart des réducteurs (voir Tableau I)**. Le sulfite ne donne lieu qu'à une solubilisation partielle, tandis que l'acide ascorbique donne des résultats erratiques dus à son instabilité en milieu alcalin (oxydation).

Le gluten traité par un quelconque réducteur et reprécipité de sa solution par acidification ne manifeste plus l'élasticité caractéristique du gluten nati; seule une faible cohésion subsiste.

Une solution de chlorure de potassium $M/100$, portée à pH 11 et à $0^\circ C$ (témoin) ne dissout qu'une fraction seulement du gluten (38% environ): cette fraction garde néanmoins ses propriétés mécaniques. Dans l'eau distillée portée à pH 11, la solubilité est légèrement plus grande (42%). Certains oxydants dont le bromate et le periodate diminuent la solubilité du gluten à pH 11. Le persulfate, par contre, solubilise légèrement le gluten, mais il s'agit dans ce cas d'une oxydation très profonde et peu spécifique.

Etant donné la spécificité d'action des réducteurs, il est fort probable que leur action consiste en une rupture de liaisons $-S-S-$. De plus, cette réaction étant accompagnée d'une perte des propriétés mécaniques du gluten, nous pouvons admettre que

* Cette technique avait déjà été utilisée par H. S. OLcott ET M. J. BLISH⁶.

** Des essais préliminaires ont montré qu'il était indispensable d'effectuer la réduction à pH 11, le gluten traité par les réducteurs n'étant soluble qu'en milieu alcalin. De même, il est apparu que ces opérations devaient être faites à basse température. En effet à température ordinaire, l'eau portée à pH 11 suffit à solubiliser une fraction importante du gluten avec perte des propriétés mécaniques. A $0^\circ C$ cette action dénaturante de l'alcali est fortement minimisée.

TABLEAU I
SOLUBILITÉ DU GLUTEN DANS DES SOLUTIONS RÉDUCTRICES OU OXYDANTES

	Réactif	Pourcentage de gluten dissous
Témoins	Eau distillée portée à pH 11 (NaOH)	42 %
Réducteurs	Chlorure de potassium $M/100$	38 %
	Acide thioglycolique	89.5 %
	Sulfure de sodium	90.6 %
	Cyanure de potassium	83.7 %
	Cystéine	88 %
	Thiophénol	88.2 %
	Sulfite de sodium	58.1 %
Oxydants	Acide ascorbique	23.1 %
	Bromate de potassium	24.3 %
	Periodate de potassium	11.1 %
	Persulfate de potassium	45.2 %

les ponts $-S-S-$ sont responsables de ces dernières, ce qui confirme l'une des possibilités énoncées au début de ce travail, à savoir la structure du type kératine.

La solubilisation du gluten revêt toutefois un aspect plus complexe. Il est évident que le morcellement d'un édifice composé de molécules liées par des ponts $-S-S-$ peut suffire à solubiliser les unités moléculaires composant ce réseau, comme c'est le cas pour la kératine^{7,8,9}. Mais, comme nous l'avons signalé plus haut, le gluten réduit n'est soluble que dans une étroite zone de pH, en milieu alcalin (Fig. 4a). Ceci signifie que le gluten est très pauvre, sinon dépourvu de groupes polaires basiques et acides ($-NH_2$ et $-COOH$) et porteur exclusivement de groupes $-SH$ dont le pK élevé (environ 10.4)

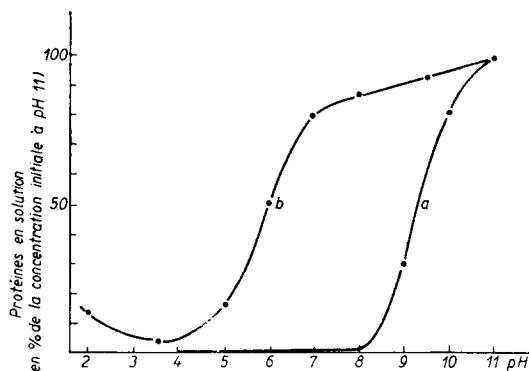


Fig. 4. Courbe a: Solubilité du gluten réduit en fonction du pH. Courbe b: Solubilité, en fonction du pH, de gluten réduit après réaction avec l'iodoacétate à pH 8.

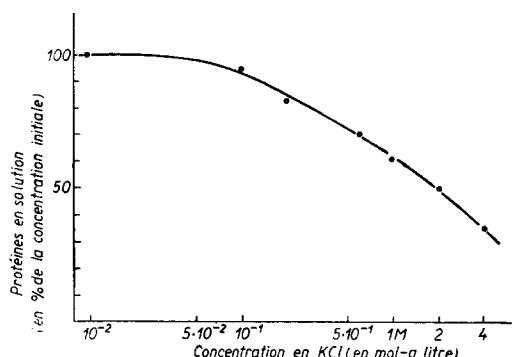


Fig. 5. Solubilité du gluten réduit en fonction de la concentration saline (KCl).

correspond bien à la zone de solubilisation du gluten réduit. La composition du gluten en acides aminés¹⁰ montre en effet la rareté des groupes polaires: toutes les fonctions carboxyles des acides glutamique et aspartique sont amidées, tandis que les groupes aminés libres sont peu nombreux. Le même résultat a été mis en évidence pour la gliadine¹¹. D'autre part la présence de groupes $-SH$ a pu être mise en évidence pour le

gluten réduit: après réaction avec l'iodoacétate à pH 8, les protéines réduites voient leur zone de solubilité se déplacer vers les pH neutres (Fig. 4b). Ce phénomène correspond à la substitution de fonctions carboxyles ($-S-CH_2-COOH$) de pK bas, aux groupes $-SH$ de pK élevé.

La Fig. 5 montre la précipitation progressive du gluten réduit par des concentrations salines modérées, phénomène résultant probablement de la pauvreté du gluten réduit en groupes polaires. Le gluten ne comporte en effet que 1.9% de cystine, soit, exprimé en molécules-grammes de cystéine, 2% des résidus d'acides aminés présents¹⁰.

CONCLUSIONS

1. Il est hautement probable que la structure du gluten consiste en un réseau de molécules protéiques liées les unes aux autres par des ponts $-S-S-$ formant de larges agrégats.

2. La solubilisation du gluten par les réducteurs s'effectue en deux étapes: (a) l'édiifice polymoléculaire que constitue le gluten natif est morcelé par rupture des liaisons $-S-S-$. (b) les groupes $-SH$ ainsi libérés, s'ionisent en milieu alcalin (pH 11).

L'insolubilité du gluten dans l'eau et les solutions salines (solvants polaires) est donc la conséquence de deux faits: (a) l'absence de molécules individualisées comme dans le cas de la kératine. (b) l'absence de groupes polaires qui explique aussi la lente solubilisation partielle du gluten dans les solvants de constante diélectrique basse, à condition toutefois d'admettre que cette opération est accompagnée d'un morcellement du réseau (dénaturation et disparition des propriétés mécaniques signalées plus haut).

3. Il n'est pas possible à l'heure actuelle d'affirmer la préexistence dans le gluten natif de la fraction soluble dans l'eau à pH 11 à 0° C, en l'absence de réducteurs. Il se pourrait en effet que cette fraction soit le résultat d'une dégradation protéolytique ou alcaline. Si toutefois il s'avère que cette fraction n'est pas le résultat d'une dégradation, il est possible qu'elle représente un stade intermédiaire de la synthèse du gluten, au même titre que la prokératine (protéine soluble possédant des groupes $-SH$ libres) est un précurseur de la kératine^{12, 13, 14}. Dans le cas du gluten, la solubilité de cette fraction en fonction du pH, similaire à celle du gluten réduit, laisse en effet supposer l'existence de groupes $-SH$. D'autre part l'action des oxydants tel que le bromate et le periodate, qui diminuent la solubilité du gluten dans l'eau à pH 11, plaide également en faveur de cette idée.

4. Les différences de qualité boulangère que l'on constate entre les farines provenant de variétés différentes de froment pourraient être, au moins partiellement, la conséquence d'un degré d'oxydation plus ou moins poussé du gluten (et par conséquent de son degré de polymérisation). La grandeur de la fraction soluble à pH 11 pourrait, elle aussi, être importante à ce point de vue.

Ces résultats sont en accord avec les travaux qui sont arrivés à la conclusion que l'activité principale des réducteurs sur le gluten et les pâtes consistait en une action chimique^{15, 16} localisée au niveau des liaisons $-S-S-$ ^{17, 18}. Il en est de même en ce qui concerne l'action améliorante du bromate sur les pâtes¹⁹.

TECHNIQUES

I. Le travail a été effectué sur du gluten isolé par lixiviation à partir d'une farine de Manitoba V* fraîchement moulue. Le gluten est lyophilisé de la manière suivante: les masses de gluten lavé par l'eau distillée sont simplement déposées au fond de grands récipients allongés. Lorsqu'on fait le vide dans l'appareil à lyophilisation, le gluten se dilate considérablement, acquérant ainsi une grande surface. Après 20 à 24 heures de lyophilisation la masse de gluten peut être aisément fragmentée dans le récipient. Le gluten anhydre est conservé sous vide.

II. Le traitement du gluten par des solutions oxydantes ou réductrices a été effectué comme suit. 1 g de gluten lyophilisé est réhydraté par l'eau distillée à 0° C. La masse de gluten est ensuite agitée pendant deux heures à 0° C dans 100 ml d'une solution $M/100$ d'un réducteur ou oxydant, ajustée à pH 11 par addition d'hydroxyde de sodium. La réaction est effectuée à l'abri de l'air et le pH est maintenu à sa valeur initiale par addition d'hydroxyde de sodium. L'utilisation d'un tampon de pH 11 a été abandonnée, l'élévation de la concentration saline occasionnée par celui-ci, diminuant trop fortement la solubilité des protéines.

Les mesures de pH sont effectuées à l'électrode de verre. Après deux heures, les solutions sont centrifugées à 15,000 tours/min, pendant 30 min, à 0° C. La quantité de protéines mises en solution est estimée par poids sec. Ces résultats sont entachés d'une erreur par défaut due aux impuretés présentes dans le gluten initial (amidon, son, débris cellulaires), mais dont les solutions de protéines sont débarrassées par centrifugation. Le témoin est constitué par une solution de chlorure de potassium $M/100$ portée à pH 11. La solubilité dans l'eau à pH 11 a également été déterminée.

III. Les courbes de solubilité ont été effectuées à l'aide de gluten réduit par du thioglycolate de sodium $M/50$ suivant la technique décrite ci-dessus.

(a) Pour déterminer la solubilité en fonction du pH, des parties aliquotes de la solution initiale ont été portées à un pH déterminé par addition d'un volume minimum d'acide chlorhydrique. Après centrifugation à basse vitesse, la concentration en protéines de la solution surnageante a été déterminée par la méthode du biuret quantitatif**. Le dosage a été étalonné à l'aide de gluten lyophilisé. Les mesures de densité optique ont été effectuées au spectrophotomètre Beckman, à 5,700 Å, dans les cuvettes de 1 cm d'épaisseur.

(b) La solubilité du gluten réduit ayant réagi avec l'iodoacétate a été testée suivant la même technique. Le gluten réduit (1 g) est précipité de sa solution à pH 6 et traité par 50 ml d'iodoacétate de sodium $M/10$, à pH 8, à 0° C, pendant une nuit²¹. Après dialyse contre l'eau distillée, la suspension est ajustée à pH 11 et étendue à 100 ml.

(c) La détermination de la solubilité du gluten réduit en fonction de la concentration saline a été réalisée en additionnant différentes quantités de chlorure de potassium solide à des échantillons de la solution protéique. Le dosage des protéines restées en solution est effectué comme ci-dessus.

RÉSUMÉ

1. Le gluten peut être solubilisé lentement et à raison de 50 % environ par des solutions aqueuses de différents solvants organiques (fractionnement classique en gliadine et gluténine). Ce phénomène est le résultat d'une dégradation des protéines.

2. Une dispersion quasi quantitative peut être obtenue dans ces mêmes solvants à l'aide du Mix-blender.

3. Les solutions aqueuses alcalines de réducteurs, permettent la solubilisation du gluten, très probablement par rupture de liaisons -S-S- intermoléculaires, suivie d'une ionisation des groupes -SH en milieu alcalin. Les protéines réduites ne sont solubles qu'en milieu alcalin (à partir de pH 10) ne possédant pratiquement que des groupes sulfhydryles comme groupes polaires. Les oxydants accentuent au contraire l'insolubilité du gluten.

4. Une fraction du gluten est soluble dans l'eau à pH 11, à 0° C. Il est fort probable qu'elle possède des groupes -SH et pourrait constituer un stade intermédiaire de la synthèse du gluten.

5. Une structure, à l'échelle moléculaire est proposée pour le gluten.

SUMMARY

1. It is possible to dissolve gluten slowly up to 50 % by aqueous solutions of organic solvents (classical fractionation into gliadin and glutenin). This phenomenon is the result of protein degradation.

* Monsieur le professeur M. SOENEN a facilité l'élaboration de ces recherches en mettant à notre disposition des échantillons de farines provenant de la mouture de variétés déterminées de froment.

** Technique inspirée par des travaux antérieurs²⁰ et modifiée par TH. BÜCHER (communication personnelle).

Bibliographie p. 360.

2. A fairly complete dispersion may be obtained with the same solvents by the aid of a Mix-blendor.

3. Alkaline aqueous solutions of reducing agents are able to dissolve gluten, probably through the rupture of intermolecular -S-S- bridges, followed by ionisation of the -SH groups in alkaline medium. The reduced proteins are only soluble in an alkaline medium (from pH 10 and higher), sulphydryl groups being the only polar groups present. Oxidising agents increase the insolubility of gluten.

4. A fraction of gluten is soluble in water at pH 11 and 0° C. It is highly probable that this fraction possesses -SH groups and it is possible that it represents an intermediate stage of gluten synthesis.

5. A structure at the molecular level is proposed for gluten.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Es ist möglich, Gluten langsam bis zu 50% mit wässrigen Lösungen organischer Lösungsmittel (klassische Trennung von Gliadin und Gluten) in Lösung zu bringen. Dieses Phänomen ist das Ergebnis einer Aufspaltung der Proteine.

2. Eine fast vollständige Dispersion kann mit den gleichen Lösungsmitteln mit Hilfe eines Mixblenders erhalten werden.

3. Alkalische wässrige Lösungen reduzierender Substanzen können Gluten in Lösung bringen, möglicherweise durch das Aufbrechen von -S-S- Brücken und anschliessender Ionisation der SH-Gruppen im alkalischen Medium. Die reduzierten Proteine sind nur im alkalischen Milieu löslich (pH 10 und höher) und besitzen nur Sulphydrylgruppen als poläre Gruppen. Oxydationen erhöhen die Unlöslichkeit von Gluten.

4. Eine Fraktion des Gluten ist in Wasser von pH 11 bei 0° C löslich. Es ist sehr wahrscheinlich, dass sie -SH-Gruppen besitzt. Sie kann als ein Intermediärprodukt bei der Synthese von Gluten angesehen werden.

5. Eine Molekularstruktur des Gluten wird vorgeschlagen.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ R. H. DE DEKEN, A. MORTIER AND J. M. WIAME, *Biochim. Biophys. Acta*, 10 (1953) 488.
- ² T. B. OSBORN, *Carnegie Inst. Wash. Pub.*, No. 84 (1907).
- ³ H. S. OLcott, D. K. MECHAM, *Cereal Chem.*, 24 (1947) 407.
- ⁴ A. G. McCALLA, *Ann. Rev. Biochem.*, 18 (1949) 617.
- ⁵ F. HAUROWITZ, *Chem. and Biol. of Proteins*, Academic Press, N.Y., (1950) 97.
- ⁶ H. S. OLcott AND M. J. BLISH, *Cereal Chem.*, 21 (1944) 20.
- ⁷ F. HAUROWITZ, *Chem. and Biol. of Proteins*, Academic Press, N.Y. (1950) 176.
- ⁸ D. R. GODDARD, L. MICHAELIS, *J. Biol. Chem.*, 106 (1934) 605.
- ⁹ F. F. ELSWORTH AND H. PHILLIPS, *Biochem. J.*, 32 (1938) 837.
- ¹⁰ J. W. PENCE, D. K. MECHAM, A. H. ELDER, J. C. LEWIS, N. S. SNELL AND H. S. OLcott, *Cereal Chem.*, 27 (1950) 335.
- ¹¹ A. C. CHIBNALL cité par F. HAUROWITZ dans *Chem. and Biol. of Proteins*, Academic Press, N.Y. (1950) 32.
- ¹² A. GIROUD, H. BULLIARD, *Arch. de Morphol.*, 29 (1930) 7.
- ¹³ J. B. SPEAKMAN, *J. Soc. Dyers Colourists*, Jubilee Issue (1934).
- ¹⁴ M. HARRIS AND A. E. BROWN, *J. Soc. Dyers Colourists* (1946) 203.
- ¹⁵ B. SULLIVAN, M. HOWE, F. D. SCHMALZ AND G. R. ASTLEFORD, *Cereal Chem.*, 17 (1940) 507.
- ¹⁶ H. S. OLcott, L. A. SAPIRSTEIN AND M. J. BLISH, *Cereal Chem.*, 20 (1943) 87.
- ¹⁷ I. HLYNKA, *Cereal Chem.*, 26 (1949) 307.
- ¹⁸ J. W. PENCE AND H. S. OLcott, *Cereal Chem.*, 29 (1952) 292.
- ¹⁹ P. DE LANGE EN H. M. R. HINTZER, *Centraal Inst. Voedingsonderzoek, Utrecht, Mededel.*, No. 33, (1951).
- ²⁰ T. E. WEICHSELBAUM, *Amer. J. Clin. Pathol.*, 10 (1946) 40.
H. FRANK UND P. H. KOECHER, *Deut. Arch. klin. Med.*, 197 (1950) 181.
- ²¹ L. RAPKINE, *Compt. rend. soc. biol.*, 112 (1933) 790, 1794.

Reçu le 16 octobre 1954