

ÉTUDE DU GLUTEN DE FROMENT

II. ACTION DES AGENTS RÉDUCTEURS*

par

R. H. DE DEKEN** ET M. DE DEKEN-GRENSON***

Laboratoire Carlsberg, Département de Chimie, Copenhague (Danemark)

INTRODUCTION

Dans un travail précédent¹ nous avons montré que le gluten pouvait être solubilisé quantitativement dans l'eau, après traitement par un réducteur. Le gluten réduit n'est toutefois soluble qu'en milieu alcalin (pH supérieur à 10), ne possédant vraisemblablement que des fonctions sulfhydriles comme groupes ionisables acides. Le déplacement de cette zone de solubilité vers la neutralité, après réaction du gluten réduit avec le monoiodoacétate¹ constituait déjà une vérification de l'existence de groupes sulfhydriles.

Le présent travail apporte des preuves supplémentaires concernant l'action des réducteurs sur le gluten et la structure de celui-ci.

TECHNIQUES

1. La réduction du gluten par le thioglycolate a été effectuée dans les proportions de 1 g de gluten lyophilisé pour 100 ml d'une solution de thioglycolate de concentration déterminée, portée à pH 11 par addition d'hydroxyde de sodium. La réaction est effectuée à 0° C (bain de glace) avec agitation magnétique et pendant des temps variables (voir Tableau I).

Les protéines ont été débarrassées de l'acide thioglycolique par précipitations et lavages successifs à l'aide d'une solution d'acide trichloracétique suivant la technique de MIRSKY ET ANSON². Le précipité final est redissous dans une solution aqueuse de versène à 1⁰/₁₀₀, ajustée à pH 11 et 0° C, de façon à obtenir une concentration en protéines de 2 % environ.

2. La fraction du gluten soluble à pH 11 en l'absence de réducteurs est obtenue en agitant pendant deux heures, 500 mg de gluten en présence de 25 ml d'une solution aqueuse de versène à 1⁰/₁₀₀, ajustée à pH 11 et 0° C. La solution ainsi obtenue est débarrassée du gluten insoluble par une centrifugation de 15 min à 15,000 tours/min, à basse température; la concentration en protéines de cette solution est d'environ 0.9 g % ml.

3. Les fonctions sulfhydriles ont été dosées par le ferricyanure en présence d'urée suivant la méthode établie par ANSON³. Mains détails expérimentaux, notamment ceux qui concernent l'établissement de la courbe d'étalonnage, ont été empruntés au travail de CHRISTENSEN⁴. La faible solubilité du gluten a rendu nécessaire une légère modification de la méthode de ANSON: la concentration en urée a été maintenue à 40 % jusqu'à la fin des opérations (développement de la coloration) afin d'éviter une précipitation du gluten.

* Ce travail a été subsidié par le "Comité pour l'Etude des Froments indigènes et leur Utilisation" et l'"Institut pour l'Encouragement de la Recherche Scientifique dans l'Industrie et l'Agriculture" (IRSI-A).

** Adresse actuelle: Centre d'Enseignement et de Recherche des Industries Alimentaires (CERIA), Bruxelles, Belgique.

*** Adresse actuelle: Laboratoire de physiologie animale de l'Université Libre de Bruxelles, Belgique.

L'étalonnage a été effectué à l'aide de mélanges de ferri- et ferrocyanure contenant des concentrations croissantes de ce dernier. La solution de ferrocyanure était préparée extemporanément à l'aide d'eau distillée débarrassée de l'oxygène dissous sous vide. Le volume final de chaque essai est de 10 ml, avec une concentration en urée de 40 g % ml.

Le dosage est effectué dans des fioles jaugées de 10 ml. Les temps de dénaturation et d'oxydation ont été mis au point. Les détails de la technique sont donnés ci-dessous.

- A. Dénaturation: 0.5 ml de solution protéique à 2 % environ.
0.1 ml d'acide chlorhydrique normal.
1.6 ml d'urée à 55 %.
10 minutes d'incubation à 37° C.

- B. Oxydation par le ferricyanure de concentration 0.01 M.
Addition de: 0.1 ml d'hydroxyde de sodium normal.
0.2 ml de tampon de phosphate M pH 6.8.
2.15 ml d'urée à 55 %.
0.5 ml de ferricyanure 0.1 M.
15 minutes d'incubation à 37° C.

- C. Développement de la coloration:
Addition de: 0.5 ml d'acide sulfurique molaire.
3.55 ml d'urée à 55 %.
0.5 ml de la solution de sulfate ferrique de FOLIN ET MALMROS⁵.
Compléter à 10 ml avec de l'eau distillée.

Attendre 20 minutes. La densité optique est mesurée à 680 m μ à l'aide du spectrophotomètre Beckman modèle B. Les résultats ont été rapportés à l'azote protéique, déterminé suivant la technique de Kjeldahl.

La solution d'urée à 55 % est préparée extemporanément et évacuée sous vide. L'urée a été purifiée par recristallisation dans l'alcool absolu.

De l'eau bidistillée dans un appareil de verre a été utilisée pour tous les travaux, afin d'éviter une catalyse de l'oxydation des groupes sulfhydriles par les métaux lourds.

RESULTATS

Mise en solution

La dissolution d'un gramme de gluten (poids sec) par 100 cc d'acide thioglycolique M/100 à pH 11 et 0° C est une opération lente qui nécessite environ deux heures. L'utilisation de thioglycolate M/50 abaisse la durée de la réaction à une heure, tandis que pour une concentration M/25 la dissolution est obtenue en trente minutes environ. Lorsque la concentration du réactif atteint M/10, le temps de dissolution s'élève à soixante à nonante minutes. A cette concentration saline élevée, la vitesse de dissolution du gluten en cours de réduction est fortement freinée. Autrement dit la fragmentation du gluten solide par l'agent réducteur doit être poussée très loin avant que le gluten puisse entrer en solution vraie (réaction lente solide-liquide). Pour les concentrations salines plus faibles la réaction hétérogène (solide-liquide) est plus sommaire et la réduction se poursuit en milieu homogène.

Mise en évidence des fonctions sulfhydriles

Le gluten réduit par l'acide thioglycolique M/25, à pH 11 et 0° C, et reprecipité de sa solution à pH 6 a été lavé de nombreuses fois par une solution de versène à 1⁰/₁₀₀ dans l'eau distillée à pH 6, afin d'être débarrassé des dernières traces de thioglycolate. Ce gluten, remis en solution à pH 11, donne une réaction négative avec le nitroprussiate en milieu ammoniacal. Si l'on dénature le gluten réduit par l'urée à 40 %, la réaction au nitroprussiate devient nettement positive. Le gluten réduit est porteur de groupes sulfhydriles "masqués".

Bibliographie p. 569.

Dosage des fonctions sulfhydriles

Les groupes -SH ont été dosés par oxydation au ferricyanure en présence d'urée suivant la technique élaborée par ANSON³. Les résultats sont exposés au Tableau I. La fraction du gluten soluble dans l'eau à pH 11, à 0° C, en l'absence de tout réducteur, compte $0.177 \cdot 10^{-6}$ groupes -SH par mg d'azote protéique.

TABLEAU I
DOSAGE DES GROUPES -SH DU GLUTEN APRÈS RÉDUCTION PAR DIFFÉRENTES
CONCENTRATIONS DE THIOLYCOLATE (pH 11, 0° C)

Concentration du réactif.	Durée de la réaction	Nombre de groupes -SH par mg d'azote protéique
M/100	120 min	$0.112 \cdot 10^{-6}$ mol/g
M/25	30 min	$0.92 \cdot 10^{-6}$ mol/g
M/10	90 min	$0.96 \cdot 10^{-6}$ mol/g

DISCUSSION

Dans les conditions expérimentales présentes, l'utilisation de réducteurs à faible concentration aboutit à un équilibre. Pour des concentrations plus élevées du réactif, le nombre de groupes -SH libérés atteint une valeur limite. Malgré l'absence de données sur le nombre de groupes -SH initialement présents dans le gluten, cette apparition progressive de radicaux sulfhydriles au cours de la réduction montre que le gluten natif est très pauvre en groupes -SH. Ces données quantitatives confirment l'hypothèse avancée par plusieurs auteurs^{6,7} et nous-même¹ suivant laquelle l'action principale des réducteurs sur le gluten consiste en une rupture de liaisons -S-S-. L'activation d'enzymes protéolytiques, quoique ne pouvant être rejetée, apparaît comme secondaire.

Le traitement du gluten par le thioglycolate M/10 dans les conditions décrites, aboutit vraisemblablement à la rupture de la totalité des ponts -S-S-. Le dosage des acides aminés du gluten, effectué par PENCE *et al.*⁸ donne une teneur moyenne de 8 molécules-gramme de cystine (plus cystéine) par 10^5 g de gluten, ce qui équivaut, après réduction complète de ce gluten, à $0.92 \cdot 10^{-6}$ groupes -SH par mg d'azote protéique (teneur en azote: 17.5%). Nos résultats (se rapportant à un seul type de gluten) sont du même ordre de grandeur: voir Tableau I.

L'évolution des propriétés du gluten après réduction par différentes concentrations de thioglycolate est intéressante. L'action du thioglycolate M/100, c'est-à-dire la rupture d'environ 12% des liaisons -S-S- existantes suffit à supprimer les propriétés élastiques du gluten. Ce gluten, reprécipité de sa solution à pH 6, manifeste encore une cohésion qui le distingue d'une protéine ordinaire. Cette cohésion devient très faible après réduction par le thioglycolate M/25, tandis qu'un réducteur de concentration M/10 donne naissance à un gluten réduit se comportant comme une protéine banale. La disparition brutale de l'élasticité du gluten et la lente disparition de la cohésion au fur et à mesure de sa réduction, plaident en faveur d'une structure en forme de réseau au sein duquel les molécules sont liées par des ponts -S-S-. De plus, le nombre relativement peu élevé de liaisons -S-S- (8 à 8.5 molécules-gramme de cystine par 10^5 g de protéines) permet de penser que la majorité sinon la totalité de ces liaisons sont intermoléculaires.

L'extraordinaire élasticité du gluten peut être due uniquement à la structure du

réseau décrit plus haut, mais il se peut également que les résidus proline (qui constituent un peu plus de 14 % des acides aminés présents, soit un résidu proline pour sept résidus d'acides aminés) contribuent à l'élasticité de l'ensemble. Cet imino-acide, ne pouvant établir de pont hydrogène avec les liaisons peptidiques voisines, pourrait en effet imposer à l'édifice une structure particulière, comme dans le cas du collagène⁹.

La fraction soluble à pH 11, quoique légèrement plus riche en groupes -SH que le gluten réduit par une concentration $M/100$ de thioglycolate, a conservé ses propriétés mécaniques. Cette richesse en groupes sulfhydriles rend l'hypothèse d'une origine protéolytique de cette fraction peu vraisemblable. Par contre elle n'écarte pas une éventuelle action des alcalis qui procéderait par rupture de liaisons -S-S-.

Nous remercions vivement monsieur le Professeur K. LINDERSTRÖM-LANG de l'intérêt qu'il n'a cessé de témoigner à notre travail et des précieux conseils qu'il nous a donnés.

RÉSUMÉ

Le traitement du gluten par des concentrations croissantes d'un agent réducteur libère des quantités croissantes de groupes sulfhydriles jusqu'à atteindre un maximum. Cette apparition progressive de groupes sulfhydriles est accompagnée d'une disparition immédiate de l'élasticité du gluten et d'une disparition progressive de la cohésion. Ces faits montrent que l'action principale des réducteurs consiste en une rupture de ponts -S-S- intermoléculaires par ailleurs responsables de la structure et des propriétés mécaniques du gluten.

SUMMARY

Treatment of gluten by increasing concentrations of a reducing agent liberates increasing quantities of sulphydryl groups until a maximum is reached. This progressive appearance of sulphydryl functions is accompanied by an immediate disappearance of the elasticity of gluten and by a slow disappearance of its cohesion. These facts show that the principal activity of reducing agents consists in a rupture of intermolecular -S-S- bridges which are also responsible for the structure and mechanical properties of gluten.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Behandlung von Gluten mit wachsenden Konzentrationen eines Reduktionsmittels setzt steigende Mengen von Sulphydrylgruppen frei, bis ein Maximum erreicht ist. Dies progressive Erscheinen von Sulphydrylgruppen ist von einem unmittelbaren Verschwinden der Elastizität des Glutens begleitet wie einer fortlaufenden Verminderung seiner Kohäsion. Diese Tatsachen zeigen, dass die Hauptwirkungen des Reduktionsmittels in einem Aufbrechen der intermolekularen -S-S-Brücken bestehen, die auch für die strukturellen und mechanischen Eigenschaften des Glutens verantwortlich sind.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ R. H. DE DEKEN ET A. MORTIER, *Biochim. Biophys. Acta*, 16 (1955) 354.
- ² A. E. MIRSKY AND M. L. ANSON, *J. Gen. Physiol.*, 18 (1935) 307.
- ³ M. L. ANSON, *J. Gen. Physiol.*, 24 (1941) 416.
- ⁴ L. K. CHRISTENSEN, *Compt. rend. trav. lab. Carlsberg, Sér. chim.*, 28 No. 2 (1952) 39.
- ⁵ O. FOLIN AND H. MALMROS, *J. Biol. Chem.*, 83 (1929) 115.
- ⁶ I. HLYNKA, *Cereal Chem.*, 26 (1949) 307.
- ⁷ J. W. PENCE AND H. S. OLCOTT, *Cereal Chem.*, 29 (1952) 292.
- ⁸ J. W. PENCE, D. K. MECHAM, A. H. ELDER, J. C. LEWIS, N. S. SNELL AND H. S. OLCOTT, *Cereal Chem.*, 27 (1950) 335.
- ⁹ L. PAULING AND R. B. COREY, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 37 (1951) 272.

Reçu le 1er novembre 1954