

Etude de la fraction protéique salino-soluble des graines de colza  
variété "00"

J-M. ROBIN et J-L. AZANZA - DEPARTEMENT ALIMENTATION ET NUTRITION  
Université de Bordeaux I, Avenue des  
Facultés - 33405 TALENCE CEDEX

### Introduction

Les protéines des graines de Colza (*Brassica napus* L., *Brassica campestris*) sont essentiellement constituées par une fraction albumine, soluble dans l'eau, et par une fraction globuline soluble dans les solutions salines. Comme celles des graines de légumineuses, ces deux fractions protéiques sont caractérisées par un coefficient de sédimentation  $S_{20}$ , W 11-12 (globulines) et 1,7-2,0 (albumines) (1).

Différentes études de microscopie électronique et de diffraction des rayons X aux petits angles (2), (3), (4), (5) ont montré que les 11-12 S globulines se présentaient sous la forme d'une sphère correspondant à une structure oligomérique constituée de sous-unités monomériques.

On peut penser que comme dans le cas des globulines de légumineuses (6), ces unités monomériques seraient constituées de l'association de différentes chaînes polypeptidiques.

Dans le présent travail, nous avons cherché à mettre en évidence ces différents polypeptides et à préciser la nature des interactions conduisant à leur association.

### Matériel et méthodes

La fraction protéique de farine délipidée de graines entières de Colza, variété "00"(\*) est extraite en tampon borate 20 mM, pH = 8,0, NaCl 5 %. Le surnageant de centrifugation (6 000 RPM, 10 minutes) constitue l'extrait brut (E.B.) ; il renferme 56 % de l'azote total de la farine de départ.

- *Chromatographie d'exclusion-diffusion* : 2 ml (300 mg de protéines) d'extrait brut sont déposés au sommet d'une colonne (105 x 1,6 cm) de Sephacryl  $S_{300}$  préalablement équilibré en tampon borate 20 mM, pH = 8,0, NaCl 5 %. L'élution conduite sous un débit de 6 ml/h est suivie par la mesure de l'absorbance à 280 nm. Les fractions collectées sont de 4 ml.

- *Chromatographie analytique de haute performance (H.P.L.C.)* : Elle est effectuée sur un appareillage LKB équipé d'une colonne de gel filtration TSK-G 3 000 SW. L'équilibration et l'élution sont effectuées en tampon Tris 50 mM, pH = 7,2, NaCl 0,1M. Les fractions collectées sont de 0,5 ml.

(\*) Origine CETIOM

Par contre, la bande protéique de poids moléculaire 59.000 n'est pas dissociée.

En ce qui concerne la fraction albumine (Fig. 1B) la disparition du groupe protéique de poids moléculaire 16.600 se traduit par l'apparition de deux bandes protéiques principales (poids moléculaires 15.500 et 14.200) et des bandes mineures (poids moléculaire 13.000). Ici encore l'analyse électrophorétique bidimensionnelle confirme ce résultat (Fig. 2B).

L'étude comparative des variétés "00" et jet 9 montre une grande similitude des diagrammes électrophorétiques des fractions protéiques réduites ou non réduites.

### 3 - Composition en acides aminés :

La fraction albumine est particulièrement riche en cystéine, méthionine, et lysine. La fraction globuline est pauvre en acides aminés soufrés, sa teneur en arginine, acides aspartiques et glutamiques est par contre élevée.

### Conclusions

Si la fraction albumine se révèle en électrophorèse monodimensionnelle comme homogène, après réduction, on constate son fractionnement en trois sous-espèces protéiques de poids moléculaires de 13.000, 14.200 et 15.500. Celles-ci sont donc associées par l'intermédiaire de ponts disulfures.

L'étude par gel filtration en H.P.L.C. de cette fraction confirme son hétérogénéité.

La fraction globuline est hétérogène et composée de sous-unités polypeptidiques dont les poids moléculaires sont voisins de 59.000, 32.000 et 23.000.

L'analyse électrophorétique bidimensionnelle montre que l'association de ces polypeptides en unités monomériques est essentiellement sous la dépendance de liaisons ioniques. Seuls, certains monomères sont constitués de polypeptides reliés en plus par des liaisons disulfures.

Ces résultats montrent que la structure des globulines des protéines des graines de Colza est très similaire à celle des globulines de légumineuses (6).

La composition en acides aminés de la fraction albumine montre que celle-ci est riche en cystéine, méthionine et lysine. Ces résultats confirment ceux de YOULE et HUNG (7). Par contre, la fraction globuline est pauvre en acides aminés soufrés. La fraction albumine quantitativement prépondérante dans les tourteaux de Colza est donc responsable de leur bonne valeur nutritionnelle.

- Techniques électrophorétiques :

*Monodimensionnelle* : Elle est menée sur gel de polyacrylamide (15 %) en présence de dodécylsulfate de sodium (S.D.S.). Les échantillons protéiques sont préalablement dénaturés (100°C pendant 2 minutes) en milieu S.D.S., en présence ou non d'agent réducteur (2-Mercaptoéthanol).

*Bidimensionnelle* : Après une première migration en absence d'agent réducteur, la bande de gel préalablement incubée en présence de S.D.S.-2-Mercaptoéthanol, est déposée sur un second gel.

Les poids moléculaires sont déterminés par référence à la migration de protéines étalons.

- *Analyse des acides aminés* : Elle est réalisée sur autoanalyseur Liquimat III KONTRON après hydrolyse des échantillons en milieu HCl 6M à 110°C pendant 24 et 48 heures.

Résultats

1 - Analyse chromatographique de l'extrait brut :

L'extrait brut est séparé par chromatographie sur Sephacryl S<sub>300</sub> en cinq fractions distinctes. Les fractions 4 et 5 (fortement pigmentées) et la fraction 1 (exclue du gel) correspondent à 11 % de l'azote total de l'extrait brut. Les fractions 2 (globuline) et 3 (albumine) présentent respectivement 34 et 54 % de l'azote total.

La fraction globuline chromatographiée par H.P.L.C. ne donne qu'un seul pic d'élution, par contre, la fraction albumine se révèle être très hétérogène.

2 - Analyses électrophorétiques :

L'analyse électrophorétique en milieu S.D.S. des fractions 2 et 3 est représentée figure 1A. La fraction 2 se caractérise par trois principaux groupes de bandes protéiques de poids moléculaires respectifs voisins de : 59.000 (54.700 - 59.000 - 61.200), 32.000 (29.700 - 33.100) et 23.000 (24.500 - 23.500 - 22.000).

La fraction 3 est constituée par contre d'un seul groupe protéique de poids moléculaire voisin de 16.600.

L'analyse électrophorétique en milieu SDS-réducteur de la fraction globuline (Fig. 1B) montre que les bandes de poids moléculaires voisin de 55.000 disparaissent à l'exception de celle de 59.000. Par contre, l'intensité de coloration des deux autres groupes de bandes 32.000 et 23.000 est notablement renforcée. L'analyse électrophorétique bidimensionnelle (Fig. 2A) confirme que les bandes de poids moléculaires de 61.200 et 54.700 se dédoublent respectivement en polypeptides de poids moléculaires 33.100 - 24.500 et 29.700 - 23.500.

## Bibliographie

- 1 - BHATTY (R.S.) et Coll. - Can. J. of Biochem., 46, 1968, pp. 1191-1197.
- 2 - PLIETZ (R.) et Coll. - Febs Lett. 91, 1978, pp. 227-229.
- 3 - REICHELT (R.) et Coll. - Biochem. Physiol. Pflanzen, 175, 1980, pp. 653-663.
- 4 - GILL (T.A.) et Coll. - Cereal Chem. 55, 1978, pp. 180-188.
- 5 - PLIETZ (R.) et Coll. - Studia Biophysica, 79, 1980, pp. 145-146.
- 6 - DERBYSHIRE (E.) et Coll. - Phytochemistry, 15, 1976, pp. 2-34.
- 7 - YOULE (R.J.) et Coll. - Amer. J. Bot. 68, 1981, pp. 44-48.

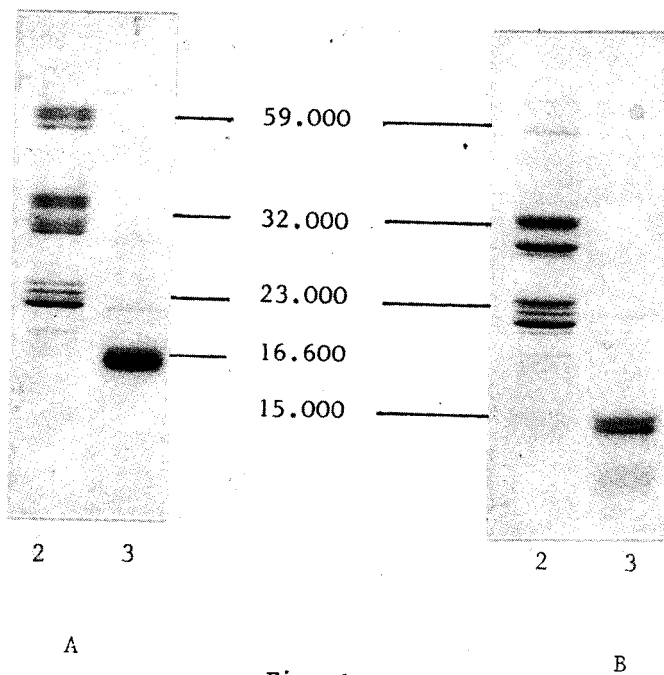


Fig. 1

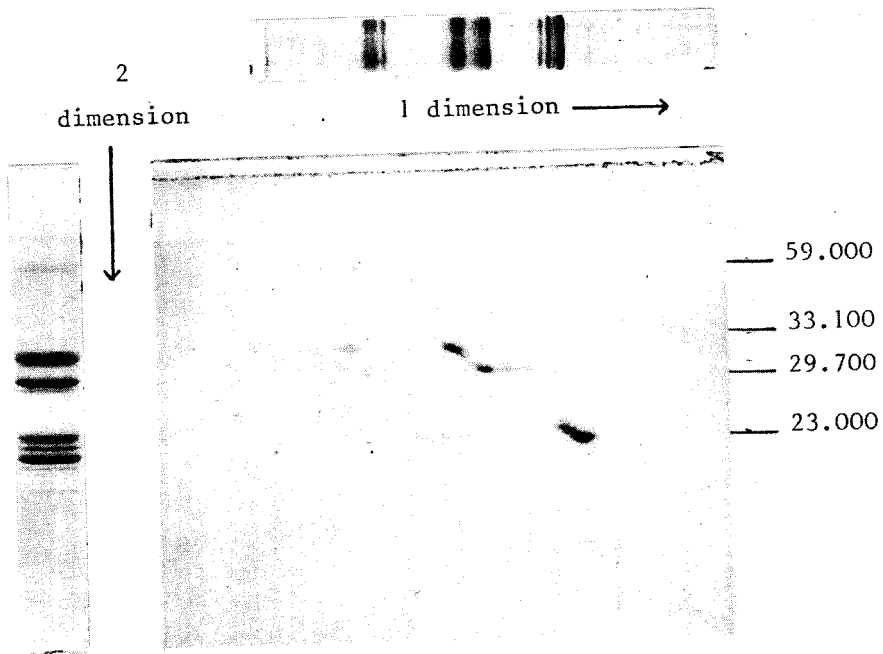


Fig. 2A

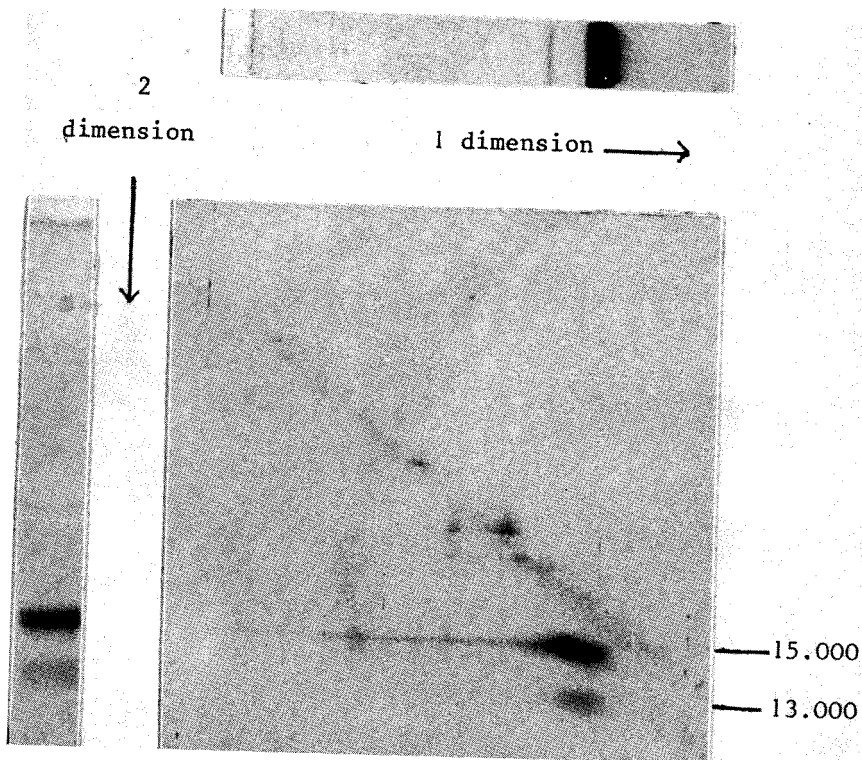


Fig. 2B