

CHROM. 5532

Méthodes d'extraction et de purification des acides aminés libres et des protéines de tissus végétaux

La plupart des auteurs emploient l'éthanol, l'eau ou d'autres solvants seuls ou en combinaison pour l'extraction des acides aminés libres¹⁻³, ou encore macèrent les tissus dans l'acide picrique pour éliminer les protéines et les peptides⁴. L'extraction fractionnée successive avec l'eau, une solution saline, l'acide acétique, l'éthanol ou d'autres solvants tels que l'acide formique, une solution alcaline ou même des détergents, est en général utilisée pour les protéines qui sont ensuite précipitées soit avec l'acide trichloroacétique (TCA) soit avec d'autres agents, ou dialysées⁴⁻⁷. En comparant les méthodes utilisées, nous avons trouvé que le mélange phénol-acide acétique-eau (PAE, 1:1:1) utilisé par SYNGE⁸ offre les meilleures garanties pour l'extraction des protéines végétales. Ce mélange extrait plus de 95% de l'azote total sans danger d'hydrolyse, et seulement une faible quantité de protéines contenant de l'hydroxyproline serait insoluble dans ce mélange^{6,8,9}.

Nous avons donc essayé de séparer les acides aminés libres des protéines à partir du même extrait avec PAE afin de simplifier les opérations techniques et obtenir un dosage plus complet.

Techniques

Extraction, purification et hydrolyse des protéines. Dix grammes de luzerne (*Medicago sativa* L.) comprenant tiges et feuilles, sont broyés et homogénéisés durant 5 min dans 50 ml du mélange PAE préparé à partir de phénol et d'acide acétique fraîchement redistillés. L'extraction est répétée une première fois avec le résidu résuspendu dans 100 ml du mélange PAE et agité durant une nuit complète, et une deuxième fois dans une quantité égale du même mélange pendant 3 h. Toutes les opérations précédentes ont lieu dans une chambre froide. Avant chaque extraction, il est préférable de faire barboter de l'azote dans l'extrait. Les parties surnageantes des extraits sont mélangées pour constituer le mélange A qui est gardé au froid.

Les protéines sont précipitées du mélange A soit avec un volume égal d'une solution de TCA à 10%, soit avec sept volumes d'acétone. Après avoir reposé toute la nuit en chambre froide, le précipité est centrifugé, séché par lyophilisation, et gardé sous vide dans un dessiccateur jusqu'au moment de l'hydrolyse.

Environ 5 mg de protéines lyophilisées sont hydrolysés dans 5 ml d'HCl 6 N dans un tube scellé sous vide à 110° pendant 24 h. L'acide chlorhydrique est ensuite évaporé sous vide à une température inférieure à 35° et éliminé complètement en allant plusieurs fois à sec, après reprise avec de petites quantités d'eau. Le résidu contenant les acides aminés est finalement dissout dans un tampon citrate de pH 1.8 et gardé au froid.

Extraction, purification et détermination des acides aminés. Dix grammes de luzerne fraîche (tiges et feuilles) sont broyés et homogénéisés durant 5 min dans 50 ml d'éthanol à 90% et centrifugés à froid. L'extraction du résidu est répétée deux fois avec de l'éthanol à 80 et à 70%. Les extraits mélangés sont gardés au froid.

Cent millilitres de l'extrait éthanolique ou du mélange A sont passés sur une colonne de 20 cm × 1 cm contenant une résine de forme H⁺ (Permutite Q), régénérée

avec HCl 2 N et lavée avec de l'eau bidistillée. Après le passage de 300 ml d'eau pour éliminer les impuretés, les acides aminés sont élués avec 100 ml de NH₄OH 2 N, suivi de 100 ml de NH₄OH 4 N suivant la méthode de ROUX ET LESAIN³. Après l'élimination de toute trace d'ammoniaque, les acides aminés sont dissouts dans le tampon citrate de pH 1.8 et gardés au froid jusqu'au moment de l'analyse. Le tampon citrate est formé d'une solution d'acide citrique 0.05 M contenant 0.3 N d'hydroxyde de lithium et ajusté à pH 1.8 avec de l'HCl 6 N.

Les acides aminés dissouts dans le tampon citrate ont été séparés et dosés suivant la méthode de SPACKMAN *et al.*¹⁰, au moyen d'un appareil d'analyse automatique de marque Technicon (Modèle TMS-1). Les quantités des acides aminés ont été calculées en mesurant la surface des pics par triangulation.

Résultats et discussion

La plupart des acides aminés qui forment la chaîne des protéines ont été récupérés presque à 100% après leur dissolution dans le mélange PAE et leur élution d'une résine cationique (Permutite Q), à l'exception des aminés soufrés (Tableau I). La

TABLEAU I

COMPARAISON DE L'ÉTHANOL ET DU MÉLANGE PAE POUR L'EXTRACTION DES ACIDES AMINÉS LIBRES DE LA LUZERNE, ET POURCENTAGE DE RÉCUPÉRATION D'UN MÉLANGE D'ACIDES AMINÉS SYNTHÉTIQUES DISSOUTS DANS PAE

Les acides aminés sont placés dans l'ordre de sortie des colonnes de séparation.

Le pourcentage de récupération est calculé d'après le nombre de micromoles dissoutes dans le mélange PAE.

Acides aminés	Quantités des acides aminés libres (μ moles/2.5 g M.F.) ^a			Récupération (%)
	I	II	III	
Acide aspartique	17.16	16.16	13.73	96.4
Thréonine	9.78	9.91	9.58	100.2
Sérine	15.19	15.30	14.20	99.2
Asparagine	18.12	17.50	17.25	—
Acide glutamique	14.50	14.35	14.00	100.3
Glutamine	1.28	1.20	0.90	—
Proline	14.46	14.25	13.90	98.4
Glycine	1.16	1.09	1.14	96.5
Alanine	10.60	10.98	10.96	99.1
Acide α -aminobutyrique	0.52	0.75	0.60	—
Cystine	traces	traces	traces	86.4
Valine	14.16	14.05	13.75	98.5
Méthionine	0.95	0.80	0.20	70.5
Méthionine + méthionine sulfoxyde	—	—	—	96.2
Isoleucine	6.66	6.67	6.25	93.7
Leucine	6.36	6.89	6.88	95.8
Tyrosine	0.81	0.70	0.65	96.5
Phénylalanine	7.30	6.81	7.08	93.8
Acide γ -aminobutyrique	4.92	10.17	9.90	—
Lysine	2.98	3.69	3.05	95.6
Histidine	4.20	4.46	4.19	94.7
Arginine	4.23	4.32	4.09	97.3

^a M.F. = Matière fraîche de la luzerne; I = acides aminés libres extraits par l'éthanol; II = acides aminés libres extraits par PAE; III = acides aminés libres extraits par PAE après la précipitation des protéines par l'acétone.

cystine est partiellement détruite et on retrouve une partie de la méthionine transformée en méthionine sulfoxyde.

Le dosage des acides aminés libres des extraits PAE, avant et après la précipitation des protéines par l'acétone, se compare favorablement à celui des extraits éthanoliques, à l'exception de l'acide γ -aminobutyrique extrait partiellement par l'éthanol (Tableau I). La précipitation des protéines par l'acétone réduit de 7% la teneur moyenne des acides aminés, réduction attribuable aux manipulations supplémentaires et à l'adsorption possible par le précipité. Ces résultats démontrent qu'il vaut mieux déterminer les acides aminés sur un échantillon de l'extrait PAE avant la précipitation des protéines par l'acétone. Les résultats montrent aussi que nos échantillons de luzerne contiennent peu de cystine libre. Le mélange PAE extrait mieux non seulement les acides α - et γ -aminobutyriques mais aussi les acides aminés basiques libres.

L'acétone est tout aussi efficace sinon plus que le TCA (5%) pour précipiter les protéines du mélange PAE. La récupération de la méthionine est plus élevée et les dangers de pertes par hydrolyse sont aussi moins grands qu'avec le TCA. Ces résultats confirment ceux de JENNINGS ET WATT⁶, qui ont trouvé que des solvants organiques tels que le dioxane ou l'acétone peuvent être utilisés pour précipiter les protéines. De plus, l'acétone a l'avantage sur le TCA de pouvoir éliminer la chlorophylle et le phénol du précipité sans affecter les acides aminés libres présents dans l'extrait PAE. La méthode est particulièrement avantageuse dans les études sur la valeur nutritive des acides aminés libres et des protéines extraits de tissus végétaux.

On peut présumer que le mélange PAE dénature les protéines. Ceci peut être considéré comme un avantage si l'on veut neutraliser l'action de certains enzymes, en particulier celle des protéases⁹.

Nous remercions le personnel des Départements des Sols et de Zootechnie de la Faculté d'Agriculture de l'Université Laval, Québec, et celui de la Station de Recherches du Ministère de l'Agriculture du Canada, Ste-Foy, Québec, des conseils et de l'aide technique apportés à la réalisation de ces travaux.

Faculté d'Agriculture,
Université Laval, Ste-Foy, Québec (Canada)*

SEN T. NGUYEN

Station de Recherches,
2560 Chemin Gomin, Ste-Foy, Québec (Canada)**

ROGER PAQUIN

- 1 C. A. ADAMS ET R. W. SHEARD, *Can. J. Plant. Sci.*, 46 (1966) 671.
- 2 *Official Methods of Analysis*, 10ème éd., Association of Official Agricultural Chemists, Washington, 1965.
- 3 L. ROUX ET C. LESAIN, *Ann. Physiol. Veg.*, 1-2 (1959) 83.
- 4 L. B. MACLEOD ET M. SUZUKI, *Crop Sci.*, 7 (1967) 599.
- 5 G. N. FESTENSTEIN, *J. Sci. Food Agric.*, 12 (1961) 305.
- 6 A. C. JENNINGS ET W. B. WATT, *J. Sci. Food Agric.*, 18 (1967) 527.
- 7 J. SINGH ET A. R. WASSERMAN, *Biochim. Biophys. Acta*, 221 (1970) 379.
- 8 R. L. M. SYNGE, *Metabolism*, 13 (1964) 969.
- 9 M. BAGDASARIAN, N. A. MATHESON, R. L. M. SYNGE ET M. A. YOUNGSON, *Biochem. J.*, 91 (1964) 91.
- 10 D. H. SPACKMAN, W. H. STEIN ET S. MOORE, *Anal. Chem.*, 30 (1958) 1191.

Reçu le 3 mai 1971; modifié le 5 juillet 1971

* Contribution No. 116.

** Contribution No. 16.