

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES PROTEINES DES LEGUMES SECS CULTIVES EN ALGERIE.

par B. ANTHELME, S. BEN ALI et C. IORDACHE

Département de Technologie Alimentaire et Nutrition.
Institut National Agronomique - El Harrach - Alger.

2ème Partie: Production d'Isolats protéiques à partir de légumes secs. Essais sur *Vicia faba*.

RESUME.

Dans une première étape les variétés de légumes secs les plus répandues en Algérie ont été étudiées sur le plan biochimique, essentiellement la valeur protéique (aminogrammes...) en vue de sélectionner les meilleures variétés sur des critères nutritionnels.

En second lieu, des conditions optimales d'obtention d'isolats protéiques de *Vicia faba*, variétés locales, ont été étudiées, en vue d'applications à la nutrition humaine. Les paramètres optima sont les suivants.

Température: +20 à 25 °C; pH extraction 6,5 environ avec l'eau distillée comme solvant; Temps d'extraction: 10 mn; Tailles des particules de farine $\leq 0,14$ mn; Rapport solvant/farine de fèves entre 5/1 et 10/1. Les deux paramètres les plus importants semblent être le choix du solvant et la finesse de la mouture.

Il reste environ 15% des protéines qui ne sont pas précipitées, ensuite, quand le pH est abaissé à 3,5 (point iso-électrique de ces protéines).

Une application pilote est envisagée, et il faudra accorder une grande importance à l'efficacité du système de centrifugation, surtout durant la phase de précipitation des protéines.

I. INTRODUCTION.

Afin d'éliminer le paramètre digestibilité et dans le cas de la fève, les risques de favisme (notamment pour l'enfant), il est apparu comme intéressant d'obtenir des isolats protéiques à partir de variétés sélectionnées de légumes secs, ceci par des méthodes aussi économiques que possible. Ceci est l'objet de la second partie de cette étude.

Ces isolats protéiques permettraient une utilisation valorisée dans l'alimentation humaine et un débouché nouveau pour l'agriculture.

Des essais de fabrication de concentrés protéiques ont été effectués en Grande-Bretagne en 1972 à partir de *Vicia faba* - par la firme Courtaulds ltd.

Des protéines texturées ont été ainsi produites, analogue à celles tirées du soya.

De même des essais de production d'isolats protéiques à partir de *Vicia faba* variété Kleine Thuringer, ont été réalisées au Danemark en 1973 (6).

Ainsi il est possible à partir de variétés sélectionnées de légumes secs (notamment des fèves) sur des critères nutritionnels, avec un profil protéique relativement équilibré, de fabriquer des isolats protéiques très proches des protéines animales, avec un rendement quantitatif bien supérieur.

La valeur nutritionnelle des fèves a déjà été déterminée sur volailles et rats (14, 17) de même celle des pois-chiches (9) et lentilles (9) sur rats. La 1ère partie de cette étude est une ébauche de classification nutritionnelle sur les variétés algériennes.

Leur intérêt est certain pour équilibrer les rations à base de céréales (cas de la ration alimentaire algérienne) et permettrait de réaliser une économie notable sur la consommation de protides d'origine animale, produit rare et de prix élevé.

En ce qui concerne l'extraction des protéines de *Vicia faba*, les informations à ce sujet reflètent plutôt l'intérêt de cette matière première pour des études biochimiques ou pour l'alimentation animale plutôt que pour l'alimentation humaine.

Ainsi les protéines des feuilles de *Vicia faba* furent extraites par des solutions aqueuses de phénol et d'acide acétique (14, 7, 8). Les protéines de graines ont été extraites par diverses solutions aqueuses incluant différents composés tel Na_2SO_3 , NaHSO_3 , NaOH

L'amidon extrait est séparé des protéines par centrifugation et filtration (11, 13) les protéines sont ensuite précipitées au point isoélectrique et séparées.

Le travail décrit ci-dessous consiste en une étude de différents paramètres d'extraction des protéines de *Vicia Faba*, le procédé a été considéré comme conduisant à un produit utilisable en nutrition humaine.

II. MATERIELS ET METHODES.

1. MATÉRIELS.

Les graines de *Vicia faba* utilisées sont celles de variétés actuellement en essai et dont la teneur en protéines est notablement plus élevée que les variétés actuellement cultivées en Algérie, à savoir *Vicia faba* Seville et V. f. Emerald.

Ces deux variétés étudiées ont été fournies par l'Institut de Développement des Grandes cultures — section légumineuses — et cultivées dans des conditions agro-écologiques semblables. Le stockage moyen de ces a été de 5 mois et la teneur en protide n'a pas subi de modifications durant cette période.

2. MÉTHODES ANALYTIQUES.

2.1. *Azote.*

Une méthode d'analyse automatique fut utilisée, basée sur la décomposition de la phase organique (farine en poudre sèche de protéines) par un digesteur (broyage en continu en milieu acide) et minéralisation à chaud en continu.

Ensuite, la détermination de l'azote sous forme amoniac utilise une réaction colorimétrique aux cours de laquelle une teinte vert émeraude se forme par action du salicylate de sodium, du dichloroisocyanurate de sodium, du nitroprussiate de sodium, à un pH alcalin.

Le complexe de salicylate d'amonium est mesuré à 660 m μ (18).

Le taux de protéine étant pris égal à 5,7 fois la teneur en azote.

2.2. *Humidité.*

La détermination est identique à celle de la 1ère partie (passage à 105° C pendant 3 h).

2.3. *Lipides.*

Détermination identique à celle de la 1ère partie (extraction à l'éther de pétrole avec appareil de Soxhlet).

2.4. *Amidon.*

Ce paramètre fut déduit de la différence entre le taux des sucres totaux de celui des glucides assimilables.

Les sucres totaux furent extraits à l'eau, déféqués, hydrolysés, et mesurées par la méthode de Bertrand (11).

Ces glucides assimilables comprennent, outre les sucres, les glucides facilement hydrolysables, tel l'amidon. La méthode de Guillemet et Jacquot (11), par le brais d'une hydrolyse acide ménagée, permet l'estimation des glucides assimilables.

3. PRÉPARATION ET EXTRACTION.

3.1. *Préparation.*

Les fèves subissent un dépelliculage manuel et sont ensuite broyées dans un moulin semi-industriel à blés, avec un taux d'extraction de 75%, correspondant à des conditions industrielles d'utilisation.

Le son grossier constitue environ 8% des résidus, le son fin 14% et les pertes 3%, en moyenne.

Les différentes fractions issues de la mouture sont classées par une série de tamis normalisés, comme l'indique le tableau 6, en fonction du nombre de recyclages (passages) de la mouture.

3.2. *Extraction.*

Une méthode d'extraction de référence fut usitée pour tous les essais, seul les paramètres concernant la taille des particules et la proportion des divers catégories de celles-ci le pH, la nature des agents chimiques furent soumis à variations, pour les deux variétés.

100 ml de solution à pH désiré et 10 g de poudre fine (farine) sont placés dans un erlenmeyer de 250 ml. On agite pendant 2 à 5 mn, on contrôle le pH que l'on réajuste si nécessaire avec NaOH ou HCl en solution normale.

Ensuite, on procède à une séparation de la solution protéique par centrifugation (préférable à une filtration pour des particules de faibles diamètres) pendant 10 mn à environ 400 g. La solution protéique obtenue est ensuite décantée et le résidu est rejeté.

3.3. *Préparation de l'isolat de protéines.*

Le pH de la solution protéique est ensuite ramené à 3,5 (point de solubilité minimale) et la solution laiteuse obtenue est centrifugée à environ 400 g pendant 10 minutes. Le surnageant contient un peu de protéines à bas poids moléculaires (il est possible de le reprendre pour diminuer cette teneur en protéine du surnageant). Ce précipité, est lavé, puis séché dans un séchoir à air chaud à 40° C et contient la majorité des protéines.

III. RESULTATS ET DISCUSSIONS.

Les constituants essentiels de *Vicia fava* - variété Seville étaient présents dans les proportions suivantes: (en pourcentage en poids de farine): protéines 30; amidon 44; Eau 12; Lipides 2.

Pour la variété Emeraude, les résultats sont: protéines: 31,5; amidon: 43, Eau: 11,5; Lipides: 1,6.

Etant donné la faible teneur en lipides, il ne semble pas utile de délipider les farines avant extraction protéique.

La haute teneur en amidon ne pose pas de problème particulier ni pour l'extraction, ni durant la séparation, et il est possible de récupérer l'amidon en tant que sous-produit intéressant.

Le taux de protéines est comparativement, à nombres de graines, économiquement intéressant, surtout dans le contexte algérien.

L'influence des divers paramètres sur l'extraction protéique est explicité ci-après.

Les paramètres de température d'extraction, de temps d'extraction, de rapport solvant/solide, étant déjà bien établis par la littérature (6), ont été gardés constants, à des valeurs optimales à savoir.

1. TEMPÉRATURE D'EXTRACTION.

Celle de la salle soit 22° C. D'ailleurs différentes températures (30° C, 45° C) n'ont aucune influence significative sur le rendement de l'extraction.

2. TEMPS D'EXTRACTION.

Celui-ci ne doit pas dépasser 15 mn. La durée choisie ici est de 10 mn.

3. RAPPORT SOLVENT/SOLIDE.

Ce rapport, dont l'importance économique est à signaler, a été étudié de 5/1 à 20/1.

Les variations enregistrées dans le rendement sont minimales.

D'autre part, la taille d'une installation pilote par exemple, est directement fonction de la quantité de solution utilisée. Il est donc nécessaire d'utiliser un minimum de solvants pour des raisons d'économie; cependant, il convient de considérer la facilité de mélange et la viscosité de la solution; aussi les rapports en dessous de 5/1 ont été rejetés. Dans le travail décrit ici, le rapport 10/1 a été employé dans tous les cas.

4. pH D'EXTRACTION ET DE PRECIPITATION.

Pour les fèves, la littérature indique (6) que le pH optimum d'extraction se situe entre 8 et 10, en utilisant une solution de NaOH. Nous verrons plus loin que cela est différent avec des solutions à base d'autres solutions tel NaCl ou l'eau distillée.

Le pH de précipitation optimal est au point de solubilité minimale, entre 3,5 et 4. Il convient de signaler que 10 à 15% environ des protéines de la graine demeurent en suspension, même après plusieurs extractions par exemple (6). Pour récupérer ces protéines, il est nécessaire de déshydrater la solution restante après la précipitation.

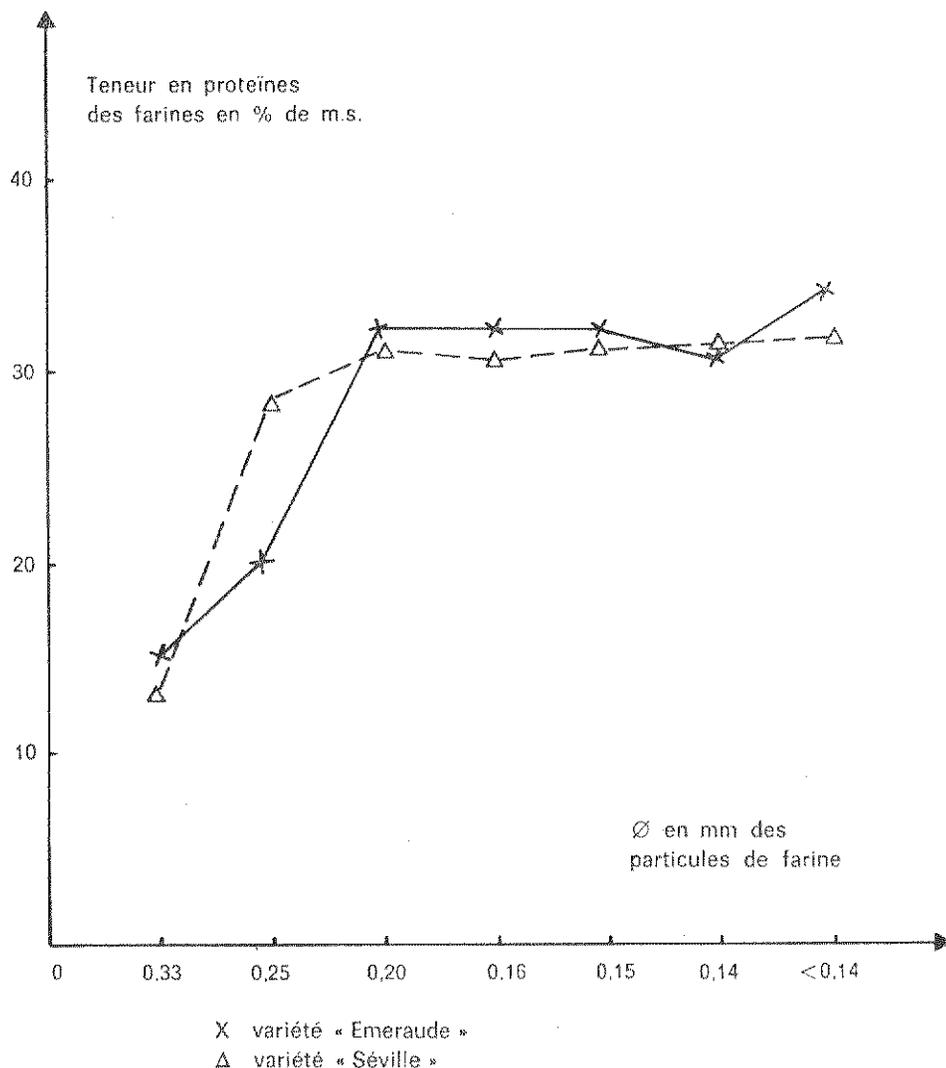


Figure 1 — Evolution de la teneur en protéine des Farines en fonction de la taille des particules.

5. SOLUTES UTILISES POUR LE MILIEU D'EXTRACTION.

Plusieurs solutés, autre que NaOH, ont été essayés, pour extraire les protéines, sur la base de critères économiques (produits peu coûteux, abondants sur le marché) et alimentaire (dénaturation moindre, notamment influence sur la saveur...).

Ces extractions ont été conduites de façon identique à celles par NaOH, mais ces pH des solutions d'extraction furent différents selon les solutés.

Des quatre solutés testés, il est apparu quelque soient les pourcentages de répartition des particules selon leurs grosseurs (nombre de mouture, v. paragraphe suivant N° 6) que l'extraction à l'eau distillée donnait les meilleurs résultats, suivis par les extractions avec NaCl 0,2 M, puis NaOH, et enfin Na_2CO_3 0,2 M. (Voire aussi fig. 3 et fig. 4).

L'intérêt de l'eau distillée est de ne pas être dénaturante comme NaOH ou Na_2CO_3 ou NaCl, pour les protéines et d'être relativement facile à produire (une eau potable, suffisamment adoucie, avec une dureté hydrotimé-

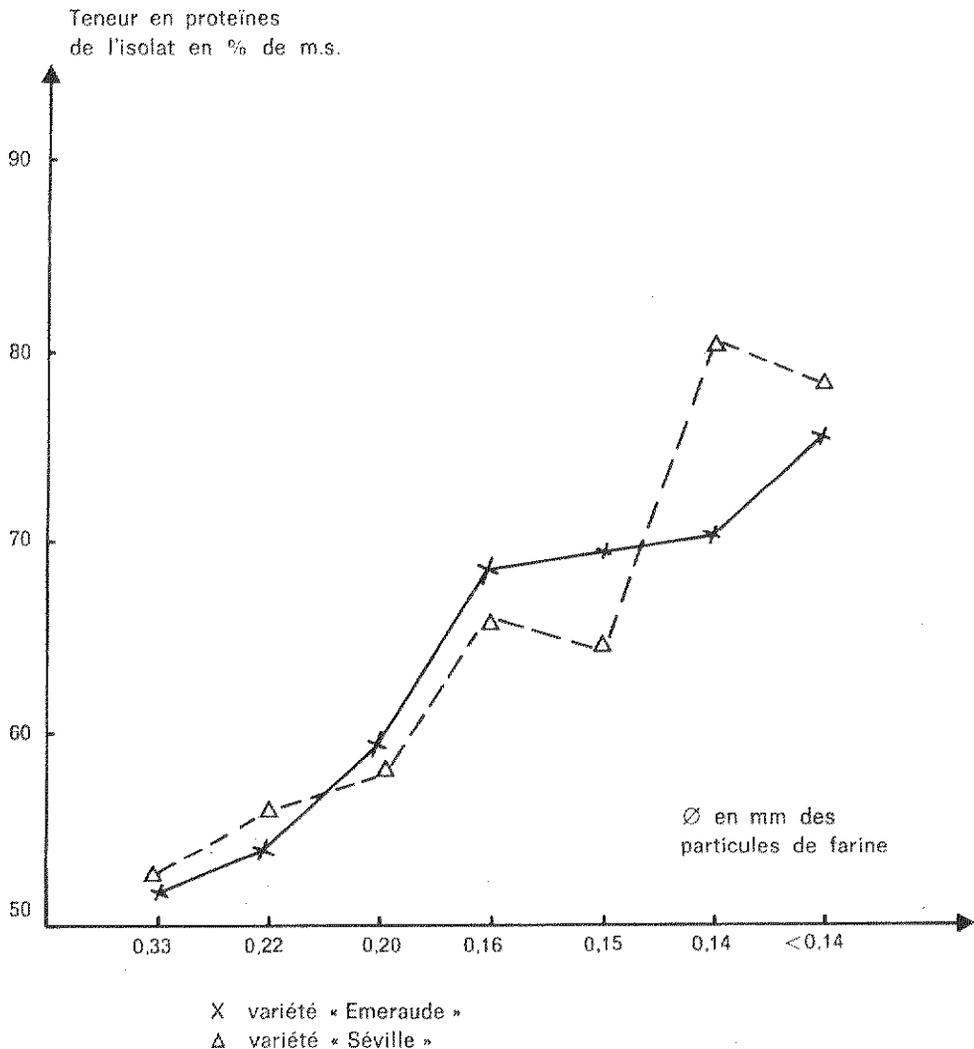


Figure 2 — Evolution du rendement en protéine en fonction de la taille des particules de farine.

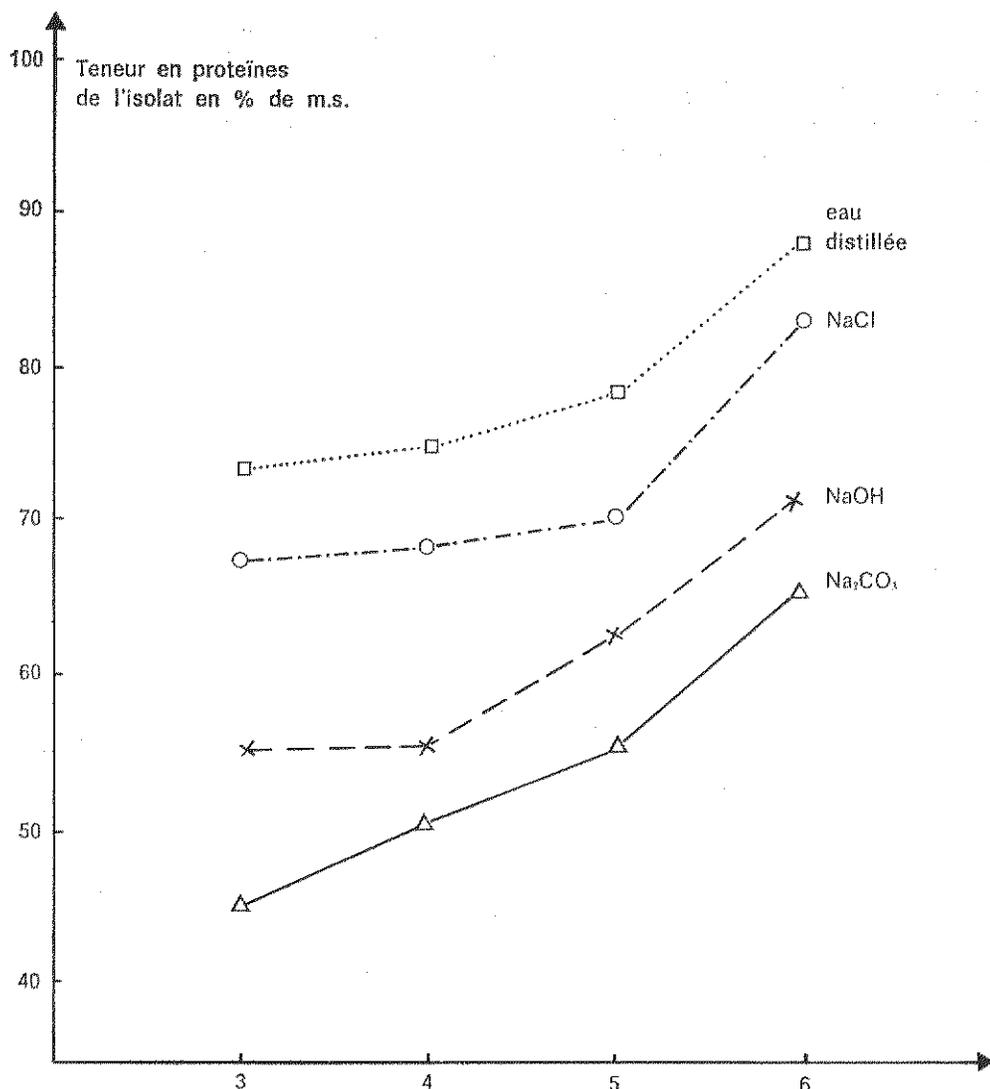


Figure 3 — Influence du nombre de moutures et de la nature des solvants sur la teneur en protéine de l'isolat obtenu: *Vicia faba*, variété « Seville ».

trique d'environ 20-30, et un pH de 6,3-6,5 pourrait suffire d'ailleurs), donc assez peu coûteuse.

En outre, le lavage de l'isolat, après précipitation à un pH de 3,5 par addition d'HCl diluée peut être moins important qu'avec d'autres solutés à pH plus élevés. (le pH, dans le cas d'extraction à l'eau descend de 6,3 à 3,5, alors qu'avec les autres solutés sauf NaCl, on doit passer de 8-10 à 3,5,

l'addition d'HCl est donc moins importante et moins dénaturante pour les protéines.

D'ailleurs l'isolat obtenu est plus homogène, d'aspect plus agréable, et la précipitation s'opère mieux; le séchage ultérieur est également facilité.

Le rendement, en poids d'isolat obtenu est aussi supérieur, généralement.

— L'emploi d'une solution de NaCl 0,2 M donne aussi de bons résultats et dénature peu les protéines (concentration voisine du sérum physiologique

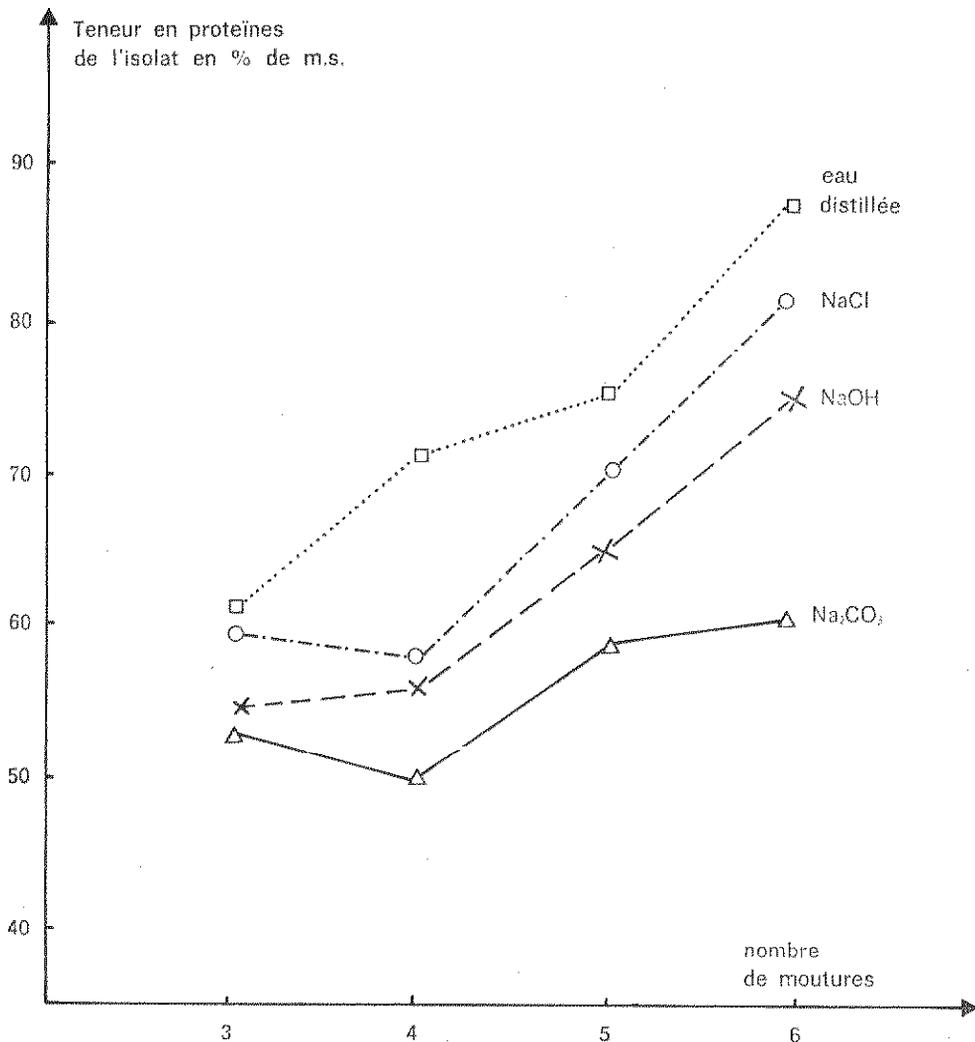


Figure 4 — Influence du nombre de moutures et de la nature des solvants sur la teneur en protéine de l'isolat obtenu: *Vicia faba*, variété « Émeraude ».

Le tableau ci-après (tableau 7) illustre l'influence des différents solutés sur le rendement en protéines.

Solutés	pH de l'extraction	Teneurs en protéines des isolats en % de m. sèches	
	pH	Variété Emeraude	Variété Séville
NaOH	9,6	65	60
Na ₂ CO ₃ 0,2 M	10,4 à 10,8	58	56
NaCl 0,2 M	6,3 à 6,6	70	65
H ₂ O distillée	6,3 à 6,4	72,5	74

N. B. - Il s'agit du pH en fin de la phase d'extraction.
Il s'agit des mêmes conditions d'extraction et de précipitation (à pH 3,5) et de la même catégorie de mouture (4 moutures ici).

et pH d'extraction bas, vers 6,5, d'où une faible quantité d'acide à rajouter lors de la précipitation).

Il est également apparu au cours des manipulations qu'une grande partie des protéines neutres précipitent déjà vers pH 5,5, c'est à dire avec un ajout très faible d'acide, et cela facilite l'utilisation de H₂O et de NaCl comme solutés d'extraction.

6. TAILLE DES PARTICULES DE FARINES.

Ce paramètre est apparu, au cours des essais comme fondamental.

Les grains décortiqués ont été broyés au moulin semi-industriel à blé et recyclés 4 fois (4 passages); la farine obtenue (7,5% de taux d'extraction) a été classée selon le degré de finesse des particules, avec un tamis normalisé, en 7 fractions (voire tableau 6). Les sons fins et grossiers ne sont pas pris en compte (25% du poids de grains initial).

Pour les 7 fractions de farine, ceci pour les deux variétés, la teneur en protéine a été calculée (voire fig. 1 b).

Il apparaît très nettement qu'à partir de la fraction des particules $\leq 0,2$ mn, les teneurs en protéine sont comparables à celle de la mouture initiale, comprenant l'ensemble des 7 fractions, même légèrement supérieures pour les fractions les plus fines.

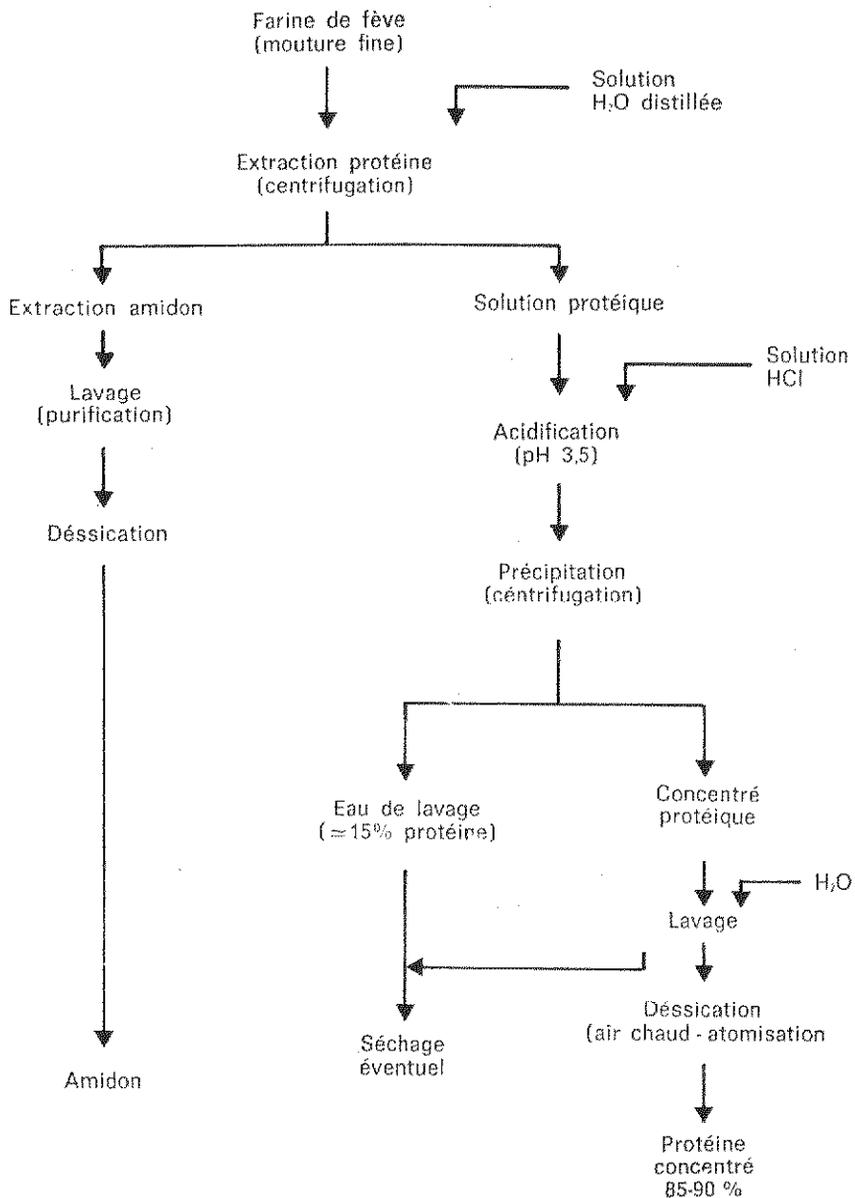


Figure 5 — Diagramme de traitement pour l'obtention de protéines concentrées.

Les fractions les plus grossières ont des teneurs en protéine nettement inférieures à la moyenne de la mouture globale. Il semblerait donc que les particules les plus grosses soient essentiellement formées d'amidon et les plus fines, de protéines selon le principe de la turboséparation (c'est à dire d'une séparation des farines plus ou moins riches en protéine par la taille des particules).

Cela est confirmé par l'extraction des protéines des différentes fractions de la mouture, comme l'indique la figure 2.

Il apparaît nettement, toutes les conditions étant identiques par ailleurs et pour les deux variétés de fèves, que les fractions les plus fines, notamment celles $\leq 1,14$ mm (tamis N. 140 et 140) sont celles où les rendements d'extraction sont les plus élevés, de l'ordre de 80 % de protéines et plus dans l'isolat sec.

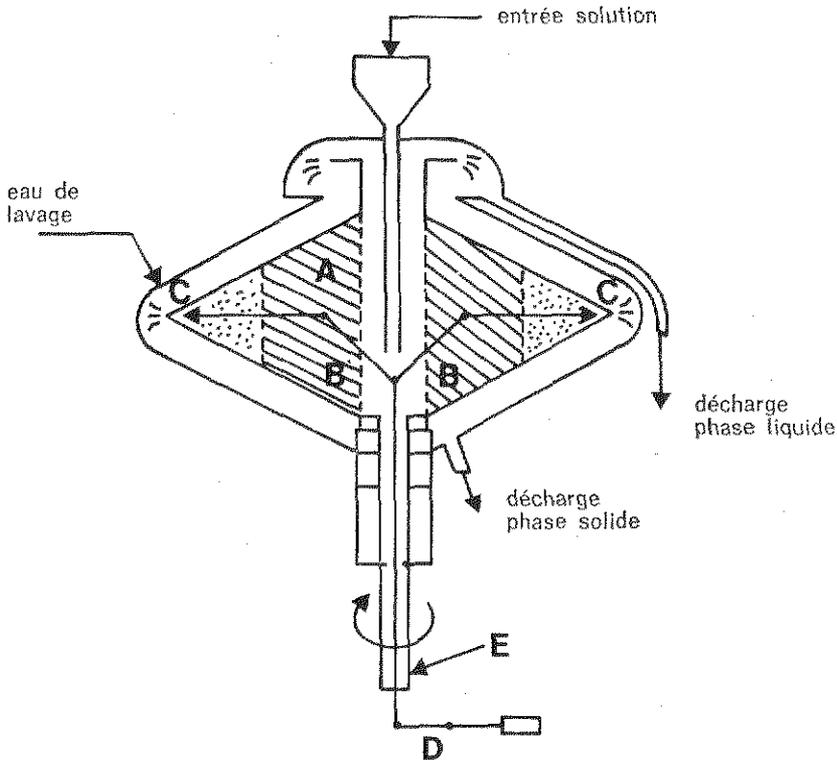
Inversement, des fractions les plus grossières, $> 0,25$, on extrait beaucoup moins de protéines (50 à 55% dans l'isolat sec).

Il semblerait donc que la teneur initiale en protéine des diverses fractions joue un rôle dans le rendement final, mais il paraît aussi probable que la « diffusion » des protéines de l'intérieur des particules vers la solution (alcaline) est facilitée quand les particules sont de petites dimensions. Il y aurait moins d'amidon, notamment pour s'opposer au départ des protéines.

Pour se rapprocher des conditions industrielles, les deux moutures correspondantes aux deux variétés de fèves, ont été traitées globalement en 3, 4, 5, 6 passages (recyclages), de façon à avoir des moutures de plus en plus fines (Voire tableau 6).

TABLEAU 6 - Les différentes fractions des farines en % après selon le nombre de moutures.

Tamisage		Variété Séville				Variété Émeraude			
N° de tamis	ouverture mm.	% des différentes fractions selon nombre de moutures							
		3	4	5	6	3	4	5	6
>140	<0,14	38,8	54,4	82,8	83,7	38,4	41,4	59,8	74,1
140	0,14	2,8	4,9	2,4	3,2	3,2	3,9	4,5	4,7
130	0,15	3,6	5,3	3,5	3,2	4,6	5	3,4	5,8
120	0,16	18	17,3	8,3	5,4	17,1	20,2	22,4	9
100	0,20	20,8	11,8	1,2	1,9	21,8	19,6	8,2	4,5
80	0,25	14,4	4,9	1,2	1,3	13,9	7,8	1,4	1,1
60	0,33	1,6	1,4	0,6	1,3	1	2,1	0,3	0,8



- A) Panier rotatif à section rhomboïde.
- B) Système de leviers pour régulariser la décharge de la phase solide.
- C) Orifices de sortie de la phase solide.
- D) Système de commande de la régulation de décharge de la phase solide.
- E) Axe de rotation.

Figure 6 — Coupe schématique du séparateur.

Nous avons pu remarquer (fig. 3 et 4), quelque soit la variété utilisée que la teneur en protéine de l'isolat sec, augmentait nettement avec le nombre de moutures (recyclages). Ainsi, pour l'eau distillée utilisée comme soluté après 6 moutures, stade pour lequel la proportion de particules d'un diamètre de 0,14 mm est de 80 % environ, l'isolat protéique eu atteint près de 90 en protéine. La même tendance est très nette, à des niveaux protéiques plus bas, avec tous les solutés essayés.

IV. PERSPECTIVES - CONCLUSION.

Des essais sur une échelle pilote sont envisagés, selon le diagramme fig. 5. Cela nécessitera notamment la résolution des problèmes suivants:

- a) Séparation de façon continue, de la solution eau-protéines solubilisées du résidu contenant essentiellement l'amidon et les fractions cellulosiques.
- b) Séparation de façon continue, des protéines précipitées durant l'opération d'acidification, de la solution mère, et lavage du précipité.
- c) Séchage des protéines concentrées.

En ce qui concerne le premier problème (a), étant donné la finesse exigée pour les particules de farines ($\leq 0,14$ mn) pour un rendement optimal, il apparaît très difficile d'utiliser un filtre pour séparer la solution protéique du résidu glucidique, celui-ci sera très vite obstrué par les particules.

Une centrifugation apparaît préférable. Cependant et cela est aussi valable pour le problème exposé en (b), une centrifugeuse classique ne serait pas utilisable industriellement, en continu, dans la mesure où la séparation des deux phases, (a) et (b) est assez lente. Une centrifugeuse à déchargement de la phase solide, qui permet d'accélérer la filtration est envisageable.

Un auteur Italien dans le cas de farine de soya (3), a utilisé un système de centrifugation particulier qui paraît bien adapté pour les protéines de légumes secs (fig. 6), dont le fonctionnement est le suivant:

— La suspension eau-protéines entre dans le panier rotatif et sous l'effet de la force centrifuge, se distribue dans ce dernier de manière que la phase solide se retrouve vers la périphérie du panier, tandis que la phase liquide, la plus légère, ira vers l'axe du panier rotatif jusqu'à rejoindre le niveau de décharge de la phase liquide.

— Le panier rotatif, en forme de losange, porte dans la partie périphérique à l'horizontale, une série d'orifices dont la section de décharge est réglée par des arêtes calibrées qui peuvent s'approcher ou s'éloigner à volonté, au moyen d'une commande mécanique.

— En réglant l'alimentation du panier et l'ouverture des orifices de décharge on peut établir un régime continu d'équilibre dans le panier, tel que la phase solide soit stratifiée et séparée de la phase liquide, comme cela est illustré sur la fig. 6. Dans ces conditions, on a une décharge continue des deux phases, les protéines semi-solides et la solution aqueuse précipitantes.

— En ce qui concerne le problème (c), il est nécessaire de sécher à température aussi basse que possible, une suspension très dense de protéines

constituée d'environ 3 parties d'eau pour une de protéines, le moyen économiquement et techniquement adéquat semble être le séchage à air chaud par atomisation.

Des essais d'extraction par précipitation au moyen de microorganismes (streptocoques lactiques, bacilles) pourraient être envisagés également à l'échelle du laboratoire. Cela a été essayé pour le soya (2) et a donné des isolats protéiques de haute qualité nutritive.

Des essais de séparation des protéines par voie sèche (turboséparation) sont également possibles et auraient l'avantage d'éliminer le séchage terminal. Ces protéines seraient très peu dénaturées.

Mais parallèlement à des essais sur de plus grandes quantités de fèves, avec différents appareillages pilotes, il apparaît indispensable d'approfondir l'étude biochimique des protéines extraites (électrophorèse, aminogrammes...); en relation avec les différents solutés utilisés et avec les diverses moutures.

L'influence des modes de séchage sur la valeur biochimique des protéines isolées reste également à effectuer.

Des essais biologiques sur rats, pour connaître la valeur alimentaire exacte de ces différents isolats sont aussi indispensables.

Les protéines ainsi obtenues devront être testées sur le plan des propriétés fonctionnelles (pouvoir émulsif, stabilisant, moussant, etc) et organoleptiques et essayées en mélange avec divers aliments d'origine céréalières notamment, pour les compléter (pain, biscuits, pâtes, couscous, aliments de sevrage...), ou seules après texturation, extrusion, etc.

— Les essais de base, concernant les paramètres optima de rendement de l'extraction sont actuellement en cours pour les variétés les plus intéressantes de pois-chiches et de lentilles.

En conclusion, comme on le voit, il ne s'agit que d'un travail de base, visant à optimiser le procédé à petite échelle en dénaturant le moins possible les protéines isolées.

Il est cependant certain que la production de protéines d'un haut degré de pureté, à partir de matières premières végétales courantes en Algérie, peu coûteuses, par un procédé relativement simple apparaît d'un grand intérêt pour l'Algérie et nous espérons que cette première ébauche intéressera les secteurs agro-alimentaires concernés et permettra, avec leurs aides de déboucher à terme, sur des applications.

Memoire reçu en Juin 1975

BIBLIOGRAPHIE

- BANU C. et NICULESCU D., 1972 - *Obtention d'un isolat protéique de soya par voie fermentaire*. Industria alimentara, 23, n. 6, pp. 308-311.
- BERNADINI E. et BERNADINI M., 1972 - *Les appareillages industriels pour la production de superconcentrés de protéines à partir des farines de graines*. Rivista Italiana delle sostanze grasse, Vol. XLIX, Août 72, pp. 383-386.
- CLARKE E. et BELLINGER G., 1967 - Sci. Food. Agric., 18, pag. 536.
- COURTS A., 1973 - *Recent Advances in protein production*. Process Biochemistry, Février 73, pp. 31-33.
- FLINK J. et CRISTIANSSEN I., 1973 - *The production of protein isolate from Vicia faba*. Lebensm. Wiss U Technol., vol. 6, n. 3, pp. 102-106.
- JENNING A. et WATT W., 1967 - Sci. Food. Agric., 18, p. 527.
- JENNING A., PUJTAI A., SYNGE R. et WATT W., 1968 - J. Sci. Food Agric. 19, p. 203.
- Protéin Advisory Group of the United Nations System*, 1973, Nutritional Improvement of Food legumes by Breeding, pp. 179-235 et 313-335.
- Universal protein establishment*, 1965. Extraction of starch and proteins from vegetable substances. Belgian Patent 656 880 (1965) et German Patent, 1911 107 (1969).
- WARING J., 1969 - J. Brit. Poult Sci, 10, p. 155.
- WILLIAMS L. D., 1972 - *Composition, properties and Chemistry of edible soy proteins*. Rivista Italiana delle Sostanze Grasse, Vol. XLIX, Juillet 72, pp. 330-337.
- ZAFRIRA N., 1971 - J. Sci. Food. Agric., 22, 252 (1971).