

COMPOSITION EN ACIDES AMINÉS DE QUELQUES ALIMENTS

R. PION, Catherine de BELSUNCE et G. FAUCONNEAU
avec la collaboration technique de Françoise LABONNE et J. D'ANGELO

*Laboratoire des Métabolismes,
Centre national de Recherches zootechniques, Jouy-en-Josas (Seine-et-Oise).*

La valeur nutritive des protéines dépend d'une façon assez étroite de leur composition en acides aminés. Aussi avons nous utilisé la méthode de chromatographie sur colonne de MOORE et STEIN (1958) pour étudier la composition des protéines d'un certain nombre d'aliments utilisés par le monogastrique, ainsi que de l'œuf entier, dont les protéines sont souvent prises comme référence. Les produits analysés sont d'une part des céréales, qui constituent la base des rations des monogastriques en tant qu'apport énergétique et contiennent une proportion non négligeable de protéines (8 à 15 % de la matière sèche) fournissant la moitié des protéines de la ration pour le porc et d'autre part, des aliments riches en protéines (tourteaux, graines de féverolle, farines de poisson, laits en poudre). Ne disposant pas encore d'une méthode satisfaisante pour le dosage du tryptophane dans les aliments, nous avons dû provisoirement ignorer cet acide aminé.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Échantillons.

- Orge *Rika* cultivée dans le Nord de la France. Pureté variétale 998 p. 1 000, récolte 1961.
 - Maïs *INRA 258*, récolte 1960, séché par ventilation à 30° C pouvoir de germination entièrement conservé.
 - Tourteau d'arachide fabriqué à partir de graines cultivées au Sénégal.
 - Tourteau de Soja cuit, de provenance américaine.
 - Féverolle.
 - Farine de hareng de Norvège.
 - Farine de poisson du Pérou.
 - Farine de poisson blanc de Saint-Pierre et Miquelon.
 - Lait en poudre « Spray » écrémé, fabriqué en septembre 1958 pasteurisé à 87° C, concentré à 45 % de matière sèche, évaporé à 54° C, séché dans une tour Niroatomizer à 92° C.
 - Œuf entier lyophilisé après homogénéisation au Waring blender. (œufs de 56-60 g, race *Rhode* × *Wyandotte*).
- Tous ces échantillons ont été conservés au froid (0-4°).

Méthodes.

— *Hydrolyse.* Les échantillons sont hydrolysés par HCl 6 N à reflux au bain d'huile (120° C). Le bain d'huile est réglé de manière à obtenir une ébullition très douce de l'acide. Les prises d'essai et les volumes utilisés figurent dans le tableau 1. On effectue pour chaque échantillon au moins un hydrolysats de 24 heures et un de 48 heures.

TABLEAU 1
Conditions d'analyse

	Prise d'essai		Volume
	mg	mg de M. A. (N × 6,25)	HCl — 6 N ml
Orge	400	37,5	600
Maïs	400	35,8	700
Tourteau d'arachide	200	111,1	500
Tourteau de Soja	200	90,6	500
Féverolle	400	114,5	700
Farine de hareng de Norvège	200	143,7	500
Farine de poisson du Pérou	200	128,5	500
Farine de poisson de St-Pierre-et-Miquelon	200	123,4	500
Lait en poudre Spray	200	71,0	500
Œuf entier lyophilisé	200	100,7	500

— *Concentration des hydrolysats.* L'acide est éliminé au moyen d'un évaporateur rotatif sous vide (source chaude 38-40° C, source froide —20° C). L'échantillon est évaporé jusqu'à consistance sirupeuse, puis repris par de l'eau et évaporé à nouveau. Quatre reprises successives sont nécessaires pour évaporer la majorité de l'acide chlorhydrique. Le résidu final est ensuite repris et amené à un volume par du tampon citrate pH 2,2, 0,2 M. Le pH de la solution ainsi obtenue est mesurée et ne doit pas être inférieur à 1,8.

— *Séparation.* Les acides aminés des hydrolysats ainsi préparés sont séparés par chromatographie sur colonne selon MOORE, SPACKMANN et STEIN (1958).

— *Dosage.* Les fractions de exactement environ 1, 1 ml sont dosées par la méthode de MOORE et STEIN (1954), en utilisant 1 ml de réactif pour chaque fraction.

— *Dosage de la cystine.* Elle est dosée sous forme d'acide cystéique par une modification de la méthode de SCHRAMM et al (De BELSUNCE et PION 1963).

RÉSULTATS (tableau 2)

Les valeurs retenues sont la moyenne des résultats obtenus après 24 heures et 48 heures d'hydrolyse, sauf pour certains acides aminés. Thréonine et sérine sont dosées dans l'hydrolysate de 24 heures, valine et isoleucine dans l'hydrolysate de 48 heures. Les résultats sont donnés sans extrapolation au temps zéro, ni application de facteur de correction pour pertes.

La méthionine a été dosée comme telle, ou en partie sous forme de méthionine sulfoxyde.

DISCUSSION

Les résultats obtenus ne sont valables que pour des échantillons comparables à ceux que nous avons utilisés. La composition en acides aminés d'un produit donné est susceptible de varier en fonction de divers facteurs. Toutefois il semble que les possibilités de variation sont en général limitées et que les écarts constatés entre certaines valeurs dans la littérature ne peuvent pas tous s'expliquer par des différences entre les produits analysés.

ALIMENTS	Orge RIKA	Mais INRA 258	Tourteau d'arachide	Tourteau de soja cuit	Féverolle	Farine de Hareng de Norvège	Farine de poisson du Pérou	Farine de poisson de St-Pierre- et-Miquelon	Lait en poudre Spray	Oeuf entier
M.S. %	90,61	89,8	94,73	91,05	88,85	90,74	92,92	93,44	95,04	96,1
M.A. % M.S.	10,34	9,96	38,65	49,76	32,21	79,20	69,14	66,02	35,50	50,37
Acide aspartique	5,9	6,1	11,1	11,3	9,3	8,25	9,1	9,4	7,65	9,9
Thréonine	3,4	3,4	2,6	4,1	3,35	4,3	4,4	4,3	4,2	4,8
Sérine	4,2	4,6	4,9	5,6	4,4	3,6	3,7	4,5	5,2	7,1
Acide glutamique	22,1	17,7	18,7	18,4	14,6	12,2	13,25	13,4	21,3	12,75
Proline	10,3	10,0	4,55	6,25	4,25	4,6	4,45	4,8	10,7	4,0
Glycine	4,2	3,5	6,05	4,5	4,2	6,3	5,9	7,0	2,0	3,2
Alanine	4,3	7,2	3,85	4,1	3,7	6,2	6,15	5,9	3,45	5,6
Valine	5,5	5,0	4,4	5,55	4,3	5,75	5,3	5,3	6,9	7,0
Méthionine	1,4	2,0	0,7	1,3	0,6	2,55	2,65	2,8	2,4	3,3
Isoleucine	3,7	3,8	3,4	5,15	3,85	4,4	4,95	4,5	5,6	5,5
Leucine	6,8	11,8	6,05	7,8	6,2	7,1	7,6	7,3	9,6	8,5
Tyrosine	3,1	4,05	3,8	3,7	3,0	2,75	3,15	3,2	4,55	3,8
Phénylalanine	4,6	4,4	4,5	4,9	3,25	3,7	4,0	4,0	4,35	4,85
Lysine	3,7	2,9	3,4	6,2	5,4	7,25	8,1	7,5	8,0	7,1
Histidine	2,2	2,7	2,2	2,55	2,5	2,2	2,7	2,2	2,8	2,6
Arginine	4,8	4,4	11,4	6,7	9,7	4,9	5,8	5,8	3,7	6,4
Cystine	2,7	2,4	1,5	1,6	1,3	0,9	0,9	1,15	0,95	2,8

Les principales possibilités de variation sont :

— la variété, les conditions culturales (fumure azotée en particulier), les modifications éventuelles au cours de la récolte, du séchage, de la conservation ou des traitements industriels, la présence plus ou moins importante d'enveloppes dans le cas des graines et tourteaux,

— l'espèce, l'âge ou le stade physiologique (présence éventuelle de laitances ou d'œufs), la proportion plus ou moins grande d'arêtes et de déchets de filetage, la réincorporation de solubles, l'influence des traitements thermiques et de la conservation dans le cas des farines de poisson. La composition des protéines d'œuf doit varier surtout en fonction de différences dans les proportions de blanc et de jaune, tandis que la composition en acides aminés du lait ne doit varier que dans de faibles proportions, sauf dans des cas pathologiques.

Compte tenu de ces possibilités de variations, nos résultats sont généralement en accord avec ceux des différents auteurs, dans la mesure où ceux-ci trouvent des résultats comparables entre eux.

Toutefois, certains écarts entre les résultats obtenus par les différents auteurs semblent liés aux méthodes employées. Les teneurs en thréonine, valine et surtout isoleucine, mesurées par dosage microbiologique sont parfois élevées. Les teneurs en thréonine et sérine sont généralement un peu faibles, car il y a des destructions au cours de l'hydrolyse. Toutefois, l'application d'un facteur de correction (extrapolation au temps zéro), risque d'introduire une erreur en sens inverse, car elle suppose en particulier une labilité identique des acides aminés libres ou engagés dans des liaisons peptidiques.

Les valeurs obtenues par chromatographie sur colonne dans le cas de la valine et de l'isoleucine risquent également d'être un peu faibles, mais pour une autre raison. Ces acides aminés sont difficiles à libérer totalement et leur dosage parfaitement quantitatif nécessiterait des hydrolyses prolongées au cours desquelles les autres acides aminés risqueraient de subir des destructions plus ou moins importantes.

Les erreurs par défaut, dues à une destruction de thréonine ou à une libération insuffisante de valine ou d'isoleucine sont beaucoup plus faibles que les écarts constatés avec certains résultats de dosage microbiologique.

Les teneurs en tyrosine et phénylalanine que nous avons obtenues sont parfois faibles (dans le cas de l'œuf en particulier). Nous n'avons pas trouvé d'explication à ce phénomène que nous n'avons pas observé dans le cas de l'utilisation d'un appareil automatique.

Nous examinerons en particulier, le cas des trois acides aminés les plus intéressants en nutrition, c'est-à-dire la lysine, la méthionine et la cystine.

Lysine.

Cet acide aminé est susceptible de varier dans les céréales en fonction de la nutrition azotée de la plante. En règle générale, la teneur en lysine de la graine (rapportée à l'azote) est d'autant plus faible que la teneur en azote est plus élevée, à condition que cette augmentation ne soit pas une augmentation passive, due à une production plus faible d'amidon, se traduisant par un rendement limité. La valeur trouvée dans le cas de l'orge semble correspondre sensiblement au maximum observé par les différents auteurs, celle trouvée pour le maïs correspondant sensiblement à la moyenne.

La même valeur avait été trouvée par dosage microbiologique dans ce laboratoire sur un maïs de la même variété cultivé en 1958 et ayant sensiblement la même teneur en matières azotées. Dans le cas de l'arachide et du soja, nos résultats sont en accord avec les résultats assez homogènes de la littérature. WILLIAMS (1955) a d'ailleurs trouvé des résultats très voisins pour cet acide aminé lorsqu'il a comparé méthode microbiologique et méthode chromatographique. Dans le cas du poisson, nos résultats sont un peu plus faibles que ceux généralement obtenus par dosage microbiologique pour des produits comparables. Pour le lait, notre résultat correspond sensiblement à la moyenne des résultats obtenus tant par dosage microbiologique que par dosage chromatographique. Dans le cas de l'œuf nos résultats sont voisins de ceux trouvés par d'autres auteurs par chromatographie, (BUSSON et al. 1959, KOFRANYI 1960), et par voie microbiologique (DUNN 1947, WILLIAMS 1955, EVANS et al. 1949) mais inférieurs à un certain nombre de résultats de dosages microbiologiques, (HORN et al. 1947), EDWARDS et al. 1946), SCHUPHAN 1956). La moyenne des résultats obtenus lors de l'essai coopératif de la RUTGERS University (méthode microbiologique et chimique) était au contraire beaucoup plus faible.

Méthionine.

Une des difficultés du dosage de la méthionine réside dans son aptitude à s'oxyder et à se transformer en méthionine sulfoxyde, parfois même en méthionine sulfone, au cours du stockage des échantillons et des traitements analytiques (hydrolyse, évaporation sous vide de l'acide chlorhydrique).

En chromatographie sur colonne, la méthionine se trouve alors divisée en méthionine et méthionine sulfoxyde, et la précision déjà plus faible que pour la plupart des autres acides aminés à cause de sa faible teneur dans les protéines, se trouve diminuée d'autant. Certains auteurs majorent de 20 % pour perte la valeur obtenue en méthionine sulfoxyde.

La validité d'une telle correction est difficile à démontrer.

Dans le cas des dosages microbiologiques, les résultats obtenus pour un produit dont la méthionine aura été partiellement oxydée seront différents selon le microorganisme utilisé : *Leuconostoc mesenteroides* ne dose que la méthionine, *Lactobacillus arabinosus* dose à la fois la méthionine et la méthionine sulfoxyde (THULLIER et al 1954).

En outre, cette oxydation peut être réversible, en particulier dans le milieu réducteur utilisé pour l'hydrolyse, et il est impossible de déterminer la proportion de produits d'oxydation que la méthionine présente dans l'échantillon (NJAA 1962). De plus, l'utilisation nutritionnelle de ces corps est mal connue.

Compte tenu de ces difficultés, les résultats obtenus pour les céréales par les différents auteurs sont relativement homogènes; et nos résultats sont en accord avec eux. Dans le cas du maïs, nous avons trouvé par dosage microbiologique la même valeur pour la même variété. Pour les tourteaux, nos résultats sont en accord avec ceux de la plupart des auteurs. Toutefois, certains auteurs trouvent des résultats plus élevés, tant par dosage microbiologique que par chromatographie. Dans le cas du soja au contraire, un certain nombre d'auteurs s'écartent d'un lot assez homogène en trouvant des résultats faibles; c'est le cas en particulier de WILLIAMS (1955) qui trouve des valeurs comparables par les méthodes microbiologiques et chromatographiques.

Il n'y a pas de problème particulier dans le cas des farines de poisson. La valeur obtenue pour la farine de hareng est très voisine de celle trouvée par BOGE (1960) (2,49) pour le même produit.

Pour le lait notre résultat semble moyen : il n'y a pas d'écart systématique entre dosage chromatographique et microbiologique. Toutefois, il faut noter que WILLIAMS (1955) trouve pour le même lait 2,03 à 2,94 suivant le procédé d'hydrolyse utilisé. Les deux méthodes donnent également des résultats similaires dans le cas de l'œuf.

Cystine.

Le dosage de la cystine a posé des problèmes particuliers tant dans le cas des méthodes microbiologiques que des méthodes chromatographiques. Le dosage de cet acide aminé au moyen de *Leuconostoc mesenteroides* exige des conditions de milieu assez artificielles, et en particulier l'absence d'acide aspartique et d'acide glutamique qui gênent la croissance.

D'autre part, la cystine se détruit plus ou moins complètement au cours de l'hydrolyse même de courte durée, ou au moyen d'acide peu concentré.

Il est nécessaire pour doser cet acide aminé par chromatographie sur colonne, soit de le protéger des destructions au cours de l'hydrolyse totale qui doit précéder le dosage, soit de le transformer quantitativement en un produit peu labile. C'est cette solution qu'ont adoptée SCHRAMM et al (1954) en transformant au sein même de la protéine, la cystine en acide cystéique.

Ces difficultés expliquent que de nombreux auteurs n'aient pas dosé la cystine et qu'il y ait des écarts importants entre les divers résultats. Pour notre part, nous avons pu constater une différence très importante entre les résultats obtenus par chromatographie et par dosage microbiologique dans le cas du maïs INRA 258, 2,4 % par chromatographie, 1,2 à 1,3 par dosage microbiologique. Cet écart peut être dû à la quantité importante d'acide glutamique présente dans les échantillons. Des écarts importants entre les deux types de méthodes ont également été constatés par EVANS et al (1960), aussi bien par excès que par défaut. Ces auteurs ont obtenus des résultats très variables selon le temps d'hydrolyse utilisé, les temps très courts (30 minutes) semblant donner des résultats trop élevés, qu'ils expliquent par une action facteur de croissance de certains peptides résultant de l'hydrolyse incomplète. Les chiffres trop faibles obtenus à la suite d'hydrolyses plus longues sont probablement dus à des pertes au cours de l'hydrolyse; il est difficile de savoir quel est le temps d'hydrolyse procurant la vraie valeur.

Dans le cas des farines de poisson, au contraire, les résultats de dosage microbiologique (BOGE 1960, EVANS et al 1960) semblent élevés.

Les différences sont moins systématiques et moins marquées pour les autres types de produits.

Valeur nutritive de ces différents aliments.

La valeur nutritive des protéines dépend essentiellement des quantités absolues et des proportions des différents acides aminés indispensables contenus dans celles-ci. Le total des acides aminés indispensables et semi-indispensables ainsi que leurs proportions (cf. tableau 3) permettent de comparer la valeur nutritive des divers aliments

TABLEAU 3

Répartition des acides aminés indispensables et semi-indispensables
(% de leur somme sans leucine).

ALIMENTS	Orge RIKA	Mais INRA 258	Tourteau d'arachide	Tourteau de soja cuit	Féverolle	Farine de Hareng de Norvège	Farine de poisson du Pérou	Farine de poisson de St-Pierre- et Miquelon	Lait en poudre Spray	Oeuf entier
Thréonine	9,7	9,7	6,9	9,8	9,0	11,1	10,5	10,6	9,7	10,0
Valine	15,7	14,3	11,7	13,3	11,5	14,85	12,6	13,0	15,9	14,5
Méthionine	4,0	5,7	1,85	3,1	1,6	6,6	6,3	6,9	5,5	6,85
Cystine	7,7	6,9	4,0	3,8	3,5	2,3	2,1	2,8	2,2	5,8
Isoleucine	10,5	10,8	9,0	12,3	10,3	11,4	11,8	11,0	12,9	11,4
Tyrosine	8,8	11,6	10,0	8,9	8,1	7,1	7,5	7,85	10,5	7,9
Phénylalanine	13,1	12,6	11,9	11,7	8,7	9,6	9,5	9,8	10,0	10,1
Lysine	10,5	8,3	8,0	14,85	14,5	18,7	19,3	18,4	18,4	14,7
Histidine	6,3	7,7	5,8	6,1	6,7	5,7	6,4	5,4	6,4	5,4
Arginine	13,7	12,6	30,1	16,05	26,05	12,7	13,8	14,25	8,5	13,3
Leucine Isoleucine $\times 100$	184	310	178	151	161	161	153	169	171	154
Somme des (acides aminés indispensables et semi-indispensables - Leucine)	35,1	35,05	37,9	41,75	37,25	38,7	41,95	40,75	43,45	48,15
Somme des (acides aminés indispensables et semi-indispensables sans Leucine Somme des (acides aminés indis- pensables et semi-indispensables sans Leucine) de l'œuf	72,9	72,8	78,7	86,7	77,4	80,4	87,1	84,6	90,2	100

analysés. La leucine a été exclue dans ce mode de calcul, car elle existe en quantité toujours suffisante dans les protéines alimentaires considérées, et sa présence en quantité excessive risque de diminuer l'utilisation de l'isoleucine.

Les protéines des farines de poisson ont une composition en acides aminés essentiels voisine de celle de l'œuf avec quelques différences : excès de lysine et déficience en acides aminés soufrés.

Les protéines de tourteaux de soja paraissent relativement bien équilibrées, elles manquent cependant d'acides aminés soufrés.

Les protéines d'arachide sont pauvres en acides aminés indispensables et très déséquilibrées : elles sont en effet déficientes en acides aminés soufrés, en lysine, en thréonine et en isoleucine.

Quant aux protéines des céréales, les quantités d'acides aminés essentiels sont faibles, 35 % au lieu de 41 % dans les protéines de poisson et leur proportions sont déséquilibrées : elles sont surtout déficientes en lysine et présentent un fort excès de leucine, en particulier dans le cas du maïs. De plus, les protéines d'orge sont légèrement déficientes en acides aminés soufrés mais leur déficience en lysine est moins accusée que celle du maïs.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Cooperative determinations of the amino-acid content, and of the nutritive value of six selected protein food sources.* Rutgers University. Bureau of biological research 1950. New Brunswick.
- BELSUNCE C. de, PION R., 1963. Dosage de la cystine dans les aliments. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.* *Sous presse.*
- BOGE G., 1960. Amino-acid composition of herring (*Clupea harengus*) and herring meal. Destruction of amino-acids during processing. *J. Sci. Fd. Agric.*, **11**, 362-365.
- BUSSON F., CARBIENER R., BERGERET B., 1959. Étude de la fraction protidique de *Vigna Unguiculata* Walp. *Qual. Plant. Materiae vegetabiles*, **6**, 11-15.
- DUNN M. S., 1947. Cité par KEMMERER A. R., ACOSTA R., 1949. *J. Nutrition*, **38**, 527-533.
- EDWARDS L. E. et al., 1946. Biological value of proteins in relation to the essential amino-acids which they contain. IV. The analysis of fifteen protein feeds for the ten essential. *J. Nutrition*, **32**, 597-612.
- EVANS R. J., DAVIDSON J. A., BANDEMER S. L., BUTTS H. A., 1949. The amino-acid content of fresh and stored shell eggs. II. Arginine, histidine, lysine, methionine, cystine, tyrosine, tryptophane, phenylalanine and proline. *Poultry Sci.*, **28**, 697-702.
- EVANS R. J., BANDEMER S. L., BAUER D. H., 1960. Cystine content of proteins, foods and feeds. Comparison of chromatography on a sulfonated polystyrene resin and microbiological methods of determination. *J. Agric. Food. Chem.*, **8**, 383-386.
- HORN M. J., JONES D. B., BLUM A. E., 1947. Microbiological determination of lysine in protein and foods. *J. Biol. Chem.*, **169**, 71-76.
- KOPRANYI E., MULLER-WECKER H., 1960. Zur Bestimmung der biologischen Wertigkeit von Nahrungsproteinen, IV. Der Vergleich der Wertigkeiten von Milch-, Roggen- und Weizeneiweiß mit vollei und ihre Berechenbarkeit aus der Bausteinanalyse. *Hoppe-Seyl. Z.*, **320**, 233-240.
- MOORE S., SPACKMAN D. H., STEIN W. H., 1958. Chromatography of amino-acids on sulfonated polystyrene resins. An improved system. *Analyt. Chem.*, **30**, 1185-1190.
- MOORE S., STEIN W. H., 1954. A modified reagent for the photometric determination of amino-acids and related compounds. *J. biol. Chem.*, **211**, 907-913.
- NJAA L. R., 1962. Some problems related to detection of methionine sulphoxide in protein hydrolysates. *Acta Chim. Scand.*, **16**, 1359-1362.
- SCHRAM E., MOORE S., BIGWOOD E. J., 1954. Chromatographic determination of cystine as cysteic acid. *Biochem. J.*, **57**, 33-37.
- SCHUPHAN W., 1956, cité par ADRIAN J., 1960. Amino-acides, peptides, protéines. *A. E. C.*, **4**, 121-140.
- THUILLIER Y., FAUCONNEAU G., de PRAILAUNE S., CHEVILLARD L., ROCHE J., 1954. Dosage de la méthionine dans les produits végétaux employés dans l'alimentation animale. *Ann. Zootech.*, **1**, 29-45.
- WILLIAMS H. H., 1955. Essential amino-acid content of animal feeds. Cornell Univ., Agric. Exper. Stat., Memoir 337.