

DETERMINATION DE LA COMPOSITION GLUCIDIQUE

DE LA GRAINE DE COLZA (Brassica napus)

ET DES PRODUITS DERIVES

M. - T. Tollier et A. Guilbot

Le tourteau de colza obtenu après broyage et déshuilage de la graine, est de plus en plus utilisé en alimentation animale, en particulier pour celle des ruminants. Son taux d'incorporation dans les rations des porcs et volailles reste encore assez limité par le fait qu'il convient des substances défavorables à l'appétance et à la croissance de ces animaux. Jusqu'à présent, les recherches relatives à la composition du tourteau de colza ont surtout été orientées vers la connaissance des fractions protéiques (LO et HILL, 1972; Van ETTEN et al., 1965; KODAGODA et al., 1973), des lipides résiduels et des glucosinolates (ETTEN v. et al., 1966; GASSET, 1967; DURKEE et HARBORNE, 1973). Par contre peu de travaux existent concernant la composition glucidique du colza (SIDDIQUI et al., 1973) et ses répercussions éventuelles sur sa valeur nutritionnelle.

L'objet de ce travail a été de préciser des méthodes d'extraction et de dosage chimique permettant de déterminer, avec un maximum de précision, la quantité de glucides présents dans le tourteau. Par ailleurs, des méthodes chromatographiques sur couche mince et sur gel de polyacrylamide sont adaptées pour identifier les principaux constituants.

Matériel et méthodes

L'étude a été effectuée sur un lot de colza (*Brassica napus*) de variété bien référencée, le colza Sarepta. Afin de mieux suivre la répartition des différents constituants entre les diverses parties morphologiques de la graine, pellicule et amande + germe, nous avons été amenés à procéder à un dépelliculage manuel.

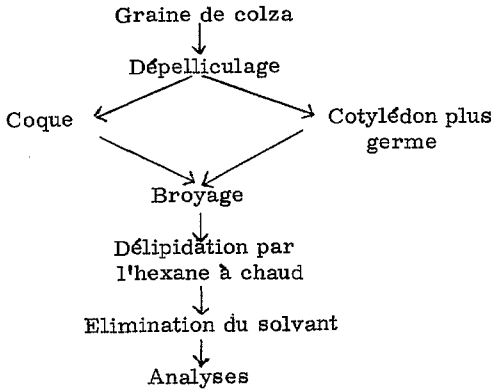
La Fig. 1 schématise le mode de préparation des différentes fractions de la graine de colza.

Les produits ainsi obtenus, pellicule, amande plus germe, ainsi que la graine entière ont ensuite été broyés puis délipidés à l'hexane chaud. Après élimination du solvant, ils sont finalement analysés.

Les teneurs en eau, en matières minérales, en matières protéiques et en lipides résiduels ont été déterminées selon les méthodes de référence mentionnées dans "Méthodes analytiques des Céréales" du CNERNA.

L'amidon a été dosé par la méthode à l'amyloglucosidase (THIVEND et al., 1972) et les pentosanes totaux par la méthode à l'acétate d'aniline.

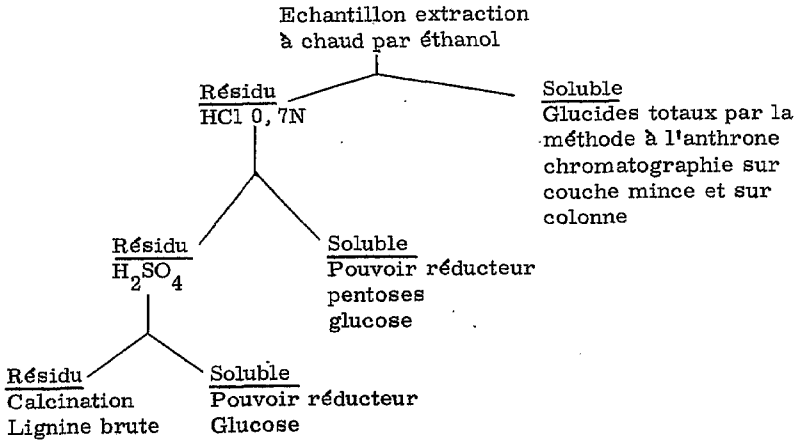
Figure 1: Préparation des échantillons



Les hemicelluloses, la cellulose et la lignine ont été dosées globalement par les méthodes utilisant les détergents neutres ou acides selon les méthodes de VAN SOEST (1963) et VAN SOEST et WINE, (1967) ou par la méthode à l'acide formique (TOLLIER et al., Résultats non publiés).

Le principe et le processus opératoire de ces différentes techniques sont rassemblés dans la Fig. 2.

Figure 2: Schema d'analyse



La fraction glucidique de faible poids moléculaire, c'est-à-dire d'un \overline{DP} inférieur à 12-14 unités glucose, a été obtenue par des extractions répétées avec de l'éthanol à 80 % bouillant. Les glucides ainsi extraits ont été déterminés par la méthode à l'antrone sulfurique (LOEWUS, 1952; TOLLIER, 1965) et leur identification a été effectuée par chromatographie sur couche mince (de STEFANIS et PONTE, 1968). De plus, les principaux constituants glucidiques de ces extraits ont été fractionnés par tamisage moléculaire sur une colonne de polyacrylamide (Biogel P₂) (JOHN et al., 1969) et dosés automatiquement dans l'effluent par la méthode à l'orcinol-sulfurique. Le pourcentage des glucides est calculé en se référant à des gammes d'étalonnage établies, dans les mêmes conditions, avec des sucres purs (TOLLIER, Résultats non publiés a).

Le résidu sec de cette extraction alcoolique a été soumis à des hydrolyses acides successives selon SALÓ (1965), procédé permettant d'étudier les polyholsides de constitution (Fig. 3). La première hydrolyse est effectuée en milieu acide chlorhydrique 0,7 pendant 5h au bain-marie bouillant et dans ces conditions, ne concerne que les hemicelluloses. Sur l'hydrolysate

Figure 3: Méthodes de dosage global des hemicelluloses, celluloses et lignine

Méthodes	Substance dosée	Réactifs	Protocole opératoire
Weende (ISO - AFNOR)	Cellulose	H ₂ SO ₄ 0,25 N OHNa 0,31 N	0,5 à 3g échantillon + 100 ml H ₂ SO ₄ ébullition 1/2h filtration, reprendre résidu par NaOH ébullition 1/2h filtration, séchage, calcination
Acide formique	Cellulose lignine	HCOOH 80 %	1g échantillon + 50 ml HCOOH 80 % - B. M. 100°75' filtration, séchage, calcination
Van Soest détergents neutres (1967)	Hemicelluloses + cellulose + lignine	Laurylsulfate de Na, EDTA sel disodique, borate de sodium, Po ₄ H Na ₂ , 2 éthoxyéthanol	1g + 100 ml de réactif, ébullition, 1h filtration, séchage, calcination
Van Soest détergents acides (1963)	Cellulose + lignine	Cetyltriméthylammonium bromure en milieu H ₂ SO ₄	1g + 100 ml réactif, ébullition 1h, filtration, séchage, calcination

neutralisé à l'aide de résine Duolite A 102D sont déterminés:

- les glucides réducteurs totaux par la méthode de NELSON (1944); dans les conditions précises de cette méthode, c'est-à-dire un chauffage au

bain-marie bouillant de 30 minutes, les différences observées avec le glucose, xylose, arabinose sont négligeables (TOLLIER, Résultats non publiés b);

- les pentoses par la méthode à l'acétate d'aniline (CERNING et GUILBOT, 1973);
- le glucose par la méthode à la glucose-oxydase (LLOYD et WHELAN, 1969).

Au résidu sec obtenu après le précédent traitement d'hydrolyse sont ajoutés 5 cm³ de H₂SO₄ à 72 % que l'on laisse agir à la température ordinaire pendant 5h en agitant de temps en temps; après cette période qui permet un début de gonflement des polyholosides, sont ajoutés 170 cm³ d'eau et l'hydrolyse est poursuivie par chauffage à reflux pendant 4h. La composition quantitative de l'hydrolysats neutralisé est déterminée comme précédemment; le résidu final séché, dont on a défalqué les cendres appréciées par calcination, représente la lignine brute. Parallèlement aux déterminations quantitatives, les différents constituants libérés au cours de ces hydrolyses sont identifiés par chromatographie sur couche mince (DE STEFANIS et PONTE, 1968) et sur colonne de résine échangeuse d'ions (KESLER, 1967).

Résultats obtenus

La figure 4 représente la composition chimique globale des coques de l'amande plus germe et de la graine entière du colza Sarepta. La quantité

Figure 4: Composition chimique globale du tourteau de colza Sarepta et de ses constituants: coques et cotylédon plus germe résultats exprimés % de substance sèche

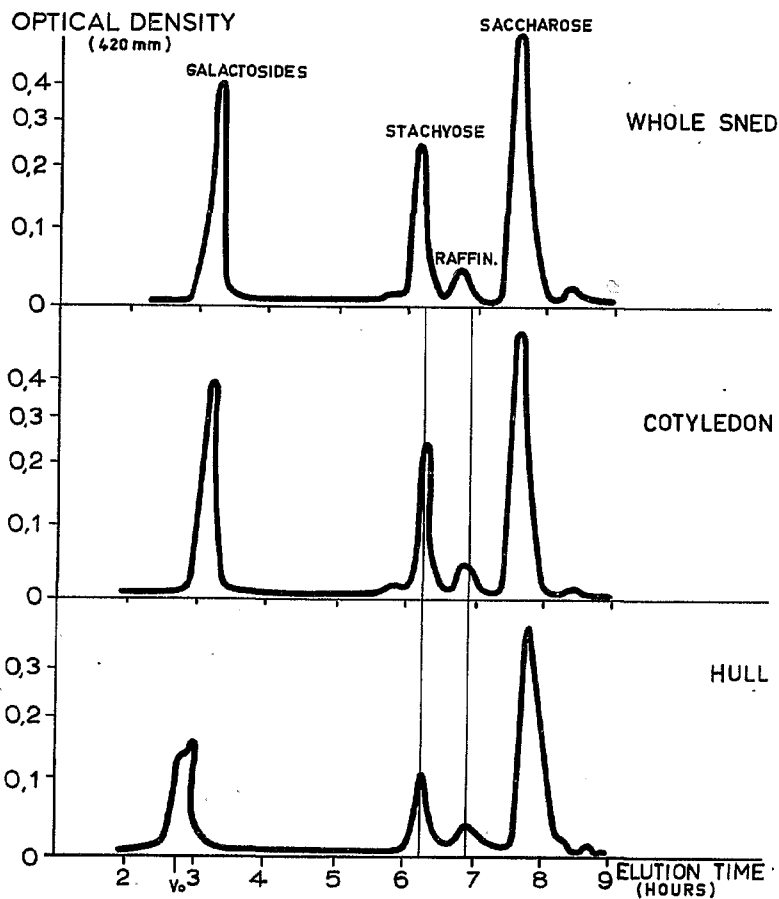
	Coques	Cotylédon + germe	Graine entière
Matières minérales	4,9	7,8	7,0
Matières protéiques N x 6,25	16,4	55,1	43,7
Lipides résiduels	0,3	0,6	1,3
Pentosanes	14,5	9,1	11,6
Amidon	0,2	1,1	1,0
Cellulose	32,4	5,0	12,7
Lignine	27,7	4,5	7,7
Glucides	3,8	14,6	12,6
Total	100,2	97,8	99,0

de glucides de la graine entière n'est pas négligeable; 12,6 % sont constitués de petites molécules solubles dans l'alcool à 80° GL. La chromatographie sur couche mince montre qu'ils sont surtout composés de saccharose, de raffinose, de stachyose et autres α-galactosides. Des quantités très faibles de glucose et d'autres substances non identifiées sont

également présentes. De plus, elle contient 11,6 % de pentosanes, 12,7 % de cellulose et 7,7 % de lignine.

La coque est très riche en glucides totaux mais ceux-ci sont surtout des polyholosides de constitution, telles cellulose et lignine, et n'ont de ce fait qu'une valeur de ballast sur le plan nutritionnel. L'amidon est quasi inexistant quelle que soit la partie de graine. Les bilans obtenus tant avec la graine entière qu'avec ses constituants, coque et amande, sont assez satisfaisants surtout si l'on tient compte du fait que certains dosage tels celui des glucides de faible poids moléculaire et des pentosanes, sont exprimés arbitrairement, respectivement en glucose et en xylose.

Figure 5:



Le profil des diagrammes d'élu-tion des extraits éthanolosolubles obtenus après tamisage moléculaire sur une colonne de Biogel et dosage à l'auto-analyseur Technicon sont présentés sur la figure 5, pour la coque, l'aman-de et la graine entière. Les résultats confirment ceux obtenus par chro-matographie sur couche mince. Les principaux constituants identifiés sont le saccharose, le raffinose et le stachyose. Les oses comme le glu-cose ou autres osides de faible DP non identifiés sont à l'état de traces. Dans tous les chromatogrammes, on constate l'existence d'une quantité non négligeable de glucides de poids moléculaire élevé se situant au volu-me mort de la colonne. Ceux-ci sont sans doute constitués de galactosides du saccharose d'un degré de polymérisation voisin d'une quinzaine d'uni-tés. Actuellement, une étude plus poussée de cette fraction est en cours.

Dans le tableau 6 sont rassemblées les quantités de glucides obtenues après séparation sur la colonne de Biogel et quantification des pics du dia-gramme d'élu-tion. Ces résultats sont exprimés en % de substance sèche et sont calculés à partir des courbes d'étalonnage obtenues après chro-matographie d'un mélange synthétique. Seules les substances correspondant aux alpha-galactosides sont déterminées par la différence entre les glu-cides totaux et la somme correspondant aux teneurs en saccharose, raffi-nose, stachyose. Le saccharose ainsi que ses galactosides supérieurs, raffinose et stachyose, sont importants à considérer au niveau de la nu-trition animale si l'on considère le phénomène de flatulence qu'ils peuvent provoquer.

Figure 6: Quantité de glucides éthanolosolubles déterminés par chro-matographie sur colonne biogel (résultats exprimés % substance sèche)

	α -galac-tosides	Stachy-ose	Raffi-nose	Saccha-rose	Glucose et autres
Coque Sarepta	1,08	0,46	0,20	2,06	-
Cotylédon Sarepta	3,16	2,81	-	8,63	-
Graine entière	(6,66	(1,41	(0,33	(4,25	-
Sarepta	(6,40	(1,46	(0,33	(4,46	-

Le tableau 7 illustre les résultats obtenus au cours des hydrolyses acides successives effectuées après extraction alcoolique; ceux-ci sont expri-més en % de matière sèche initiale. Les quantités d'hémicelluloses de 13,90 % pour les coques, de 9,20 % pour l'aman-de plus germe et de 11,25 % pour la graine entière, sont exprimés arbitrairement en glucose à partir du pouvoir réducteur déterminé par la méthode de NELSON. Le dosage spécifique des pentoses montre qu'ils constituent plus de la moi-tié de cette fraction. D'ailleurs, la chromatographie sur couche mince de cet extrait acido-soluble met en évidence l'arabinose et le xylose dans les proportions 2/1 mais également des hexoses constitués de galactose, mannose et de traces de glucose et des méthyloses; rhamnose et probable-ment fucose.

Figure 7: Résultats obtenus par hydrolyses acides successives, exprimés % de substance sèche (colza Sarepta)

	Hydrolyse (HCl 0,7 N)			Hydrolyse (H ₂ SO ₄)		Lignine brute
	Total	Pentoses	Glucoses	Total	Glucose	
Coques	13,90	8,45	0,77	16,1	13,45	31,2
Cotylédon + germe	9,20	6,55	0,80	6,25	4,75	3,43
Graine entière	11,25	5,80	0,74	10,70	9,5	7,75

Des essais sont actuellement en cours pour séparer ces différents sucres par chromatographie échangeuse d'ions et les doser à l'auto-analyseur Technicon.

Les pourcentages de glucides réducteurs exprimés en glucose obtenus après une nouvelle hydrolyse sulfurique, et qui, selon les conditions opératoire, permet pratiquement d'hydrolyser complètement la cellulose, sont de 16,1 - 6,25 et 10,70 % respectivement dans le cas de la coque, de l'amande et de la graine entière. Le dosage spécifique du glucose par voie enzymatique indique que ce dernier est le principal constituant de cette fraction. La chromatographie sur couche mince explique la différence observée entre la quantité totale de glucides réducteurs solubilisée et la quantité de glucose dosée. En effet, on observe:

- d'une part, la présence de glucides au niveau des pentosanes provenant sans doute de pentosanes liés à la cellulose;
- d'autre part, des substances au niveau des di et triholosides en faible quantité. Par contrentation et séparation sur colonne, nous envisageons d'identifier ces différents produits de manière plus précise.

Les teneurs en lignine brute, résidu obtenu après cette deuxième hydrolyse acide, sont tout à fait comparables à celles déterminées par la méthode VAN SOEST.

Cette méthode d'hydrolyse acides d'application un peu longue est toutefois très intéressante car en plus des valeurs globales en hémicellulose, cellulose et lignine, elle permet de connaître la composition chimique de ces différents polyholosides, ceci en utilisant des méthodes chromatographiques de partage et d'échange d'ions et des dosages chimiques spécifiques.

Le tableau 7 est relatif aux valeurs obtenues par les différentes méthodes de dosage des hémicelluloses, cellulose et lignine sur variété Sarepta (graines entières). Malgré la diversité que présentent ces méthodes tant par leur définition que par leur principe, on constate que les résultats obtenus sont finalement du même ordre de grandeur. A ce stade, il convient donc de faire un choix et de ne retenir que celle dont l'application est la plus simple, tout en donnant des chiffres représentatifs et reproductibles.

En conclusion, ce travail qui peut être considéré comme préliminaire, nous a permis de mettre au point ou d'adapter des méthodes d'extraction et de dosage des glucides à ce matériel assez complexe qu'est le tourteau de colza. Ces premiers résultats donnent un aperçu de la composition glucidique d'une variété de colza et de la répartition des différents constituants entre la pellicule et l'amande plus germe.

L'étude qui se poursuit a pour objectif:

- d'identifier avec plus de précision certaines substances contenues soit dans les extraits éthanoliques, soit dans les extraits acido-solubles;
- de suivre l'évolution des différentes fractions glucidiques en fonction du caractère génétique des colzas ou en fonction de divers traitements technologiques subis par le colza.

Par ailleurs, nous nous proposons de choisir parmi les méthodes d'extraction et de dosage mises en oeuvre jusqu'à présent, ou qui peuvent en découler, celles qui pourront, tout en étant assez spécifiques, être utilisables en série au niveau de la sélection ou du contrôle technologiques.

Figure 8: Dosage des hemicellulose - cellulose - lignine (résultats exprimés p.100 de substance sèche)

Méthodes	Echantillons	MAJOR	SAREPTA	PRIMOR
Weende (cellulose)			12,7	
Acide formique (cellulose + lignine)		19,1	17,2	
<u>Van Soest D. Acides</u> (cellulose + lignine)		23,25	20,2	21,20
<u>Van Soest D. Neutres</u> (H + C + L)		26,4	24,8	25,5
Van Soest Lignine		8,5	9,0	8,10

Références Bibliographiques

1. CERNING, J. et A. GUILBOT (1973): A Specific Method for the Determination of Pentosans in cereals and cereal products. *Cereal Chemistry* 50, 2, 176-184
2. DURKEE, A. B. et J. B. HARBORNE (1973): Flavonol glucosides in Brassica and Sinapis. *Phytochemistry* 12, 5, 1085-1091
3. ETTEN, C. H. van, M. E. DAXENBICHLER, J. E. PETERS et I. A. WOLFF (1965): Seed meal from *Crambe abyssinica*. *J. Agr. Food. Chem.* 13, 24-27

4. ETTEN, C. H. van, M. E. DAXENBICHLER, J. E. PETERS et H. L. TOOKEY (1966): Variation in enzymatic degradation products from the major thioglucosides in *Crambe abyssinica* and *Brassica napus* seed meals.
J. Agr. Food. Chem. 14, 4, 426-430
5. GASSET, J. (1967): Les composés sourfrés du tourteau de colza. I. Mise au point sur leur origine et leur dosage.
Etudes et Recherches 10, 593-599
6. JOHN, M., G. TRENEL et H. DELLWEG (1969): Quantitative chromatography of homologous glucose oligomers and other saccharides using polyacrylamide gel.
J. Chromatogr. 42, 476-484
7. KESLER, R. D. (1967): Rapid quantitative anion-exchange chromatography of carbohydrates.
Anal. Chem. 39, 1416
8. KODAGODA, L. P., S. NAKAI et W. D. POWRIE (1973): Some functional properties of rapeseed protein isolates and concentrates.
Can. Inst. of Food Technol. J. 6, 4, 266-270
9. LLOYD, J. B. et W. J. WHELAN (1969): An improved method for enzymic determination of glucose in the presence of maltose.
Anal. Biochem. 30, 467
10. LO, M. T. et D. C. HILL (1972): Composition of the aqueous extracts of rapeseed meals.
J. Sci. Food Agric. 23, 823-830
11. LOEWUS, F. A. (1952): Improvement in anthrone method for determination of carbohydrates.
Anal. Chem. 24, 220-232
12. NELSON, N. (1944): A photometric adaption of the Somogyi method for the determination of glucose.
J. Biol. Chem. 153, 375
13. SALO, M. -L. (1965): Determination of carbohydrates fractions in animal foods and faeces. Suomen Maataloustututllisen Seuran Julkaisuja.
105. Acta Agralia Fennica
14. SIDDIQUI, I. R., P. J. WOOD et G. KHANZADA (1973): Low molecular weight carbohydrates from rapeseed (*Brassica campestris*) meal.
J. Sci. Food Agric. 24, 1427-1435
15. SOEST, P. J. van (1963): Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. II. A rapid method for the determination of fiber and lignin.
J. A. O. A. C. 46, 829-835

16. SOEST, P. J. van et R. H. WINE (1967): Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV. Determination of plant cell-wall constituents.
J. A. O. A. C. 50, 50-55
17. STEFANIS, V. A. de et J. G. PONTE (1968): Separation of sugars by thin-layer chromatography.
J. Chromatogr. 34, 116
18. THIVEND, P., C. MERCIER et A. GUILBOT (1972): Determination of starch with glucoamylase. VI. General carbohydrate methods. In: Methods in carbohydrate chemistry. Ed. by R. L. Whistler and J. N. Bemiller, Ac. Press, N. Y.
19. TOLLIER, M. Th., C. AUSSEL et A. GUILBOT (Résultats non publiés)
20. TOLLIER, M. Th. (1965): Contribution à l'étude du rayonnement Y sur les caractères physicochimiques de l'amidon et sa sensibilité aux amylases.
Thèse d'Ingénieur du CNAM, Paris
21. TOLLIER, M. Th. (Résultats non publiés) a. b.