

DOSAGE DES GLUCOSINOLATES DANS LES GRAINES DE COLZA

WATHELET J-P, MARLIER M, FAUCONNIER , LOGNAY G, SEVERIN M
DEROANNE C, WATHELET B, DARDENNE G, CORS F et A. FALISSE.

Faculté des Sciences agronomiques de l'Etat,
B-5800 Gembloux.

INTRODUCTION

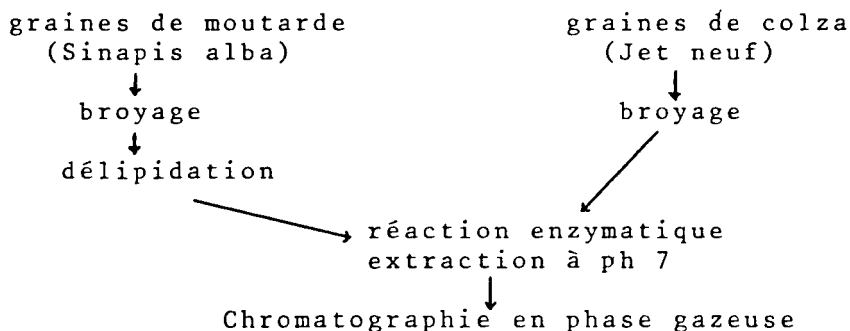
Plusieurs recherches sont actuellement effectuées pour implanter en Europe des variétés de colza à faible teneur en glucosinolates. Par dégradation enzymatique, ces derniers peuvent libérer plusieurs isothiocyanates (ITC) ou de la vinyl 5 oxazolidine thione (VOT). Les isothiocyanates irriteraient les muqueuses tandis que la vinyl oxazolidine thione aurait des effets antithyroïdiens chez les animaux à croissance rapide comme le porc et la volaille.

Notre exposé a pour but de relater les travaux effectués pour affiner la méthode de dosage des glucosinolates à partir des graines de colza en mettant en évidence les problèmes rencontrés.

METHODE ET DISCUSSION

Toutes nos expériences sont réalisées sur Brassica napus oléicera cultivé en 1982. La plupart des tests ont été effectués sur une variété Jet neuf riche en glucosinolates. La reproductibilité de la méthode a également été déterminée sur une variété pauvre en glucosinolates (JN 332). Les isothiocyanates sont identifiés, par leur temps de rétention en chromatographie en phase gazeuse, par G.C - M.S et G.C - ir .

Le schéma général d'analyse que nous avons suivi et qui est inspiré de la norme ISO/DP 5504 et 2147/VI/80 F de la CEE est le suivant :



Avant l'attaque enzymatique les graines doivent être broyées de telle sorte que l'entièreté de l'échantillon puisse être récupéré. Comme les graines contiennent environ 40 % de matière grasse, l'utilisation d'un broyeur vibrant à boule est peu recommandée. Il est préférable d'utiliser un broyeur à hélice du type "moulinette".

Le temps de broyage des graines de colza est extrêmement important. Comme le montre le tableau I, pour une prise d'essai de 2,6 grs, le rendement maximum en isothiocyanates est obtenu après trois secondes de broyage.

Tableau I : Influence du temps de broyage des graines de colza

% ITC/ M.S.	temps en secondes					
	3"	4"	5"	8"	10"	20"
butényl ITC	2,9	2,8	2,8	2,4	2,4	2,3
pentényl ITC	0,7	0,7	0,7	0,6	0,6	0,6

Le fait de prolonger le broyage amène notamment des pertes en butényl isothiocyanate. Il convient donc de moudre le plus rapidement possible les graines.

Par contre, le temps de mouture de la moutarde (Sinapis alba) a peu d'importance (tableau II).

Tableau II : Influence du temps de mouture de la moutarde

% ITC/ M.S.	temps en secondes				
	3"	5"	10"	20"	40"
butényl ITC	2,9	2,8	2,9	2,9	2,8
pentényl ITC	0,7	0,7	0,7	0,7	0,6

Toutefois la moutarde doit être bien choisie. Elle doit renfermer suffisamment de myrosinase pour hydrolyser les glucosinolates. Les semences placées sur de l'ouate humide dans une boîte de pétri, doivent germer à 85 % en moins de 72 heures et contenir peu ou si possible pas d'isothiocyanates. Nous avons testé trois moutardes, une de Hollande (V 515) qui germe difficilement, une de Belgique (V 639) qui germe bien et donne des pousses élevées et une du Canada (V 136) qui germe rapidement mais renferme de l'allylisothiocyanate (tableau III). Nous avons donc retenu pour tous nos essais la moutarde belge.

Tableau III : Pouvoir germinatif de trois moutardes différentes

% de germination	temps de germination			hauteur des pousses après 7 h en mm
	20h	24h	48h	
Moutarde de:				
Hollande (V 515)	10	20	50	7
Canada (V 136)	10	100	100	10
Belgique (V 639)	20	75	85	30

La moutarde est délipidée par trois extractions à froid avec de l'hexane (25 ml d'hexane par 5 grs de moutarde). Dans ces conditions nous avons constaté que la moutarde restait active pendant au moins 15 jours.

L'attaque de la myrosinase et l'extraction des isothiocyanates est réalisée dans des tubes à centrifuger de 20 ml. Deux grammes de l'échantillon broyé sont pesés. On ajoute immédiatement 6 ml d'une solution tampon à pH 7, 10 ml d'une solution chloroformique de butyl isothiocyanate à 0,5 mgr par ml (étalon interne). Le tampon est réalisé de la façon suivante : préparer une solution d'hydrogénophosphate disodique ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ 7,1gr/100 ml et d'acide citrique monohydraté (2,1 gr/100 ml), mélanger 82,4 ml de la solution d'hydrogénophosphate avec 17,6 ml de la solution d'acide citrique. On ajoute également 0,2 grs de moutarde délipidée, on ferme le tube et on agite. La durée de l'agitation ainsi que la température du laboratoire sont deux facteurs très importants. On constate, qu'après deux heures d'agitation (tableau IV) le rendement n'est pas complet. Le pourcentage d'isothiocyanates ne se stabilise qu'après 7 h d'agitation.

Tableau IV : Influence du temps d'agitation

% ITC / M.S.	temps en heures						
	2	3	4	5	6	7	10
butényl ITC	2,5	2,4	2,8	2,8	2,8	2,9	2,9
pentényl ITC	0,6	0,6	0,7	0,7	0,7	0,7	0,6

Il convient également de travailler au dessus de 20°C. En dessous de cette température, l'extraction n'est pas compétente.

Après 7 heures d'extraction et une centrifugation (5 000 tours pendant 10 minutes), la phase chloroformique est prélevée. Les solutions chloroformiques peuvent être conservées à 20°C pendant au moins un mois.

Un microlitre de la solution est injecté dans le chromatographe en phase gazeuse dans les conditions décrites au tableau V.

Tableau V : Dosage des isothiocyanates. Conditions chromatographiques

Appareil : HEWLETT PACKARD 5700
 Colonne : inoxydable 2,5 m x 1/8"
 Support : Gaz Chrom Q 80/100 mesh
 Phase stationnaire : Carbowax 20 M à 5 %
 Gaz vecteur : azote
 débit : 20 ml par minute
 Injecteur : température 200 °C
 Détecteur : température 200°C
 ionisation de flamme
 Four : température initiale : 90°C
 temps initial : 4 minutes
 programmation : 4 degrés par minute
 température finale : 130°C
 temps final : 8 minutes
 Intégrateur : HEWLETT PACKARD 21 MX

La limite de détection, compte tenu des conditions opératoires est de 0,02 mgr d'ITC/gr de graine.

La reproductibilité de la méthode a été testée sur une variété riche en glucosinolates et sur une variété pauvre en glucosinolates (tableau VI)

Tableau VI : Reproductibilité de la méthode

A) Variété Jet Neuf riche en glucosinolates

% ITC/ M.S.	répétitions					moyenne	écart type
	1	2	3	4	5		
butényl ITC	2,9	2,9	2,8	2,9	2,9	2,9	0,049
pentényl ITC	0,7	0,7	0,7	0,8	0,7	0,7	0,040

B) Variété Jet Neuf pauvre en glucosinolates

% ITC/ M.S.	répétitions					moyenne	écart type
	1	2	3	4	5		
butényl ITC	0,5	0,6	0,6	0,5	0,5	0,5	0,049
pentényl ITC	0,4	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,040

Nous avons également appliqué la méthode pour doser les isothiocyanates contenus dans les tourteaux obtenus par délipidation à l'hexane. On constate une perte en isothiocyanates lorsque les graines sont délipidées. (tableau VII).

Tableau VII:: Influence de la délipidation des graines

Z.ITC/ M.S.	sans délipidation		avec délipidation	
	A	B	A	B
butényl ITC	2,9	0,5	2,1	0,4
pentényl ITC	0,7	0,4	0,6	0,3

CONCLUSIONS

En conclusion, il est possible de doser correctement les isothiocyanates à partir des graines de colza non délipidées. Il faut toutefois être très prudent lors du broyage des graines. Un temps trop long de broyage pouvant entraîner des pertes importantes en isothiocyanates. Le temps de réaction et d'extraction doit être suffisant et adapté au type de broyeur choisi.