

EXTRACTION ET PURIFICATION DES GLUCIDES : APPLICATION A DIVERS ALIMENTS DÉRIVÉS DU SOJA

J. M. BESLE et M. PITIOT (1)

*Station de Recherches sur l'Élevage des Ruminants,
Centre de Recherches de Clermont-Ferrand, I. N. R. A.,
Theix, Saint Genès Champanelle, 63110 Beaumont*

RÉSUMÉ

Afin d'analyser les oses et oligosides de divers aliments et d'échantillons biologiques nous avons comparé diverses méthodes d'extraction par l'alcool à 80° : soxhlet (avec et sans addition de poudre Hyflosupercell), reflux simple, reflux et épuisement (avec et sans addition de charbon actif). Ceci nous a permis de choisir celle qui nous semble la plus efficace, elle procède par épuisement par l'alcool à reflux de l'échantillon.

Le rôle du charbon actif, additionné pour avoir une meilleure clarification, est étudié. Il ne retient pas les sucres mais semble fixer des hétérosides qui interfèrent dans les réactions colorées.

L'extrait alcoolique est ensuite purifié directement sur résines échangeuses d'anions et de cations, puis concentré et ultrafiltré. Nous définissons les conditions opératoires et vérifions la validité de la méthode en la comparant à d'autres procédés modifiés : méthode par sédimentation de TÄUFEL, ROMMINGER et HIRSCHFELD (1959), purification sur résines échangeuses d'ions de MONTREUIL (1957). Les glucides neutres sont quantitativement récupérés, la purification est rapide et efficace puisqu'il ne reste que très peu d'acides aminés et de protéines et que les acides organiques ont été totalement éliminés.

L'application de ces méthodes à l'analyse des glucides de divers aliments dérivés du soja nous a permis de vérifier que les pics inconnus obtenus par chromatographie échangeuse d'ions étaient bien des glucides ou des produits de composition semblable.

INTRODUCTION

Afin de doser les oses et les oligosides des aliments et de divers échantillons biologiques, plusieurs méthodes d'extraction et de purification ont été proposées. Elles diffèrent suivant les types de glucides que l'on veut étudier et le degré de purifi-

(1) Adresse actuelle : Société Industrielle de Transformation des Produits Agricoles, 02220 Braine.

cation désiré. Dans notre laboratoire, nous nous sommes intéressés particulièrement aux oligosides du soja et de certains autres aliments (fèverole, levures d'alcanes). Pour les extraire, nous employons l'éthanol 80°GL dans lequel seuls les glucides de faible poids moléculaire (inférieur à 2 000) sont solubles. En outre, ce solvant imprègne bien les échantillons, entraîne moins de protéines et autres impuretés que l'eau et inactive les enzymes susceptibles de dégrader les glucides pendant l'extraction (LOOMIS et SCHULL, 1937). Celle-ci peut se faire de diverses manières. Nous comparons trois méthodes d'extraction : deux par reflux et une au soxhlet.

Afin de connaître la composition glucidique, il est nécessaire d'éliminer dans la solution éthanolique les produits interférents ou gênants dans la réaction colorimétrique ou lors de l'analyse chromatographique. Pour ce faire, on peut éliminer au préalable l'alcool et purifier la solution aqueuse obtenue par différents procédés : défécation, dialyse, précipitation au point isoélectrique, ultrafiltration, emploi des résines, par exemple. On peut aussi éliminer par sédimentation les produits insolubles à divers degrés alcooliques (TÄUFEL, ROMMINGER, HIRSCHFELD, 1959). Un autre procédé consiste à sécher et à reprendre le résidu par la pyridine (MALPRESS et MORRISSON, 1949) ou par d'autres solvants. Toutes ces méthodes sont plus ou moins longues et souvent éliminent mal les produits indésirables. Après avoir essayé les plus couramment employées, nous proposons une méthode rapide et efficace de purification directe des extraits éthanoliques sur résines échangeuses d'ions.

I. — ÉTUDE DE L'EXTRACTION ÉTHANOLIQUE

Différentes méthodes d'extraction éthanolique des sucres sont décrites. LAIDLAW et REID (1952), HARRIS et WILLIAM (1954), HARRIS et WILLIAM (1958), WYLAM (1954) extraient par l'alcool à 80° au soxhlet. Ce dernier auteur constate qu'au soxhlet les vapeurs d'alcool titrent 89° et que moins de fructosanes sont extraits de cette manière que par reflux. EHEART et MASON (1964) recommandent une extraction à froid pendant 15 mn sous agitation par l'alcool à 85° pour les glucides des pommes et par l'alcool à 75° pour ceux des carottes. FUKUSHIMA (1969) extrait les sucres à l'alcool à 80° sous reflux en épuisant l'échantillon trois fois de suite. CERNING (1970) procède de même en épuisant deux fois à reflux puis, deux fois à froid. Il semble donc que la méthode d'extraction optimale doit être choisie suivant la nature de l'échantillon dont on détermine la composition.

Nous avons comparé trois méthodes d'extraction : soxhlet, reflux simple, reflux successifs et épuisement. Nous avons aussi clarifié les extraits alcooliques avec du charbon actif et mesuré l'influence de ce dernier sur l'extraction et la purification ultérieure.

I. — Modes opératoires

a) *Extraction au soxhlet* (WYLAM, 1954).

Déposer 1 g d'échantillon dans la cartouche de l'extracteur puis extraire par 100 ml d'alcool à 80° pendant 2 heures. Une variante consiste à rajouter à l'échantillon

1 g de poudre Hyflosupercell et de la mélanger intimement avant l'extraction. On favorise ainsi la pénétration de l'alcool à l'intérieur de l'échantillon et on obtient une meilleure extraction.

b) *Extraction par reflux simple.*

A 1 g de produit sec, ajouter 100 ml d'alcool à 80° et porter à reflux 1 heure. Centrifuger, recueillir le surnageant et compléter à 100 ml.

c) *Extraction par reflux successifs et épuisement* (CERNING, 1970) (fig. 1).

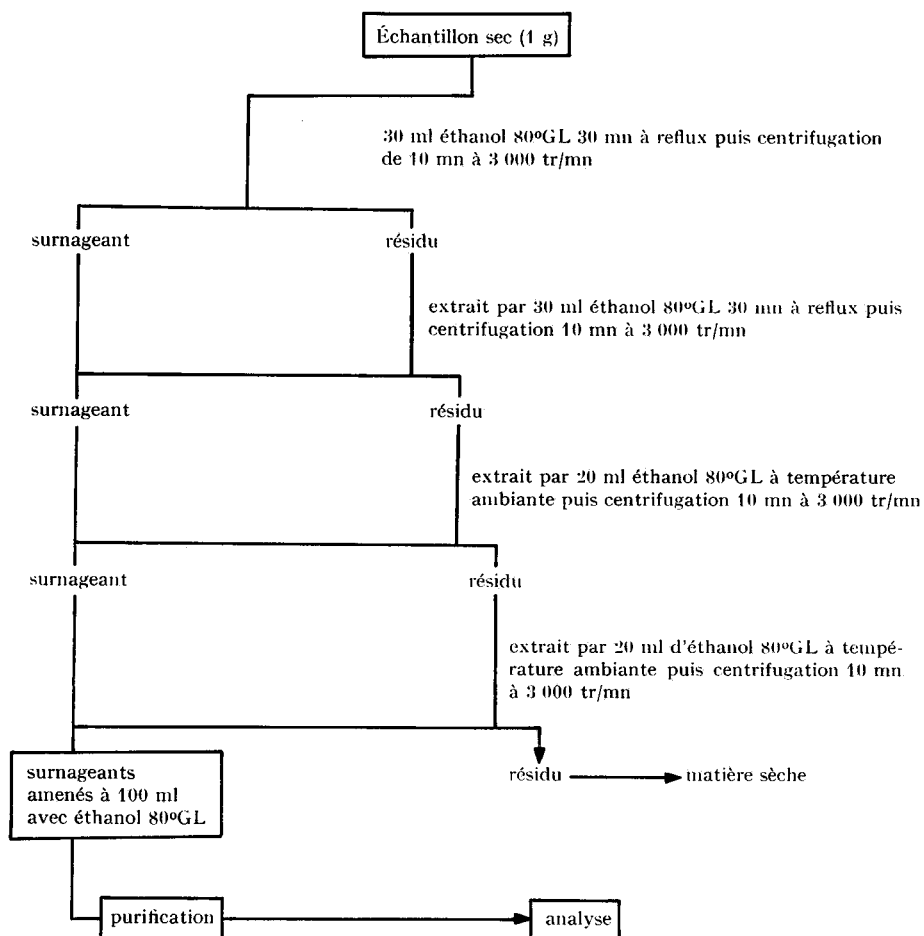


FIG. 1. — *Extraction alcoolique* (CERNING, 1970, modifiée)

Peser exactement environ 1 g de produit sec dans un pot de centrifugation de 100 ml en pyrex à col rodé, ajouter 30 ml d'alcool à 80° et 2 fragments de pierre ponce, homogénéiser avec un petit agitateur en verre.

Extraire à reflux dans un bain-marie d'eau bouillante pendant 30 mn, puis centrifuger 10 mn à 3 000 tr/mn. Recueillir le surnageant dans une fiole de 100 ml et recommencer cette opération.

Ajouter 20 ml d'alcool à 80° froid, bien mélanger avec le petit agitateur et centrifuger. Recueillir le surnageant dans la fiole de 100 ml. Recommencer cette opération. Compléter à 100 ml avec de l'alcool à 80°. Nous faisons varier le poids d'échantillon (1 à 2 g) pour un même volume d'alcool.

d) *Clarification par le charbon actif.*

On utilise la méthode par reflux et épuisement et on ajoute 500 ou 750 mg de charbon actif végétal Norit.

e) *Dosage des glucides.*

Les sucres totaux sont dosés par la méthode à l'orcinol sulfurique automatisée (BESLE, 1974) dans l'extrait alcoolique par rapport à une solution étalon de même composition glucidique que les échantillons (SPIK et MONTREUIL, 1964). Cette dernière est évaluée par chromatographie échangeuse d'ions (BESLE, 1974) après purification.

2. — Résultats

Nous avons travaillé sur quatre types d'aliments dérivés du soja dont certains sont fermentés par le procédé Staron ⁽¹⁾ : tourteau de soja, tourteau de soja fermenté, farine de soja, farine de soja fermentée. Pour plus de commodité, nous les désignerons respectivement dans les tableaux et le texte par les abréviations suivantes : TS, TSF, FS et FSF.

a) *Dosage des sucres totaux dans les extraits alcooliques.*

Le dosage des sucres totaux nous permet d'apprécier globalement la meilleure méthode d'extraction. La quantité apparente la plus élevée est obtenue lorsqu'on utilise le procédé par reflux et épuisement avec 1 g de produit sec (méthode de référence). Avec 2 g d'échantillon, elle ne s'élève, pour le TSF, qu'à 91,2 p. 100 de la précédente. Par reflux simple, elle est de 90,5 p. 100, ce qui montre l'importance de l'épuisement. En utilisant le soxhlet, la concentration passe de 78,0 à 86,5 p. 100 lorsqu'on ajoute de la poudre Hyflosupercell. La différence avec la méthode de référence provient peut-être du fait que nous avons une moindre extraction de glucides de poids moléculaire élevé, ainsi que l'a souligné WYLAM (1954). Le charbon actif, additionné à 500 et 750 mg, clarifie bien mais conduit à n'avoir respectivement que 89,7 et 86,7 p. 100 des glucides totaux de la méthode de référence. Les substances adsorbées par le charbon, et responsables de cette baisse, sont-elles des glucides neutres, des hétérosides ou des composés interférant dans la réaction? Nous avons donc comparé plus finement la composition glucidique de 3 types d'extraits : soxhlet + Hyflosupercell, reflux et épuisement, reflux et épuisement + charbon actif.

(1) Procédé pour le traitement des tourteaux d'origine végétale : Brevet n° 7107977.

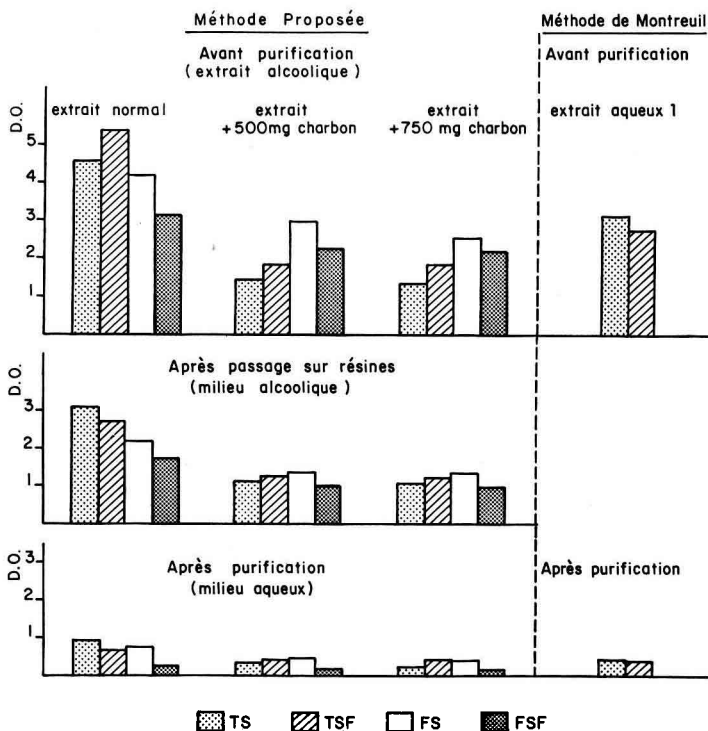


FIG. 2. — Élimination des protéines à différents stades de la purification. Influence du charbon actif. Comparaison de méthodes. Absorption à 260 nm. L'extrait aqueux 1 est obtenu à partir de l'extrait alcoolique normal dont on a éliminé l'alcool, que l'on a ramené au volume initial et qui a été filtré.

b) Analyse chromatographique.

Certains sucres (inconnus X et Y) ne se retrouvent pas dans l'extrait soxhlet-poudre (tabl. 1) ; de plus, dans le cas de la farine de soja, tous les autres sucres ont une concentration moindre. Il semble donc que l'extraction au soxhlet dans ces conditions soit insuffisante, même pour les sucres de poids moléculaire peu élevé. Peut-être qu'un produit différent de la poudre Hyflosupercell conviendrait mieux. On constate par ailleurs que le charbon actif ne retient aucun sucre dosé par chromatographie.

c) Dosage des glucides neutres.

Après purification par la méthode décrite ultérieurement, nous avons dosé les glucides totaux restants, considérés comme étant neutres. Ce dosage a été effectué aux divers stades de la purification pour déceler le cas échéant une différence suivant les types d'extraits. Le tableau 2 montre encore une fois la faible valeur obtenue pour les extraits soxhlet. Nous n'observons aucune différence entre les glucides neutres « charbon actif » et ceux de la méthode de référence, ce qui prouve que ce sont d'autres substances qui ont été retenues par le charbon actif. Ceci ne doit pas trop nous étonner puisque WHISTLER et DURSO (1950) éluent les glucides adsorbés sur charbon par des solutions de concentration croissante en éthanol. Nous avons alors tenté d'élucider son rôle exact.

TABLEAU I

*Influence du mode d'extraction sur la teneur en glucides évalués
par chromatographie échangeuse d'ions*

(Concentration évaluée en p. 100 de la matière sèche)

Échantillon	TS				TSF			
	A	B	C	D	A	B	C	D
<i>Glucides dosés</i>								
X ⁽¹⁾	—	—	—	—	0*	0,072	0,064	0,052
Saccharose	6,18	6,27	6,15	6,36	0,015	0,013	0,008	0,010
Raffinose	0,77	0,80	0,87	0,77	—	—	—	—
Stachyose	3,24	3,99	4,13	4,27	0,233	0,253	0,254	0,244
Y ⁽¹⁾	0,08*	0,24	0,26	0,22	0,003*	0,013	0,006*	0,011
TOTAL	10,27	11,30	11,41	11,62	0,251*	0,351	0,332	0,317
Sucres totaux EANP ⁽²⁾	12,21	14,70	14,76	14,31	1,23	1,36	1,22	1,18
<i>Glucides non dosés</i>								
<i>FS</i>								
X ⁽¹⁾	—	—	—	—	0*	0,046	0,050	0,040
Saccharose	7,08	8,03	7,90	8,35	0,014	0,014	0,018	0,013
Raffinose	0,60*	0,84	0,88	0,86	—	—	—	—
Stachyose	1,79*	2,66	2,87	2,66	0,312	0,330	0,350	0,300
Y ⁽¹⁾	0,036*	0,17	0,17	0,15	0*	0,006	0,008	0,005
TOTAL	9,51	11,70	11,82	12,02	0,326	0,396	0,426	0,358
Sucres totaux EANP ⁽²⁾	11,90	14,22	13,95	14,02	1,16	1,14	1,11	1,13
<i>FSF</i>								

⁽¹⁾ X et Y, sucres inconnus : concentration calculée pour une constante de proportionnalité (concentration/surface) arbitraire de valeur moyenne.

⁽²⁾ EANP : extrait alcoolique non purifié.

* Valeurs très nettement différentes.

A : Soxhlet + poudre Hyflosupercell ; B : Reflux et épuisement ; C : Reflux et épuisement + 500 mg charbon actif ; D : Reflux et épuisement + 750 mg charbon actif.

TABLEAU 2

*Influence du mode d'extraction sur la teneur en glucides totaux
à différents stades de la purification*

(Concentration évaluée en p. 100 de la matière sèche)

Échantillon Mode d'extraction	TS				TSF			
	A	B	C	D	A	B	C	D
<i>Glucides dosés</i>								
Sucres totaux EANP ⁽¹⁾	12,21	14,70	14,76	14,31	1,23	1,36	1,22	1,18
Sucres totaux EAR ⁽²⁾	11,03	13,25	13,84	13,33	0,69	0,80	0,70	0,72
Sucres totaux après purification	9,70	12,57	12,62	12,41	0,43	0,57	0,51	0,52
Produits interférents éliminés (%) ⁽³⁾	20,6	14,5	14,5	13,3	65,1	58,1	58,2	56,0
Total glucides par chromatographie	10,27	11,30	11,41	11,62	0,251	0,351	0,332	0,317
	FS				FSF			
Sucres totaux EANP ⁽¹⁾	11,90	14,22	13,95	14,02	1,16	1,14	1,11	1,13
Sucres totaux EAR ⁽²⁾	11,13	13,28	12,69	12,82	0,75	0,80	0,74	0,75
Sucres totaux après purification	10,55	12,20	11,85	11,93	0,44	0,51	0,48	0,46
Produits interférents éliminés (%) ⁽³⁾	11,4	14,2	15,1	14,9	62,1	55,3	56,8	59,3
Total glucides par chromatographie	9,51	11,70	11,81	12,02	0,326	0,396	0,426	0,358

⁽¹⁾ EANP : extrait alcoolique non purifié.

⁽²⁾ EAR : extrait alcoolique après passage et élution sur résines.

⁽³⁾ Substances non glucidiques interférant dans la réaction à l'orcinol sulfurique, éliminées par la purification.

A : Soxhlet + poudre Hyflosupercell ; B : Reflux et épuisement ; C : Reflux et épuisement + 500 mg charbon actif ; D : Reflux et épuisement + 750 mg charbon actif.

d) Influence du charbon actif.

Déjà ROE en 1934 utilisait le charbon actif pour clarifier l'urine avant d'en analyser le fructose. Les travaux de BEVENUÉ (1949) et de BEVENUÉ et WASHAUER (1950) ont montré son intérêt dans la clarification d'extraits glucidiques aqueux et alcooliques. Toutefois, son rôle n'a jamais été vraiment précisé à notre connaissance. Il est certain que bon nombre de pigments sont retenus car l'extrait obtenu est parfaitement limpide. Une quantité de 500 mg de charbon est nécessaire pour avoir une bonne clarification. En outre, il reste moins de produits réagissant uniquement avec l'acide sulfurique (acides aminés, protéines, ...). Ceci s'apprécie par la valeur du blanc (dosage sans orcinol) qui est nettement inférieur avec le charbon actif. Toutefois, cette diminution est faible par rapport à celle observée dans le dosage des sucres totaux apparents. Le charbon actif n'élimine une partie appréciable des acides aminés (dosage du groupement α -NH₂ à la ninhydrine) que dans le tourteau de soja (30 p. 100).

L'évaluation des protéines, des glycoprotéines et autres composés absorbants

à 260 et 280 nm, nous permet de voir que leur mélange est différent suivant les échantillons étudiés. La figure 2 montre les variations de l'absorption à 260 nm à différents stades de la purification et pour différents modes opératoires : méthode proposée avec et sans addition de charbon actif, méthode de Montreuil. Le charbon actif retient une grande partie des produits absorbants, surtout dans le cas du TS et du TSF. Après purification, son rôle reste encore notable bien que la quantité de composés restants soit très faible et ne puisse influencer sur le dosage. L'interférence des protéines et des acides aminés étant très faible (valeur du blanc), il semble donc que le charbon actif joue principalement son rôle en retenant des glycoprotéines et autres hétérosides.

Nous avons donc retenu la méthode d'extraction procédant par reflux et épuisement avec addition possible de charbon actif.

II. — PURIFICATION DES EXTRAITS ALCOOLIQUES

I. — Schéma proposé

Parmi les méthodes de purification proposées par différents auteurs, nous avons retenu deux types principaux :

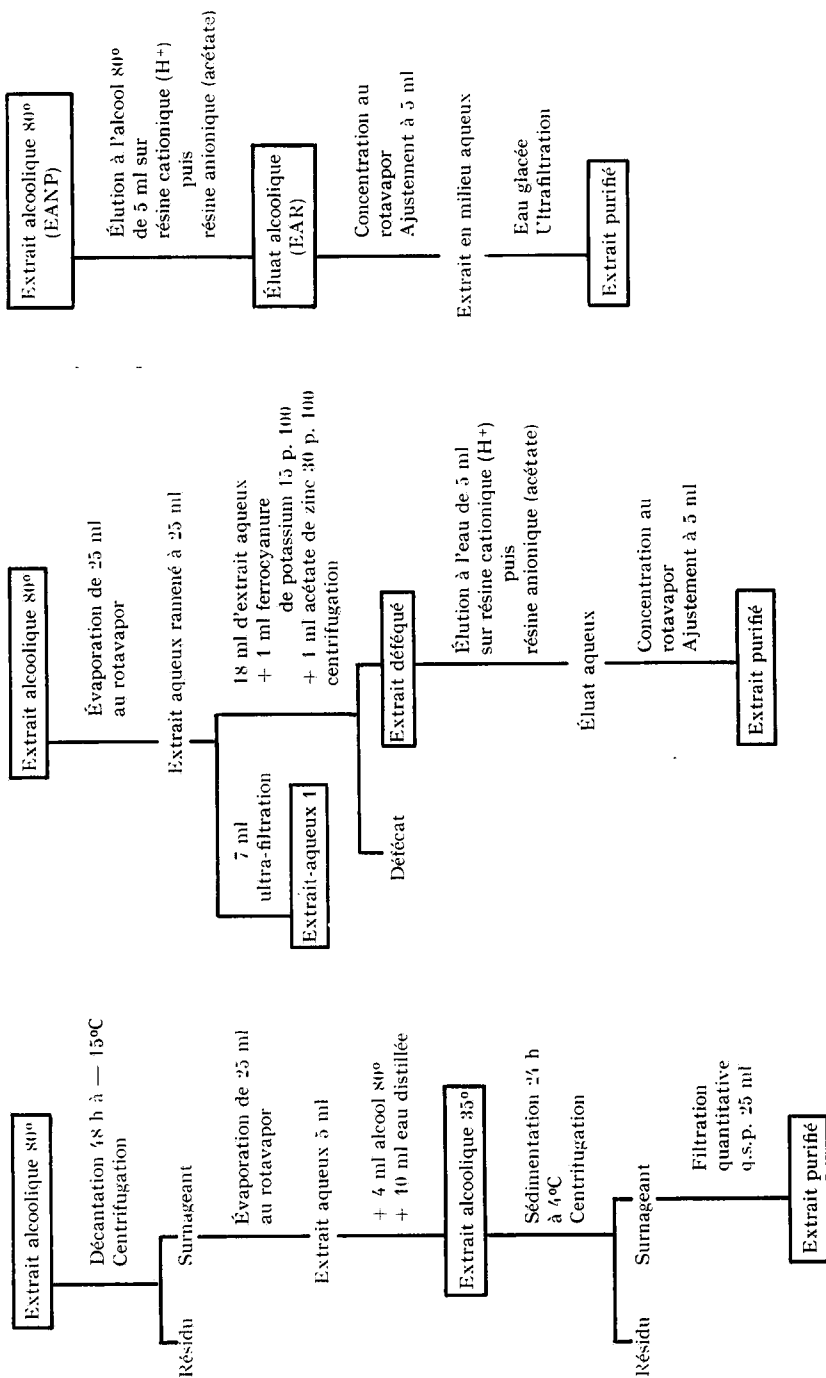
— Purification par sédimentation proposée par TÄUFEL, ROMMINGER et HIRSCHFELD (1959) et par CERNING (1970) (fig. 3).

— Purification par les résines échangeuses de cations et d'anions selon MONTREUIL (1957) (fig. 3), MONTREUIL et SCHEPPLER (1959), WHITE et HESS (1956), MENZIES (1973) ou d'après LATO, BRUNELLI et MEZZETTI (1968).

Nous avons essayé les méthodes de CERNING (1970), de MONTREUIL (1957) et de LATO, BRUNELLI et MEZZETTI (1968). La première, proposée pour les céréales est longue et n'élimine pas les acides aminés ni les acides uroniques des produits protéagineux. LATO, BRUNELLI et MEZZETTI (1968) utilisent un mélange d'échangeurs de cations et d'anions avec index coloré de saturation et éluent les glucides avec une solution diluée d'acide acétique. Ce procédé présente différents inconvénients dus au type de résine utilisé (la forme OH⁻ de la résine anionique risque de dégrader les glucides selon ROSEMAN, ABELES et DORFMAN, 1952), à l'éluant (acide acétique) et au fait qu'il faut mettre l'échantillon au préalable en milieu aqueux.

La méthode de Montreuil est très intéressante puisqu'elle assure une bonne purification sans dégrader les sucres. Mais, elle convient mal aux extraits alcooliques. En effet, les sucres doivent être tout d'abord mis en phase aqueuse puis déféqués. Nous effectuons cette dernière opération par le mélange ferrocyanure de potassium et acétate de zinc. L'échantillon est peu dilué et de plus, nous avons vérifié qu'ainsi, il n'y a pas de pertes en glucides. Après passage sur résines et élution à l'eau, il faut encore concentrer la solution glucidique en phase aqueuse, ce qui demande beaucoup de temps.

Nous proposons un schéma de purification directe de l'extrait éthanolique sur échangeurs d'ions en phase alcoolique, suivie d'une concentration et d'une ultrafiltration pour éliminer les grosses molécules restantes (fig. 3). Cette méthode, sans défécation, et qui ne nécessite qu'une concentration de l'extrait alcoolique purifié, est bien plus rapide que la précédente. Étant donné que les réactions d'échange d'ions pou-



Méthode de CERNING (1970)

Méthode de MONTEUIL (1957) modifiée

Méthode proposée

Fig. 3. — Schéma comparatif des méthodes de purification d'extraits alcooliques

Dans tous les cas, l'extrait purifié obtenu est amené à la même concentration que l'extrait alcoolique de départ

vaient être fortement atténuées par la présence d'alcool et que les sucres risquaient de ne pas être élués ou de l'être avec un phénomène de chromatographie de partage (SAMUELSON, LARSSON et RAMNÄS, 1965), nous avons défini les conditions opératoires, procédé à une vérification de la validité de cette méthode et l'avons comparée à celles de CERNING (1970) et de MONTREUIL (1957).

2. — Description de la méthode

a) Conditions opératoires.

La résine échangeuse de cations est du type Dowex 50 \times 8, « mesh » 200-400, forme H(+). La finesse des grains permet d'éliminer un certain nombre de grosses molécules et de particules en suspension.

La résine échangeuse d'anions est du type Dowex 2 \times 8, « mesh » 50-100, forme acétate. Sous cette forme, les glucides ne sont pas retenus, ni transformés, ni dégradés (MONTREUIL, 1957) comme ils risqueraient de l'être par la forme OH(-) (ROSEMAN, ABELES et DORFMAN, 1952 ; PHILLIPS et POLLARD, 1953 ; HULME, 1953 ; BUHLER, THOMAS et WANG, 1954 ; BUHLER *et al.*, 1955).

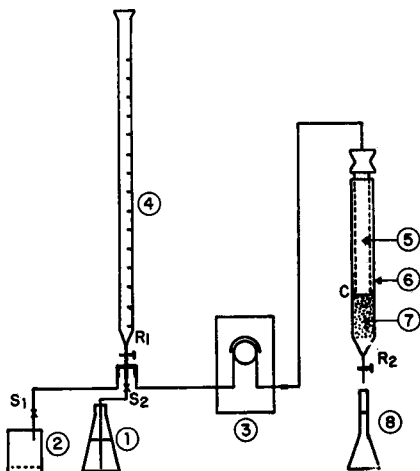


FIG. 4. — Montage utilisé pour la purification sur résines

- | | |
|---|--|
| (1) Flacon d'alcool 80° GL | (5) Piston plongeur Farmacia |
| (2) Évacuation du contenu de la burette | (6) Colonne (1,6 \times 20 cm) |
| (3) Pompe péristaltique Buchler | (7) Résines superposées à l'intérieur de la colonne |
| (4) Burette de 25 ml | (8) Fiole ou éprouvette de récupération des glucides |

R₁, R₂ : robinets

S₁, S₂ : pincées hémostatiques ou pincées de Mohr ou robinets

Les résines sont lavées par la méthode de COHN (1957) puis mises sous la forme ionique désirée et conservées humides. Elles sont superposées dans une colonne (VITEK et VITEK, 1971) d'un diamètre intérieur de 16 mm, l'échangeur de cations se trouvant au-dessus (voir fig. 4). Cette disposition, préférable au mélange, permet d'avoir un volume minimal d'élution. Après usage, les résines sont récupérées. Une quantité de 3 g de chaque résine humide suffit pour purifier au moins 100 ml d'extrait

de TSF (concentration en acides aminés identique à 2,23 $\mu\text{M}/\text{ml}$ de leucine) ou 20 échantillons de 5 ml. Pour ce diamètre de colonne, un débit de 5 ml/mn permet un bon échange d'ions pour un temps d'élution court et une bonne résolution du pic de glucides.

Nous mesurons et reportons en un tableau la quantité d'éthanol 80° nécessaire à l'élution des glucides pour différents volumes d'élution et des concentrations en glucides variables. Les volumes d'élution sont comparables à ceux que l'on obtient lorsqu'on élue à l'eau les sucres en milieu aqueux. Dans les deux cas, nous avons une « queue » de pic que nous ne recueillons pas car elle correspond à une fraction négligeable des glucides (toujours inférieure à 0,5 p. 100 quel que soit l'échantillon). Tous, pentoses, méthylpentoses, cétohexoses, aldohexoses, di, tri, tétraholosides réducteurs ou non, dextrines, sont élués en un pic unique.

b) *Mode opératoire.*

Évaluer au préalable la concentration glucidique approximative dans l'extrait alcoolique par un dosage des sucres totaux de manière à déterminer le volume de solution à purifier et de préciser le volume d'alcool à 80° nécessaire à l'élution. On peut ensuite utiliser le montage décrit dans la figure 4. La solution à purifier est déposée dans la burette. Peser 3 g de chaque résine, les superposer doucement dans la colonne, laver pendant 10 mn à l'alcool 80° au débit de 5 ml/mn grâce à la pompe péristaltique. En manœuvrant les robinets R_1 et R_2 , les pinces S_1 et S_2 , faire pénétrer l'échantillon puis éluer avec l'alcool 80°. Concentrer à l'évaporateur rotatif de façon à éliminer l'alcool et l'acide acétique. Recueillir avec une seringue et amener à 5 ml dans une fiole jaugée. Laisser reposer 10 mn dans de l'eau glacée.

Utiliser pour l'ultrafiltration un appareil du type Sartorius ⁽¹⁾ SM 16511 à membranes SM 11309. Choisir une membrane de filtration en fonction de la finesse des pores (0,1 à 0,6 μ) et de l'épaisseur du précipité. Rincer cette dernière avec 20 ml d'eau distillée, l'essorer par aspiration puis la laisser 2 minutes à l'étuve 40°C de façon à ce qu'elle soit encore légèrement humide. La déposer à nouveau sur un appareil de filtration. Filtrer le contenu glacé de la fiole jaugée, le liquide obtenu doit être parfaitement clair bien qu'il reste parfois légèrement pigmenté (dans ce cas, un traitement par le charbon actif lors de l'extraction est utile).

Chaque lit de résine peut servir pour plusieurs échantillons suivant leur force ionique. Lorsque les résines sont saturées, les recueillir chacune dans un flacon différent, la légère contamination de l'une par l'autre est éliminée lors de la régénération.

3. — *Validité de la méthode*

a) *Récupération des glucides.*

Afin de vérifier que l'extraction est bien totale et qu'aucun sucre n'est retenu par les résines, nous avons rajouté à l'un des produits étudiés (TSF) des surcharges en glucose et stachyose, puis évalué ceux-ci par l'orcinol sulfurique après extraction et purification. Pour le dosage, nous avons tenu compte du fait que le TSF est constitué principalement de stachyose (94 p. 100). Nous voyons dans le tableau 3 que ces

⁽¹⁾ Sartorius France, 31, rue Victor Hugo, 92240 Malakoff.

sucres sont retrouvés intégralement. Nous avons alors ajouté au TSF une surcharge formée des principaux sucres du soja : saccharose, raffinose, stachyose ainsi que de différents types de glucides : pentose (ribose), aldohexoses (galactose, glucose), cétohexose (fructose), diholoside réducteur (maltose). Après extraction et purification, nous les avons analysés par chromatographie échangeuse d'ions (tabl. 3). Leur taux de récupération s'est avéré satisfaisant, aux erreurs de mesure près, l'intervalle de confiance sur le dosage chromatographique lui-même étant de 3,0 p. 100.

TABLEAU 3

Récupération des glucides alcoolosolubles après purification sur résines

Glucides rajoutés en surcharge au TSF		Quantité ajoutée pour 1 g d'échantillon (mg)	P. 100 de récupération (1) Moyenne de 3 essais	Mode de dosage
Stachyose		10	99	Sucres totaux : - Gamme de stachyose - Gamme de stachyose-glucose
Glucose		10	101	
Mélange	Saccharose	20	101	Chromatographie échangeuse d'ions
	Raffinose	30	104	
	Stachyose	30	101	
	Ribose	12	105	
	Fructose	50	102	
	Galactose	30	101	
	Glucose	30	99	
Maltose	30	101		
Dextrines extraites		Quantité pesée pour l'extraction (mg)	P. 100 de récupération après purification	
MD 05		17	100	Sucres totaux : - Gamme de glucose
MD 05		160	97,7	

(1) Les échantillons sont élués et recueillis dans le volume pratique de récupération : la « traînée » de pic n'est pas recueillie.

Enfin, nous avons voulu voir s'il n'y avait pas élimination des sucres à longue chaîne solubles dans l'alcool, en cours de purification. Pour cela, nous avons extrait par l'alcool à 80° des dextrines à longueur de chaîne variable (MD 05 (1) : 1 à 20 unités glucose). Celles dont le poids moléculaire était trop important restaient dans le culot de centrifugation. Nous avons obtenu ainsi une solution alcoolique contenant des dextrines à la limite de la solubilité dans l'alcool. Après purification, nous avons retrouvé la même concentration en glucides totaux qu'avant. Ce système de purification permet donc d'évaluer la totalité des glucides neutres solubles dans l'alcool.

(1) Éts ROQUETTE Frères, 17, boulevard Vauban, 59022 Lille Cedex.

TABLEAU 4

Concentration en glucides (p. 100 matière sèche) à différents stades de la purification : Comparaison de méthodes

Échantillons	Méthode	Traitement par les résines							I Valeur relative	J	
		A	B	C	D cat.	E cat. + an.	F cat. + UF	G cat. + an. + UF			H cat. + an. + CS
TSF	Proposée	1,36			1,32	0,83	0,73	0,57		100	
	MONTREUIL	1,36	0,83			0,65			0,63	110	0,35
	CERNING	1,36		0,99						174	
TS	Proposée	14,70				13,25				100	
	MONTREUIL	14,70	13,26			12,00		12,57	12,16	96,7	11,30
Banane verte <i>Simensis</i>	Proposée	7,3				7,2		7,4		100	
	CERNING	7,3		7,2						98,6	6,65
Banane mûre <i>Simensis</i>	Proposée	90,1				89,5				100	
	CERNING	90,1		88,5				88,8		99,6	

Les résultats portent sur une moyenne de 3 essais. Les dosages sont faits par rapport à un mélange comportant les mêmes sucres que ceux analysés dans l'échantillon.

A : Extrait alcoolique brut (EANP) ; B : Extrait déféqué suivant le schéma MONTREUIL ; C : Extrait alcoolique purifié suivant CERNING ; D : Éluat alcoolique de la résine cationique (Cat.) ; E : Éluat alcoolique (EAR) ou éluat aqueux de l'extrait déféqué passés sur 2 résines ; F : Éluat alcoolique de la résine cationique, concentré et ultrafiltré (UF) ; G : Éluat alcoolique de 2 résines, concentré et ultrafiltré (purification complète) : méthode proposée ; H : Éluat aqueux de l'extrait déféqué passé sur 2 résines et concentré à sec (CS) pour éliminer l'acide acétique, puis repris à l'eau : Méthode de MONTREUIL ; I : Comparaison des méthodes : degré apparent d'impuretés relatives ; J : Quantité totale de glucides évaluée par chromatographie échangeuse d'ions.

b) *Importance de chaque étape lors de la purification.*

La quantité de sucres totaux apparents, évaluée en glucose dans les extraits alcooliques, est moins importante après purification qu'avant. Nous avons voulu préciser quelles étaient les étapes de la purification responsables de cette diminution et connaître la nature des produits interférant dans le dosage : acides aminés, acides uroniques ou autres dérivés hétérosidiques. Nous avons fait cette étude sur 2 échantillons de soja de concentration glucidique très variée (TS et TSF) et sur 2 échantillons de produits issus de la banane dont la composition est différente. Nous avons étudié sur TSF l'influence de chaque résine. En effet, au cours du dosage par chromatographie échangeuse d'ions, les acides retenus par l'échangeur d'anions n'interfèrent pas et ne sont élués que lors de la régénération. La purification sur une seule résine échangeuse de cations doit donc suffire avant chromatographie. En outre, nous avons procédé à une comparaison entre notre méthode et celles de CERNING (1970) et de MONTREUIL (1957). Nous avons apprécié le degré relatif d'impuretés par le dosage des glucides totaux apparents après purification.

L'examen du tableau 4 montre que la diminution en sucres totaux apparents aux diverses étapes de la purification est variable suivant les échantillons (colonnes A, E et G). Elle est importante dans le cas du TSF mais l'échangeur de cations n'en est pas responsable (colonne D), ce qui prouve que ce ne sont pas les cations (acides aminés, peptides) qui interfèrent dans la réaction. Nous voyons en outre (colonne F) que le traitement par l'échangeur de cations, suivi de l'évaporation de l'alcool et de l'ultrafiltration, donne une valeur supérieure à celle obtenue lorsqu'on utilise 2 résines. L'échangeur d'anions semble donc retenir une fraction glucidique acide qui interférerait dans le dosage. L'existence d'une telle fraction a été démontrée par ASPINALL *et al.* (1967). Nous ne l'avons pas étudiée.

Dans certains cas (banane), la concentration apparente en glucides totaux n'est pas modifiée, il n'y a pas de substances interférentes dans l'extrait alcoolique.

La purification par sédimentation (CERNING, 1970) est insuffisante pour le TSF puisque le taux d'impuretés relatif est encore de 174 si l'on donne la valeur 100 à notre méthode (colonne C et I). La méthode de MONTREUIL (1957) concorde bien avec la nôtre. La concentration totale obtenue par chromatographie échangeuse d'ions (colonne J) est nettement inférieure à celle par dosage après purification car il y a probablement, dans l'extrait purifié, des sucres à poids moléculaire élevé qui ne sont pas analysés par cette méthode chromatographique.

c) *Ultrafiltration.*

Plutôt que d'éliminer les protéines, pigments et autres composés à poids moléculaire élevé avant purification par défécation, ou tout autre moyen, ce qui entraîne une dilution et très souvent des pertes en glucides, nous préférons ultrafiltrer après traitement par les résines. Le filtrat obtenu est plus clair lorsqu'on laisse au préalable le concentré aqueux obtenu quelque temps dans la glace. Parfois, une légère coloration subsiste, en général elle ne gêne pas dans l'utilisation ultérieure de l'extrait. Nous pouvons cependant l'éliminer par l'addition de charbon lors de l'extraction ou en interposant entre la membrane et le filtre un disque de filtration en charbon actif (n° 508) (1). Dans ce dernier cas cependant, si le liquide obtenu est bien limpide

(1) Labo Moderne, 37, rue Dombasle, 75015 Paris.

on observe une perte importante en glucides qui est proportionnelle à leur poids moléculaire (11 p. 100 pour le glucose, 98 p. 100 pour le stachyose).

Le précipité obtenu sur membrane interfère dans la réaction à l'orcinoï sulfureux puisque, dans le cas du tourteau de soja fermenté, environ 50 p. 100 des sucres totaux apparents de l'extrait alcoolique purifié sur deux résines, disparaissent après ultrafiltration (tabl. 4). Ce précipité est probablement constitué de glycoprotéines, glycolipides, phytostéroïdes, saponines, isoflavones et autres glucosides (DAUBERT, 1958). Ceci est confirmé par le fait que la majeure partie des produits absorbants à 260 et 280 nm sont éliminés par ultrafiltration (fig. 2).

Notons qu'il est nécessaire de laver la membrane d'ultrafiltration à l'eau avant usage, car nous avons remarqué que l'eau distillée produit une réaction positive à l'orcinoï sulfureux après avoir traversé la membrane. De même, il y a un léger relargage de produits réagissant à la ninhydrine. Toutes les membranes que nous avons utilisées ont produit cet effet.

d) Élimination des acides aminés.

Le tableau 5 montre que les acides aminés et les sucres aminés sont presque totalement éliminés, même après le passage d'un volume de 100 ml d'extrait alcoolique de tourteau de soja fermenté (dosage à ninhydrine). La faible réaction aminée qui reste, ne risque pas d'interférer dans la réaction de dosage des sucres totaux à l'orcinoï sulfureux car seules de fortes concentrations en acides aminés donnent une coloration sensible. Ceux qui interfèrent le plus, la sérine et la méthionine, donnent pour 1 mM/ml (soit dans notre cas 10 M p. 100 g MS) une coloration identique respectivement à 1,3 et 1,1 γ /ml de saccharose. La comparaison avec d'autres méthodes

TABLEAU 5

Élimination des acides aminés : comparaison de méthodes

Échantillon	Volume passé sur résines (ml)	Acides aminés p. 100 MS ⁽¹⁾ mM Leu	P. 100 d'acides aminés restants	Méthodes utilisées
TSF extrait alcoolique non purifié		22,3	100	Proposée
TSF purifié (milieu aqueux)	5	0,85	3,8	
	10	1,02	4,6	
	20	0,61	2,9	
	40	0,28	1,2	
	100	0,22	1,0	
TSF défectueux		13,4	100	MONTREUIL
TSF purifié	20	0,61	4,5	
TS défectueux		2,18	100	
TS purifié	20	0,19	8,7	
TSF extrait alcoolique non purifié		22,3	100	CERNING
TSF décanté centrifugé, alcool 80		22,2	99,5	
TSF purifié, alcool 35		22,8	102,2	

⁽¹⁾ Ces valeurs sont toujours données par rapport à un témoin de 0,2 μ M de leucine dissoute dans le même solvant que l'échantillon étudié.

nous montre que celle que nous préconisons donne des résultats comparables à celle de MONTREUIL (1957) ; par contre, la méthode de CERNING (1970) n'élimine pratiquement pas d'acides aminés, dans le cas des graines protéagineuses.

e) *Élimination d'autres substances diverses.*

Une grande partie des protéines et autres composés absorbants à 260 et 280 nm, sont éliminés au cours de la purification, principalement lors de l'ultrafiltration sur membranes (fig. 2). Le charbon actif retient une fraction appréciable de ces produits et donne une meilleure purification. Les résultats obtenus sont très comparables à ceux que l'on obtient par la méthode de MONTREUIL (1957).

Après purification, il reste pour le TSF, 70 p. 100 d'un résidu sec (méthode de FOLCH, 1957) assimilé à des corps gras, soluble dans le chloroforme. Compte tenu de la faible quantité de ces produits dans l'extrait alcoolique de départ (30 mg pour 100 ml) et de la marge d'erreur provenant de l'évaluation par gravimétrie, on ne peut tirer de conclusions à propos de l'élimination des lipides. Il est toutefois vraisemblable qu'une grande partie de ceux-ci soit retenue lors de l'ultrafiltration.

Les acides glucuroniques et galacturoniques sont bien retenus par les résines, qu'ils soient seuls, en solution ou en surcharge. Enfin, le pH et la conductivité sont voisins de ceux de l'eau distillée à condition d'évaporer à sec avant de reprendre par l'eau et d'ultrafiltrer.

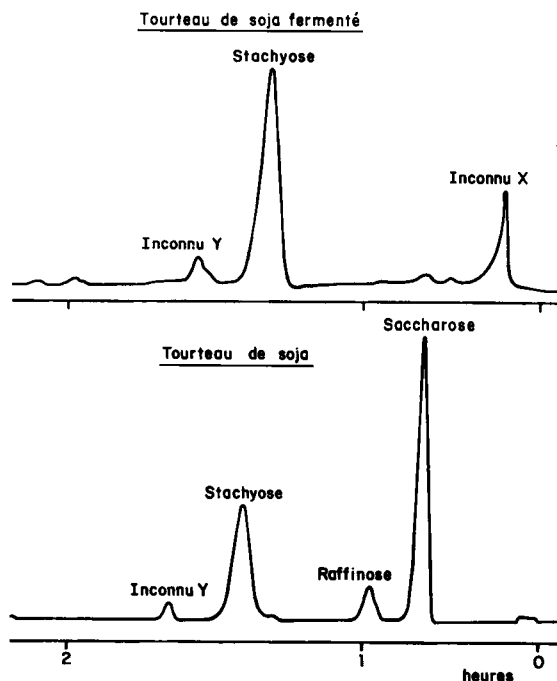


FIG. 5. — Chromatographie d'échange d'ions de deux extraits alcooliques purifiés (Gradient D)

Résine échangeuse d'anions Chromobead S Technicon
Élué par un gradient de borate de sodium
Les conditions opératoires sont décrites par BESLE (1974) :
— utilisation du gradient D

4. — Application à l'analyse des glucides du soja

Nous avons vu que dans le cas du tourteau de soja fermenté, la résine cationique ne retenait aucune substance interférente et que, les produits acides retenus par la résine anionique ne gênent pas lorsqu'on analyse les sucres par chromatographie échangeuse d'ions. Nous avons donc comparé les résultats obtenus sur des échantillons purifiés et non purifiés dont on a simplement éliminé l'alcool, puis que l'on a ultrafiltrés.

TABLEAU 6

Analyse des glucides d'extraits purifiés et non purifiés

Échantillons	Tourteau de soja fermenté			Tourteau de soja		
	Extrait purifié	Extrait non purifié (2)		Extrait purifié	Extrait non purifié (2)	
		MS (%) (1)	MS (%) (1)		Valeur comparative (% EP) (3)	MS (%) (1)
Glucides principaux						
X (4)	0,072	0,085	118	—	—	—
Saccharose ...	0,013	0,007	54	6,27	6,97	11
Raffinose	—	—	—	0,80	0,92	115
Stachyose	0,253	0,252	100	3,99	4,37	109
Y (4)	0,013	0,014	108	0,24	0,21	87
TOTAL ...	0,351	0,358	102	11,30	12,37	109
Échantillons	Farine de soja fermentée			Farine de soja		
X (4)	0,046	0,051	111	—	—	—
Saccharose ...	0,014	0,016	114	8,03	8,10	101
Raffinose	—	—	—	0,84	0,95	113
Stachyose	0,330	0,310	94	2,66	2,83	106
Y (4)	0,006	0,007	116	0,17	0,19	111
TOTAL ...	0,396	0,384	97	11,70	12,07	103

(1) Moyenne de 3 valeurs.

(2) L'extrait non purifié est obtenu en éliminant l'alcool au rotavapor, en amenant à un volume connu et en ultrafiltrant.

(3) Exprimé en p. 100 de l'extrait purifié.

(4) Calculé pour une constante de proportionnalité (concentration/surface) arbitraire de valeur moyenne.

Les pics X et Y, dont la position est indiquée dans la figure 5, ne correspondent à aucun glucide standard connu et peuvent provenir de substances interférentes. Nous constatons (tabl. 6) qu'on les retrouve en même quantité dans les échantillons purifiés et non traités. Les pics inconnus correspondent donc bien à des glucides ou à

des molécules de composition semblable, leur étude sera entreprise ultérieurement. Nous voyons, en outre, que les concentrations en certains sucres ont tendance à être supérieures dans les extraits non purifiés. Les travaux effectués jusqu'à présent ne permettent pas de savoir si cette tendance provient d'erreurs de mesure ou si elle est due à un autre phénomène (effet de sel qui augmenterait la sensibilité?).

Reçu pour publication en décembre 1975.

SUMMARY

EXTRACTION AND PURIFICATION OF CARBOHYDRATES : APPLICATION TO VARIOUS FEEDS DERIVED FROM SOYA

Various methods of ethanolic extraction and oligosaccharide purification of feeds derived from soya are studied. The different extraction methods compared are the following :

- A. Soxhlet
- B. Soxhlet modified by addition of Hyflosupercell powder
- C. Single reflux
- D. Depletion by successive reflux (fig. 1)
- E. Depletion by successive reflux and addition of activated charcoal.

1) The value of each method is estimated by determining apparent total sugars. Methods A and C are eliminated because results are clearly insufficient.

2) Anion exchange resin chromatography analysis of oligosaccharides is used in comparing the other methods in more detail. Table 1 shows that method B is not sufficient for several samples. Methods D and E are comparable, which shows that activated charcoal does not retain the oligosaccharides.

3) Apparent quantity of total sugars before and after purification is measured. Before purification, it is slightly lower with method E than with method D, and clearly lower with method B. After purification, it is similar between method E and method D, and always lower with method B (table 2). For this reason method B is eliminated.

4) The role of activated charcoal is studied. It does not retain neutral carbohydrates, but a large proportion of proteins (fig. 2) and certainly heterosaccharides.

The depletion extraction method by successive reflux, with or without activated charcoal, is the best.

5) Several purification methods are compared ; one is proposed which gives satisfactory results with protein plants alcoholic extracts.

The following methods are studied (fig. 3) :

- I. Sedimentation in alcoholic solutions of varying degrees (modified CERNING method, 1970).
- II. Elimination of alcohol, clarification and purification on ion exchange resins (modified MONTREUIL, method, 1957).
- III. Direct purification of alcoholic extracts on resins, alcoholic elution, elimination of alcohol and ultrafiltration (proposed method).

The proposed method is much quicker than the other processes. Its efficiency is studied.

6) The apparatus used to apply the proposed method is described in figure 4. It does not retain neutral carbohydrates (table 3). They all leave in a single peak.

7) The amount of apparent total sugars, eliminated at different purification stages and in the other methods compared, is studied in table 4. Two resins, one a cation exchange and the other an anion exchange, are necessary for good purification. The proposed method is compared to method II, while method I is not satisfactory for soya samples.

8) Ultrafiltration eliminates a large part of the interfering products, mainly proteins (fig. 2) and heterosaccharides.

9) Amino acids (table 5), proteins (fig. 2) and uronic acids are well eliminated by the proposed method, as with method II.

10) Lipids are probably retained on the ultrafiltration membrane, but it is difficult to judge

because of their low concentration in the samples studied, pH and conductivity are comparable to those of distilled water, if the acetic acid from the anion exchange resin is thoroughly eliminated by dry concentration.

11) The extraction and purification method is applied to the study of soya oligosaccharides and results of chromatographic analysis on purified and unpurified extracts are compared (table 6). These show that carbohydrate concentration on unpurified extracts tends to be higher (due to an inexplicable phenomenon), and that the unknown peaks X and Y (fig. 5) are carbohydrates or analogous compounds.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ASPINALL G. O., BEGBIE R., HAMILTON A., WHYTE J. N. C., 1967. Polysaccharides of soy-beans. Part III. Extraction and fractionation of polysaccharides from cotyledon meal. *J. Chem. Soc. (C)*, 1065-1070.
- BESLE J. M., 1974. Séparation des oses, des di et triholosides par chromatographie d'échange d'ions. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **14**, 545-573.
- BEVENUE A., 1949. Determination of sugars in plant materials. Use of decolorising carbon in the ferricyanide method. *Analyt. Chem.*, **21**, 586-587.
- BEVENUE A., WASHAUER B., 1950. A study of the effect on the determination of reducing sugars in plant materials. *J. Assoc. Off. Agr. Chem.*, **33**, 122-127.
- BUHLER P. R., THOMAS R. C., WANG C. H., 1954. Epimerization and degradation of glucose by ion exchange resin. *Analyt. Chem.*, **26**, 1248-1249.
- BUHLER D. R., THOMAS R. C., CHRISTENSEN B. E., WANG C. H., 1955. Epimerization and fragmentation of glucose by quaternary ammonium base type anion-exchange resins. *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 481-482.
- CERNING J., 1970. *Contribution à l'étude de l'évolution de la composition glucidique des céréales au cours de leur maturation : maïs, blé, orge*. Thèse, Fac. Sci. Univ., Lille.
- COHN W. E., 1957. Ion exchange chromatography of nucleic acid digests. In COLOWICK S. P. et KAPLAN N. O. *Methods in enzymology.*, **3**, 724-738. Acad. Press ed. New York.
- DAUBERT B. F., 1950. *Other constituents of the soybean*: Carbohydrates. In MARLEN K. S. *Soybean and soybean products*, **1**, 371-379. Interscience, New York.
- EHEART J. F., MASON B. S., 1965. Extraction and assay methods for sugars in apples and carrots. *J. Ass. Off. Agric. Chem.*, **48**, 643-646.
- FOLCH J., LEE M., SLOANE STANLEY G. H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **226**, 497-509.
- FUKUSHIMA D., 1969. Enzymatic hydrolysis of alcohol denatured soybean proteins. *Cereal Chem.*, **46**, 405-418.
- HARRIS G., McWILLIAM I. C., 1954. Chemical aspects of malting. *J. Inst. Brewing*, **60**, 149-157.
- HARRIS G., McWILLIAM I. C., 1958. Carbohydrates in malting and brewing. VII. Complex carbohydrates of infusion wort and their enzymic degradation. *J. Inst. Brewing*, **64**, 395-404.
- HULME A. C., 1953. An action of strongly basic anion exchange resins and solutions containing sugars. *Nature*, **171**, 610-611.
- LAIDLAW R. A., REID S. G., 1952. Analytical studies on the carbohydrates of grasses and clovers. 1. Development of methods for the estimation of the free sugar and fructosan contents. *J. Sci. Fd. Agric.*, **3**, 19-25.
- LATO M., BRUNELLI B., CIUFFINI G., 1968. Bidimensional thin layer chromatography of carbohydrates on silicagel impregnated with boric acid. *J. Chromatog.*, **34**, 26-34.
- LOOMIS W. E., SCHULL C. A., 1937. In *Methods in plant physiology*, 250-259. Ed. McGRAWHILL, New York.
- MALPRESS F. H., MORRISON A. B., 1949. Use of pyridine in the deionization of solutions for paper chromatography. *Nature*, **164**, 963.
- MENZIES I. S., 1973. Quantitative estimation of sugars in blood and by paper chromatography using direct densitometry. *J. Chromatog.*, **81**, 109-127.
- MONTREUIL J., 1957. Glycoprotéides. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **39**, suppl. III, 1-92.
- MONTREUIL J., SCHEPPLER N., 1959. Chromatographie quantitative des oses constituants des glycoprotéines. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **41**, 13-28.
- PHILLIPS J. P., POLLARD A., 1953. Degradation of sugars on ion exchange columns of Amberlite IRA 400 (OH⁻). *Nature*, **171**, 41-42.
- ROE J. H., 1934. A colorimetric method for the determination of fructose in blood and urine. *J. Biol. Chem.*, **107**, 15-22.

- ROSEMAN S., ABELES R. H., DORFMAN A., 1952. Behavior of carbohydrates toward strongly basic ion-exchange resins. *Arch. Biochem.*, **36**, 232-233.
- SAMUELSON O., LARSSON L. F., RAMNÅS O., 1965. Partition chromatography of sugars and sugar derivatives. *Symposium Technicon Automation in Analytical Chemistry*. 169-173. E. KAWERAU, Mediad Inc. New York.
- SPIK G., MONTREUIL J., 1964. Deux causes d'erreurs dans les dosages colorimétriques des oses neutres totaux. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **46**, 739-749.
- TÄUFEL K., ROMMINGER K., HIRSCHFELD W., 1959. Oligosaccharide von getreide und mehl. *Z. Lebensmittelunters. u. Forsch.*, **109**, 1-12.
- VITEK V., VITEK K., 1971. Chromatography of sugars in body fluids. I. Preparation of urine for paper chromatographic analysis. *J. Chromatog.*, **60**, 381-395.
- WHISTLER R. L., DURSO D. F., 1950. Chromatographic separation of sugars on charcoal. *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 677-679.
- WHITE A. A., HESS W. C., 1956. Paper chromatographic detection of sugars in normal and dystrophic human urines. *Arch. Biochem. Biophys.*, **64**, 57-66.
- WYLAM C. B., 1954. Analytical studies on the carbohydrates of grasses and clovers. IV. Further development in the methods of estimation of mono, di and oligosaccharides and fructosan. *J. Sci. Fd. Agric.*, **5**, 167-172.
-