

Caractérisation par infra-rouge des teneurs en acides gras de la graine entière décortiquée de tournesol

Alicia Ayerdi Gotor¹, Philippe Moreau², Antoine Gaillard³, Anne Calmon¹

¹E.I. Purpan, Laboratoire d'Agro-Physiologie, 75 voie du TOEC, BP 57611, 31076 Toulouse, France,
E-mail: alaygo@hotmail.com; anne.calmon@purpan.fr

²Caussade Semences, Station de recherche, Z.I. de Meaux, 82303 Caussade, France,
E-mail: philippe.moreau@caussade-semences.com

³Maïsador semences. BP 27, 40001 Mont de Marsan cedex, France, E-mail: gaillard@maisador.com

ABSTRACT

Oil seed market evolution requires the production of seeds with an elevated content of oleic acid instead of linoleic acid. Seeds producers need a rapid, accurate and low cost analytical method to discriminate sunflower's seed by their fatty acids content. This work's objective is to determine the feasibility of utilisation of near infrared reflectance spectrometry (NIRS) to predict fatty acid percentages in one husked sunflower seed. Calibration equations of palmitic, stearic, oleic and linoleic acids were developed with 400 husked seeds and were validated with another 400 independent seeds. The validation parameters showed that NIRS could replace classical and destructive gas chromatography analyse for oleic and linoleic acids in intact sunflower seeds. The correlation coefficient between NIRS prediction and GC reference values were of 0.93 for oleic acid and 0.95 for linoleic acid. Breeders could use NIRS analysis to evaluate the potential of their sunflower pools to obtain more performing hybrids for their fatty acid composition.

Key words: fatty acids – near infrared reflectance spectroscopy – NIRS – seed – sunflower.

INTRODUCTION

La France produit 57% du tournesol européen (FAO, 2007). L'huile de tournesol bénéficie d'une bonne image, en raison de sa composition équilibrée en acides gras insaturés qui représentent environ 90% de l'huile (Bozkurt and Karacal, 2001; Napier, 2006). Sa faible teneur en acide linoléique (0,2%) en fait une huile stable et sa richesse en composés mineurs (tocophérols) sont intéressants pour les actions anti-rancissement de l'huile (Bramley et al., 2000). De plus, l'huile de tournesol présente un intérêt industriel pour la production d'esters d'acides gras (essentiellement pour les biocarburants et les biolubrifiants) (Van Dievoet, 2005; Ballerini, 2006). Ainsi, il est nécessaire de renforcer le potentiel de sélection d'hybrides associant performances agronomiques et compositions vs teneurs en acides gras.

L'industrie semencière a besoin d'un outil analytique rapide, fiable et facile à mettre en œuvre pour sélectionner des lignées et des hybrides de tournesol. La méthode par spectrométrie proche infra rouge (SPIR) s'avère répondre à cette demande (Sato et al., 1995; Pérez-Vich et al., 1998; Moschner and Biskupek-Korell, 2006). C'est une méthode indirecte qui permet d'analyser avec peu de préparation des échantillons. Le principal avantage de cette technique est la facilité et la rapidité d'échantillonnage. D'autre part, cette technique peut être utilisée en laboratoire ou comme système embarqué. Ainsi, la spectrométrie proche infra-rouge permet de déterminer simultanément différents paramètres dans les graines oléagineuses. Cette méthode est largement utilisée car cet outil simple permet d'accélérer le volume d'échantillons à analyser. Cependant, cette analyse est actuellement destructive (broyage des graines) et est utilisé en pied de silo (allotement), ce qui ne répond pas au besoin de la sélection de disposer d'un outil ne dénaturant pas les graines. Actuellement, aucune analyse rapide non destructive (chromatographie gazeuse) et aucune calibration par SPIR des acides gras sur graine entière de tournesol n'a été identifiée dans la littérature avec un niveau adéquat à la sélection.

Dans cette étude, une prédiction des acides gras sur des graines décortiquées de tournesol par spectrométrie proche infrarouge sera développée. Ce projet s'inscrit dans une démarche de discrimination rapide de l'enrichissement en différents profils d'acides gras afin de procéder à une sélection précoce du matériel génétique au cours du processus de création variétale.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Matériel végétal

Une sélection de 800 graines de tournesol dans une gamme de teneur en acide oléique variant entre 15 et 80% a été retenue. Ces lignées et hybrides ont été sélectionnés pour étudier la faisabilité de la prédiction de la composition en acides gras d'une graine par spectrométrie proche infrarouge. Chaque graine a été mise à température ambiante 24h avant un décortilage manuel à l'aide d'un scalpel. Chaque graine décortiquée est analysée par spectrométrie proche-infrarouge puis analysée par la méthode de référence par chromatographie en phase gazeuse.

Analyse par SPIR

Pour l'analyse par spectrométrie proche-infrarouge (SPIR), chaque graine est placée dans un adaptateur en acier inoxydable sur la cellule en quartz et l'ensemble est bloqué avec un joint en silicone noir. Un appareil Foss NIR 6500 (Foss Analytical, Danemark) permet de collecter les spectres. Pour chaque graine, la mesure est réalisée sur les deux faces afin de s'affranchir de la différence spectrale. La moyenne entre les deux spectres s'effectue automatiquement. Les valeurs de réflectance [$\log(1/R)$] de chaque échantillon sont mesurées entre 400 et 2500 nm à intervalles de 2 nm. La calibration des acides gras est réalisée sur 400 échantillons et la validation sur les 400 autres échantillons.

Analyse des acides gras

Chaque graine est broyée manuellement au mortier. Le broyat est placé dans un tube à hémolyse avec 3ml de hexane (qualité HPLC, SDS, France). Le mélange est vortexé, puis installé dans un rotary pour réaliser l'extraction de l'huile pendant 15 min. La saponification de l'huile est réalisée en ajoutant 1ml de NaOH méthanolique à 0,5 M. Les tubes sont chauffés dans un bain marie à 70°C pendant 30 min sous système réfrigérant. La méthylation est effectuée en ajoutant 0,5 ml de BF₃ méthanolique à 14% (Sigma-Aldrich, France). Les tubes sont chauffés dans un bain chaud pendant 3 min. Les tubes sont ensuite rapidement refroidis et 0,5 ml d'eau et 1 ml d'hexane sont incorporés pour séparer les phases. Après agitation, la phase organique est prélevée et mise dans un vial pour l'analyse par chromatographie en phase gazeuse. 1 µl d'échantillon sont injectés sur une colonne (Z-FFAP 30m, 0,25mm, 0,25µm, Phenomenex, France) en chromatographie en phase gazeuse Fisons (GC 8000 series, TSP, France).

Calibration par SPIR et procédures de validation

Les équations de prédictions sont calculées à partir d'une régression modifiée des moindres carrés partiels après 4 passages d'éliminations d'échantillons déviants (WINISI 1.02 ; Infracsoft International LLC). Les traitements mathématiques sont décrits dans Ayerdi Gotor et al. (2007). La validation de la méthode par spectrométrie proche-infrarouge (SPIR) pour la prédiction des acides gras sur une graine décortiquée de tournesol est déterminée par les paramètres suivants: l'erreur standard de calibration (SEC), le coefficient multiple de détermination en calibration (RSQ), l'erreur standard de validation croisée (SECV), le coefficient multiple de détermination de validation croisée ($1-VR$ ou R^2) et l'erreur standard de prédiction (SEP).

RÉSULTATS

Valeurs de référence

Les valeurs de référence utilisées dans cette étude pour réaliser les calibrations sont résumées dans le Tableau 1. Ils ont été obtenus par chromatographie gazeuse à partir d'une seule graine décortiquée de tournesol. Les pourcentages en acides oléique et linoléique ont des gammes significativement différentes, par contre la gamme des pourcentages en acides palmitique et stéarique varient dans une moindre mesure.

Spectre infrarouge

Le spectre infrarouge s'une graine entière décortiquée de tournesol est présenté sur la Fig. 1. Les pics caractéristiques de l'eau à 1970 nm et les 2 bandes carbonyles vers 1700-1800 et 2300-2400 sont apparentes.

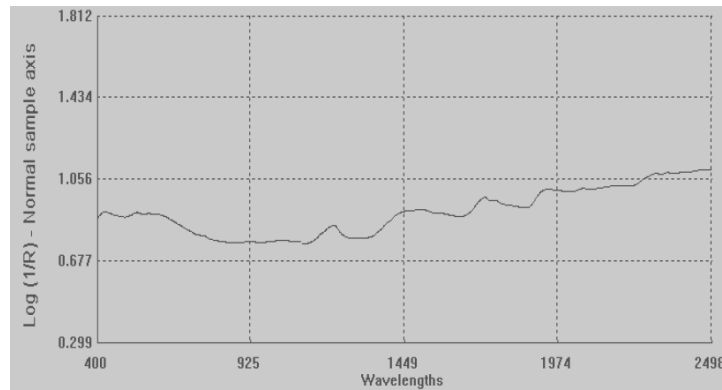


Fig. 1. Spectre infrarouge d'une graine décortiquée de tournesol de 400 à 2500 nm exprimé en $\log(1/\text{Réflectance})$

NIRS calibration

Les valeurs de référence des échantillons ont été introduites dans le modèle mathématique pour déterminer les équations de prédiction. Chaque valeur de référence est comparée à une valeur prédite. Les graphiques de validation de la calibration sont regroupés sur la Fig. 2. Les coefficients de corrélation obtenus sont satisfaisants pour les acides oléique (0,969) et linoléique (0,970) mais moins performants pour les autres acides: acide palmitique (0,782) et acide stéarique (0,329). La distribution des populations des acides gras révèle que les acides palmitique et stéarique ont une courbe normale mais une gamme de variabilité des teneurs faibles. La distribution des acides oléique et linoléique montre deux populations normales bien distinctes (fruit de la sélection pour ce caractère oléique).

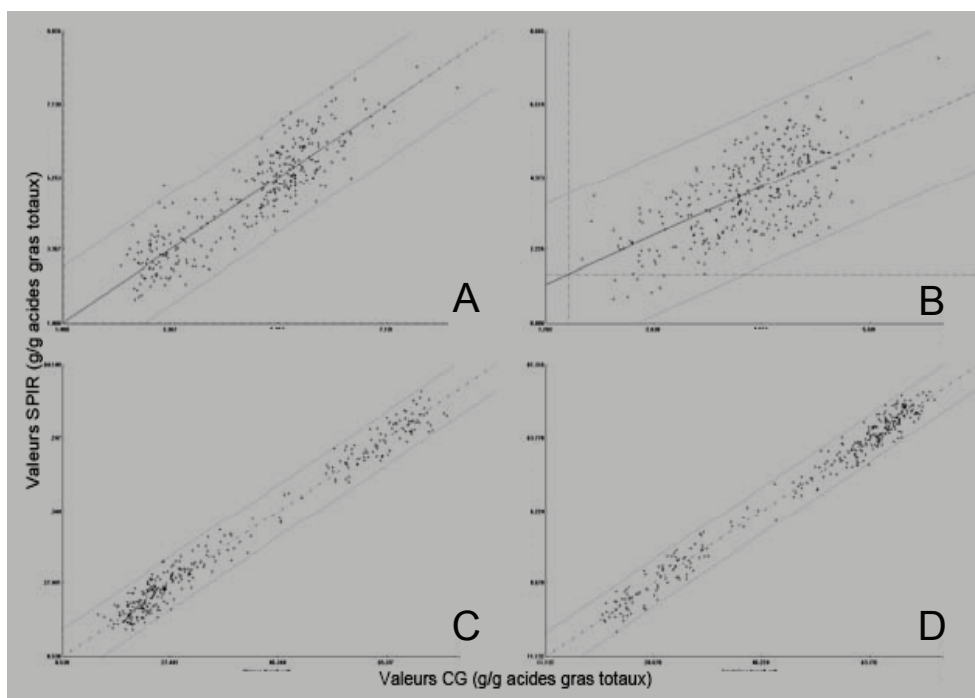


Fig. 2. Référence vs. Valeurs prédites pour: A – acide palmitique; B – acide stéarique; C – acide oléique, et; D – acide linoléique exprimés en g d'acide/g d'acides totaux des échantillons pour la calibration.

Le ratio DS/SECV est de 2,13 pour l'acide palmitique, de 1,19 pour le stéarique, de 5,68 pour l'oléique et de 5,84 pour l'acide linoléique. Ces valeurs de ration sont considérées comme correctes pour une prédiction sur des produits végétaux dès qu'ils dépassent 3 selon la littérature (Moschner and Biskupek-Korell, 2006). Les équations pourraient être utilisées pour les acides C18:1 et C18:2 mais il faudrait apporter une variabilité plus importante dans les teneurs an acide palmitique et stéarique.

NIRS validation

La validation des équations de prédiction est faite sur 400 échantillons non utilisés pour la calibration (Tableau 1). En calculant avec les équations le pourcentage d'acide gras on obtient les valeurs prédits. Ces valeurs vont être comparés aux valeurs de référence. Le coefficient de corrélation et l'erreur standard de prédiction (SEP) entre ce deux valeurs sont montré en Fig. 3. Le coefficient de corrélation (R^2) et le SEP ont un ordre de grandeur égal à ces des 1-VR et SECV de calibration. En conclusion, les équations de prédiction par spectrométrie proche infrarouge de l'acide oléique et de l'acide linoléique peuvent être utilisées pour déterminer leurs teneurs. Les acides palmitique et stéarique ne peuvent actuellement pas être prédits par spectrométrie proche infrarouge sur la base des équations actuelles.

Tableau 1. Résultats de la calibration et de la validation croisée des quatre acides gras présents dans une graine décortiquée de tournesol.

Ac. gras	Calibration sets				Calibration		Cross-validation	
	NE ¹	Range	Moyenne	DS ¹	SEC	RSQ	SECV	1 – VR
Palmitique (C16)	345	2,08 -8,12	4,78	1,30	0,572	0,805	0,609	0,782
Stéarique (C18:0)	342	0,79 – 7,88	3,91	1,22	0,942	0,404	1,022	0,329
Oléique (C18:1)	319	15,49 – 77,35	37,71	19,13	2,836	0,978	3,370	0,969
Linoléique (C18:2)	313	16,93 – 74,94	53,19	17,46	2,318	0,982	2,991	0,970

¹NE: Nombre d'échantillons; DS: Déviation standard.

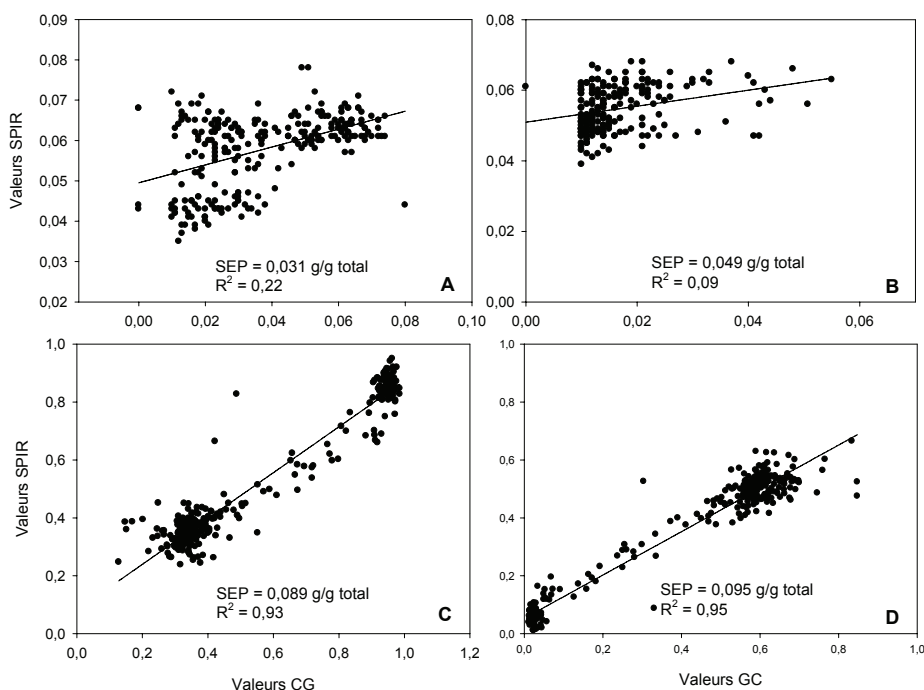


Fig. 3. Valeurs estimées par SPIR vs. valeurs de référence de: A – acide palmitique; B – acide stéarique; C – acide oléique, et; D – acide linoléique exprimées en g d'acide/g d'acides totaux des échantillons de validation avec le coefficient de corrélation (R^2) et l'erreur standard de prédiction (SEP)

DISCUSSION

La discrimination des teneurs en acide oléique et linoléique peut être effectuée par spectrométrie proche infrarouge sur une graine décortiquée de tournesol. Pour les autres acides gras, il est nécessaire d'augmenter la variabilité de leurs teneurs afin d'améliorer les coefficients de corrélation. D'autres études vont être menées pour améliorer la fiabilité des équations: développement d'outils mathématiques, tests interlaboratoire.

REMERCIEMENTS

Les auteurs souhaitent remercier SOFIPROTEOL pour son soutien financier (Fonds de Soutien à la Recherche Semencière Oléagineuse).

REFERENCES

- Ayerdi Gotor, A., E. Farkas, M. Berger, F. Labalette, S. Centis, J., Daydé, and A. Calmon. 2007. Determination of tocopherols and phytosterols in sunflower seeds by NIR spectrometry. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 109:525-530.
- Ballerini, D. 2006. Les biocarburants: Etat de lieux, perspectives et enjeux du développement. p. 370. In: 1st (Technip edn). IFP Publications, Paris.
- Bozkurt, M.A., and I. Karacal. 2001. Quantitative relationships between nutrient contents and oil quality of sunflower Seed. *J. Food Sci. Tech.* 38:635-638.
- Bramley, P.M., I. Elmafda, A. Kafatos, F.J. Kelly, Y. Manios, H.E. Roxborough, W. Schuch, P.J.A. Sheehy, and K.H. Wagner. 2000. Vitamin E. *J. Sci. Food Agr.* 80: 913-938.
- FAO. 2007. FAOSTAT: Statistical database of the Food and Agriculture Organization. www.fao.org. Retrieved 2007-09-28.
- Moschner, C., and B. Biskupek-Korell. 2006. Estimating the content of free fatty acids in high-oleic sunflower by near-infrared spectroscopy. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 108:606-613.
- Napier, J.A. 2006. Producing polyunsaturated fatty acids (PUFAs) from plant sources. p.472-489. In: *Improving the Fat Content of Foods*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge.
- Pérez-Vich, B., L. Velasco, and J.M. Fernández-Martínez. 1998. Determination of seed oil content and fatty acid composition in sunflower through the analysis of intact seeds, husked seeds, meal and oil by near-infrared reflectance spectroscopy. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75:547-555.
- Sato, T., Y. Takahata, T. Noda, T. Yanagisawa, T. Morishita, and S. Sakai. 1995. Nondestructive determination of fatty acid composition of husked sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds by near-infrared spectroscopy. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 72:1177-1183.
- Van Dievoet, F. 2005. Biolubrifiants et écolabel européen OCL 12:285-289.