

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

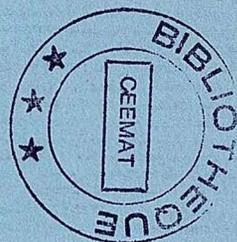
**T H E S E**

présentée à l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc
pour obtenir le diplôme de DOCTORAT

Spécialité : BIOCHIMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE
(SCIENCES ALIMENTAIRES)

7893
6788216
C13

**ETUDE DES COMPOSES PHENOLIQUES DES AMANDES DES
GRAINES DE COTONNIERS DANS L'OPTIQUE DE LA
DETOXIFICATION ET DE L'UTILISATION ALIMENTAIRE
DES AMANDES ET DE LEURS DERIVES.**



par

Clergé TCHIEGANG**Soutenue le 31 Janvier 1989 devant le Jury composé de :**

MM.	J.	CROUZET	Président
	J.	BOURELY	
	J.J.	MACHEIX	
	M.	METCHE	

ACADEMIE DE MONTPELLIER

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC



THESE

présentée à l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc
pour obtenir le diplôme de DOCTORAT

Spécialité : BIOCHIMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE
(SCIENCES ALIMENTAIRES)

ETUDE DES COMPOSES PHENOLIQUES DES AMANDES DES GRAINES DE COTONNIERS DANS L'OPTIQUE DE LA DETOXIFICATION ET DE L'UTILISATION ALIMENTAIRE DES AMANDES ET DE LEURS DERIVES.

par

Clergé TCHIEGANG

Soutenue le 31 Janvier 1989 devant le Jury composé de :

MM.	J.	CROUZET	Président
	J.	BOURELY	
	J.J.	MACHEIX	
	M.	METCHE	



A mes parents
A mes oncles et tantes
A mes frères et soeurs
A toute ma famille
A Clautilde
A Justin

Remerciements .

Ce travail a été effectué au Laboratoire de Chimie des Plantes Textiles de l'I.R.C.T. (Institut de Recherches du Coton et des Textiles Exotiques) au C.I.R.A.D. (Centre de Coopération International en Recherches Agronomiques pour le Développement), à Montpellier.

Je tiens ici à exprimer ma profonde gratitude à Monsieur BOURELY, qui m'a accueilli dans son laboratoire depuis la préparation de mon D.E.A. en 1985 jusqu'à la soutenance de ma thèse. Il a su me faire profiter de sa riche expérience dans le domaine de la recherche. C'est l'occasion aussi pour moi de remercier Monsieur BRAUD, Directeur de l'I.R.C.T.

- Monsieur le Professeur CROUZET m'a fait le grand honneur de présider le jury. Je lui exprime ma profonde reconnaissance pour les suggestions et les critiques qu'il m'a formulées tout au long de l'édification de ce travail.

- Je remercie Monsieur le Professeur MACHEIX, qui, malgré ses multiples occupations, m'a aidé par son expérience, ses précieux jugements et conseils, et a accepté d'être l'un des rapporteurs de ce mémoire.

- Ma reconnaissance va également à Monsieur le Professeur METCHE de l'ENSAIA de Nancy qui a bien voulu me faire honneur d'accepter de siéger à ce jury de thèse comme rapporteur.

- Je sais gré à Monsieur CROS du laboratoire de chimie de l'I.R.C.C. (Institut de Recherches du Café et du Cacao) pour son concours technique à mon travail.

- Je me garderais d'oublier Messieurs DUMAS et RISTERUCCI du laboratoire d'Analyses Organiques et Biochimiques (AOB) au C.I.R.A.D pour les contributions techniques qu'ils ont apportées à mon travail.

- L'élaboration de ce mémoire a été rendue possible par l'infinie patience et la compétence de Madame PAGES, secrétaire à l'I.R.C.T.

- J'associe également mes remerciements à Mesdames MARQUIE, NOURRIT, VIALETTES, toutes techniciennes des Laboratoires de chimie de l'I.R.C.T. pour leur sympathie, ainsi qu'à Monsieur TAHA, Maître de Conférence de l'Université d'Agronomie d'El-Azar au Caire (Egypte) pour sa contribution amicale à mon travail.

- J'apprécie aussi la serviabilité et la gentillesse des documentalistes de l'I.R.C.T. et de la bibliothèque du CIDARC.

- Enfin, je pense à tous ceux qui, de loin ou de près m'ont permis de bâtir ce travail tant sur le plan technique que moral.

SOMMAIRE

	Pages
<u>INTRODUCTION</u>	1
I - Le cotonnier dans le monde	1
II - Le cotonnier au Cameroun	1
III - Raisons et objectifs de cette étude	3
 <u>PREMIERE PARTIE</u>	
 GENERALITES	 8
I - LA PLANTE	8
II - LES CONSTITUANTS DES GRAINES	8
III - LES CONSTITUANTS DES AMANDES	10
1 - Protéines et acides aminés.....	10
2 - Lipides	10
3 - Sucres solubles.....	14
4 - Glandes à pigments	14
4-1 Le gossypol et ses dérivés.....	14
4-2 Les différentes formes du gossypol	16
4-3 Les autres pigments	16
5 - Les autres constituants des amandes.....	16

IV - HISTORIQUE DE L'UTILISATION DES AMANDES DE COTON DANS L'ALIMENTATION HUMAINE	19
V - LES COMPOSES PHENOLIQUES DANS L'ALIMENTATION	20
1 - Introduction	20
2 - Influence sur la qualité des aliments	20
3 - Toxicité et propriétés pharmacologiques	21
VI - TECHNOLOGIE DES GRAINES A GLANDES ET SANS GLANDE POUR LA FABRICATION DES FARINES ALIMENTAIRES	24
1 - Technologie traditionnelle des graines à glandes	24
2 - Revue des méthodes de détoxification des amandes à glandes	24
3 - Technologie future des graines sans glande	27
 <u>DEUXIEME PARTIE</u>	
 MATERIEL ET METHODES	
A - MATERIEL VEGETAL	30
I - Nature des échantillons	30
II - Préparation du matériel végétal	31
1 - Egrenage	31
2 - Délintage	31
3 - Décorticage	31
B - METHODES D'ANALYSES	31
- Humidité	31
- Huile brute	31

I - Teneurs	31
II - Pourcentages des constituants glycéridiques	33
- Protéines et acides aminés	33
I - Azote total et protéines totales	33
II - Azote soluble et protéines solubles	34
III - Acides aminés	34
IV - Dosage du tryptophane	36
V - Dosage de la lysine disponible	38
1 - Définition	38
2 - Principe et choix de la méthode	38
3 - Protocole expérimental	40
- Sucres solubles totaux	42
I - Extraction des sucres solubles totaux	42
II - Chromatographie sur couche mince	42
- Les composés phénoliques	43
I - Extraction	43
1 - Extraction des composés phénoliques	43
1-1 Essais pour déterminer un solvant convenable	43

1-2 Protocole retenu pour l'extraction des composés phénoliques autres que le gossypol libre	44
1-3 Délipidation complémentaire de l'extrait hydroalcoolique	47
1-4 Purification du résidu délipidé	47
2 - Extraction du gossypol	48
2-1 Gossypol libre	48
2-2 Gossypol total	48
2-2-1 Hydrolyse par l'acide oxalique	50
2-2-2 Hydrolyse par l'acide acétique	50
3 - Préparation du gossypol témoin	54
3-1 Préparation des amandes	54
3-2 Extraction du gossypol	54
3-3 Purification et combinaison du gossypol avec l'acide acétique	55
II - Séparations chromatographiques	55
1 - Choix des techniques utilisées	55
2 - Chromatographie sur couche mince	57
2-1 Choix des solvants de migration	57
3 - Chromatographie liquide à haute performance	58

3-1 Séparation des différents composés phénoliques	58
3-1-1 Utilisation du détecteur à barrettes de diodes	58
3-1-2 Utilisation du détecteur UV/visible simple	59
3-2 Séparation du gossypol	59
III - Techniques d'identification des composés phénoliques	59
1 - Spectrophotométrie UV/visible	59
2 - Révélation chimique des chromatoplaques	61
3 - Utilisation d'un détecteur à barrettes de diodes	61
IV - Dosages des substances phénoliques	62
1 - Colorimétriques	62
1-1 Composés phénoliques totaux	62
1-2 Gossypol libre	62
1-3 Gossypol total	63
2 - H.P.L.C.	64
2-1 Estimation de la somme des teneurs des composés phénoliques dosés par HPLC	64
2-2 Gossypol libre	64
2-3 Gossypol total	65

V - Analyses statistiques	65
- COMBINAISON DU GOSSYPOL AVEC D'AUTRES CONSTITUANTS DES AMANDES OU DES FARINES	66
I - Combinaison à chaud du gossypol libre puis hydrolyse du gossypol lié	66
1 - Amandes à glandes	66
2 - Farine de coton sans gossypol et farine de soja	66
II - Combinaison à froid du gossypol libre puis hydrolyse du gossypol lié	69
1 - Amandes à glande	69
2 - Farine de coton sans gossypol et farine de soja	69
- DETOXIFICATION DES AMANDES.	69
I - Principe de la technique retenue et choix des solvants utilisés	69
1 - Principe de la détoxification	69
2 - Choix des solvants de détoxification	72
2-1 Mélange hexane-fréon	72
2-2 Dichlorométhane	72
2-3 Mélanges dichlorométhane-éthanol	73

II - Méthodes de détoxification	73
1 - Préparation des amandes	73
2 - Utilisation du mélange hexane-fréon	73
3 - Utilisation du dichlorométhane	74
4 - Utilisation du mélange hexane-fréon + dichlorométhane	74
5 - Utilisation des mélanges dichlorométhane-éthanol	74
III - Détermination de la couleur des farines	74
1 - Définition de la couleur	74
2 - Système de mesure	76
3 - Modes de calcul	76

TROISIEME PARTIE : RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE I : EXTRACTIONS, SEPARATIONS, IDENTIFICATION ET DOSAGE DES COMPOSES PHENOLIQUES.

I - Extraction et purification des composés phénoliques	78
1 - Variations liées à l'extraction	78
2 - Extraction des composés phénoliques	79
3 - Purification des composés phénoliques	81

II - Caractérisation des composés phénoliques des amandes de cotonniers	81
1- Comparaisons spectrophotométriques des extraits totaux purifiés ou non	81
2 - Chromatographie sur couche mince	84
3 - Séparations H.P.L.C. , caractérisations spectrales et propositions d'identification	89
3-1 Séparation H.P.L.C. utilisant un détecteur à barrettes de diodes	89
3-2 Caractérisations spectrales et proposition d'identification	89
4 - Discussion et conclusion générale sur les structures des composés phénoliques présents dans les amandes de cotonniers	94
III - Estimations de la somme des teneurs en composés phénoliques	96
1 - Séparation H.P.L.C. utilisant un détecteur UV/visible simple	96
2 - Sommes des teneurs des composés phénoliques déterminées par HPLC	96
3 - Comparaison des teneurs en composés phénoliques totaux déterminées par la méthode de Folin - Cioaltea avec celles estimées par HPLC	103

IV - Teneurs en gossypol libre	104
1 - Non fiabilité de la méthode de dosage AOCS	104
1-1 Extrait brut de composés phénoliques + aniline seule	104
1-2 Extrait brut de composés phénoliques + solution témoin de complexe de gossypol-acétique + aniline	105
1-3 Extrait brut de composés phénoliques + extrait d'amandes renfermant le gossypol + aniline	105
1-4 Discussion et conclusion	109
2 - Analyse statistique des teneurs en gossypol libre déterminées par les méthodes AOCS et H.P.L.C.	109
2-1 Méthode AOCS	112
2-2 H.P.L.C.	113
2-3 Comparaison des résultats des deux méthodes	113
V - Teneurs en gossypol total	115
1 - Séparation H.P.L.C.	115
2 - Détermination du temps optimum d'hydrolyse du gossypol combiné par l'acide oxalique	116

3 - Comparaison des différents méthodes de dosage du gossypol total	116
---	-----

CHAPITRE II : COMBINAISON DU GOSSYPOL AVEC D'AUTRES CONSTITUANTS
DES AMANDES OU DES FARINES.

I - Introduction	118
II - Evolution des teneurs en gossypol, en lysine disponible et en sucres solubles totaux en fonction des traitements subis par les farines	118
III - Evolution des teneurs en lysine disponible et en sucres solubles totaux après hydrolyse du gossypol combiné	121
IV - Récapitulatif des différentes interactions des composés phénoliques avec les autres constituants des amandes ou des farines	124
V - Conclusion	127

CHAPITRE III : DETOXIFICATION DES AMANDES.

I - Introduction	128
II - Classification des constituants des amandes dans les solvants utilisés pour la détoxification	128

III - Conditions de détoxification : évolution des teneurs en gossypol	130
1 - Utilisation du mélange hexane-fréon	130
2 - Utilisation du dichlorométhane	130
IV - Composés phénoliques, protéines et acides aminés	133
1 - Les composés phénoliques	135
1-1 Comparaison des teneurs en composés phénoliques totaux déterminées par la méthode de Folin - Ciocalteu avec celles estimées par HPLC	135
1-2 Evolution des sommes des teneurs en composés phénoliques, teneurs et pourcentages relatifs de chaque famille de composés phénoliques au cours de la détoxification	136
2 - Gossypol et protéines	138
2-1 Teneurs en gossypol et en protéines	138
2-2 Evaluation chimique de la valeur nutritionnelle des protéines des farines détoxifiées	141
3 - Détoxification, lysine disponible et tryptophane	146

3-1 Influence de la détoxification et pourcentage de la lysine disponible	146
3-2 Influence de la détoxification sur la teneur en tryptophane	147
V - Les sucres solubles totaux	147
VI - L'huile	148
1 - Teneurs en huile résiduelle dans les farines détoxifiées	148
2 - Pourcentages des glycérides des huiles extraites au cours de la détoxification	149
VII - Couleur des farines	151
1 - Interprétation des résultats	151
2 - Influence de la présence des composés phénoliques sur la couleur des farines	153
- <u>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES</u>	157
- <u>BIBLIOGRAPHIE</u>	162

I N T R O D U C T I O N

INTRODUCTION

I - Le cotonnier dans le monde

Le cotonnier est l'une des plantes les plus précieuses pour l'humanité et revêt donc une importance capitale dans l'industrie. Il est cultivé dans plus de 85 pays du monde, essentiellement pour sa fibre qui se développe sous forme de poils cellulosiques sur les graines.

La richesse des graines de cottonniers en huile et protéines alimentaires font d'elles une matière première très importante surtout dans les pays producteurs de coton. Le tableau 1 donne une estimation des quantités de graines, d'huile et de tourteaux de coton recensées dans les pays producteurs de 1986 à 1988, ainsi que les prévisions pour 1989.

Les 3,8 millions de tonnes d'huile obtenues annuellement font du cotonnier la cinquième ressource mondiale en huile au même titre que l'arachide.

Avec plus de 33 millions de tonnes de graines, représentant plus de 14 millions de tonnes de tourteaux, le cotonnier constitue la seconde source mondiale en protéines végétales après le soja (tableau 2).

Avec ces 14 millions de tonnes de tourteaux, on pourrait produire plus de 6 millions de tonnes de protéines pouvant satisfaire aux besoins de 240 à 350 millions d'hommes sur la base respective de 65 à 45 g de protéines par jour, c'est dire l'importance considérable que peuvent représenter les graines de cottonniers pour l'homme.

II - Le cotonnier au Cameroun

Au Cameroun, le coton est le quatrième produit d'exportation après le café, le cacao et le bois. Il ne représente que 4 % de la valeur des exportations nationales. Cependant, il est une source de revenu importante pour les paysans, d'autant plus que le prix du coton graine est le plus élevé de la zone africaine.

La date de l'introduction du cotonnier au Cameroun est difficile à définir avec précision. Il est vraisemblable qu'elle se situe vers la fin du siècle dernier.

A l'origine, le cotonnier était utilisé uniquement pour satisfaire aux besoins familiaux et à ceux de l'artisanat local. La culture cotonnière n'a fait l'objet d'une production industrielle que vers les années 1950.

Tableau 1 : Estimations de la production mondiale des graines, huile et tourteaux de coton (en 1.000 tonnes) d'après Oil World Statistics Update 1987/1988.

PAYS	Graines			Huiles			Tourteaux		
	1986/1987	1987/1988	1988/1989	1986/1987	1987/1988	1988/1989	1986/1987	1987/1988	1988/1989
Chine	6550	7752	7950	726	846	884	3373	3927	4063
U.S.A.	3448	5234	4800	354	535	510	1008	1467	1408
U.R.S.S.	4528	4449	4650	606	615	646	1516	1579	1625
Inde	3170	2950	3500	240	218	271	1719	1568	1919
Pakistan	2639	2946	2650	265	290	281	1080	1183	1144
Brésil	1260	1500	1550	173	190	198	624	685	719
Turquie	849	845	820	104	103	101	328	325	318
Egypte	635	580	550	88	80	77	264	241	232
Argentine	174	417	--	24	53	48	68	144	133
Grèce	330	255	320	40	34	41	233	195	236
Espagne	140	134	190	21	19	27	89	84	117
Autres pays	3786	4235	----	497	531	569	1653	1827	1952
Productions Mondiales	27511	31296	31790	3137	3514	3653	12009	13224	13863

Tableau n° 2 : Production mondiale de tourteaux de quelques oléagineux (en milliers de tonnes métriques) (source : Oil World Statistics Update 1987/1988).

	1985/1986	1986/1987	1987/1988
Soja	61.920	65.681	67.196
Coton	14.163	11.968	12.921
Colza	10.301	11.367	12.093
Tournesol	8.086	8.285	8.507
Arachide	5.141	4.962	4.619
Lin	1.250,40	1.406.50	1.379.60

La zone cotonnière est située dans le nord Cameroun (fig. 1) dans les départements du Diamaré, de la Bénoué, du Margui-Wandala et du Mayo-Danaï.

Trois variétés de Gossypium hirsutum sont essentiellement cultivées, IRCO 5028, BULK 9697, L 1429 et IRMA 9697.

Le tableau 3 montre la progression de 1984 à 1988 des productions du coton-graine au Cameroun, ainsi que dans les 9 autres pays de l'Afrique francophone.

L'huile de coton est largement consommée sur tout le territoire national. Neuf usines d'égrenage et trois huileries produisent plus de 45.000 litres d'huile raffinée par jour. Le tourteau obtenu après l'extraction de l'huile sert d'aliment pour le bétail et la volaille locaux.

Au Cameroun, seule une petite ethnique du nord, les Moundang, consomme la farine de coton après inactivation du gossypol par un extrait aqueux de la cendre des végétaux.

III - Raisons et objectifs de cette étude

L'alimentation des pays en voie de développement est généralement caractérisée par un déficit en protéines dont les conséquences se manifestent surtout chez les enfants en bas-âge qui, au moment du sevrage, passent sans transition du lait maternel au régime familial traditionnel déséquilibré, à base de céréales (maïs, riz, mil etc...) et de tubercules (maniocs, ignames, patates, macabos etc...).

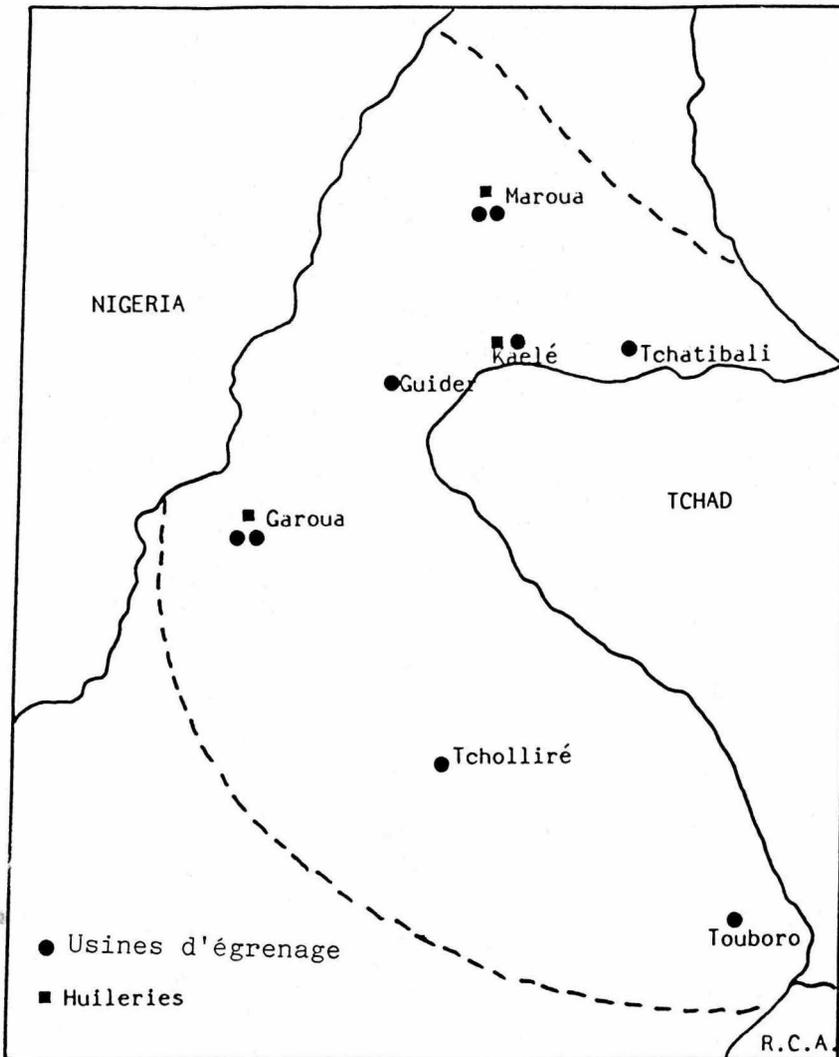
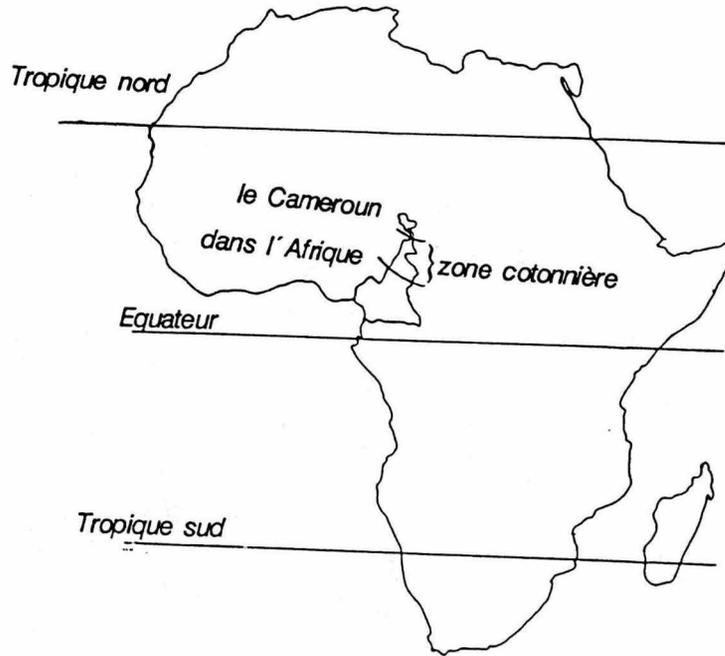


Fig. n° 1 : Zones et industries cotonnières du Cameroun

Tableau n° 3 : Evolution de la production de coton graine dans
10 pays d'Afrique francophone (en tonnes)

	1984/1985	1985/1986	1986/1987	1987/1988 (prévisions)
Cameroun	97.502	115.542	122.704	113.900
Centrafrique	45.516	35.479	29.904	18.700
Tchad	96.363	99.469	89.469	121.300
Afrique Centrale	239.381	250.490	237.077	253.900
Burkina Faso	88.134	115.491	169.227	160.000
Côte d'Ivoire	212.070	189.314	213.532	260.000
Mali	144.262	175.092	201.653	187.000
Niger	3.884	4.389	8.138	9.650
Sénégal	46.913	27.942	26.871	38.700
Togo	54.756	63.558	79.067	68.000
Afrique de l'Ouest	550.019	575.786	698.488	723.350
Madagascar	33.813	42.871	40.886	27.160
Production totale	823.213	869.147	976.451	1004.410

Source : Afrique Agriculture n° 155 juillet-Août 1988 (mensuel d'informations agricoles) pages 9 à 16.

Ces aliments, consommés en régions tropicales et équatoriales, sont caractérisés par de faibles teneurs en protéines (tableau 4) et nécessitent donc, plus que tout autre, une supplémentation protéique. A la faim physiologique correspond donc une carence protéique engendrant une mortalité infantile élevée, des maladies caractérisées, un retard dans la croissance physique, intellectuelle et des séquelles permanentes.

Tableau n° 4 : Teneurs en protéines de quelques aliments couramment consommés dans les pays tropicaux et équatoriaux (d'après KARIKARI 1983)

Aliments	g de protéines pour 100 g de matières sèches
Maïs	11,0
Riz	9,0
Blé	13,4
Sorgho	10,5
Manioc	1,0
Igname	2,0
Macabo	2,2
Patate douce	1,2
Plantin	3,1

La carence porte principalement sur les protéines animales et il serait souhaitable de voir augmenter la production et la consommation des produits laitiers, viandes, poissons et oeufs, qui, du fait de leur prix très élevés, sont actuellement inaccessibles aux couches sociales les plus démunies. Néanmoins, ces objectifs ne peuvent être que le résultat d'une politique à long terme et l'inflation galopante de la population mondiale, la progression de la disette alimentaire dans bien des pays nécessitent de concevoir des solutions rapides. L'alimentation des enfants des pays pauvres doit être étudiée et résolue sur place, en tenant compte des ressources locales de chaque pays.

Parmi toutes les solutions que l'on peut envisager pour augmenter les disponibilités en protéines des populations des pays en voie de développement, l'utilisation des graines de coton produites dans certains de ces pays est restée jusqu'alors au second plan des priorités nationales ou alors quasi inexistante en raison de la présence dans la graine de glandes à pigments dont le gossypol, toxique pour l'homme et les animaux monogastriques.

L'objectif de notre travail est l'étude des composés phénoliques des amandes des graines dans l'optique de la détoxification et de l'utilisation alimentaire des amandes et de leurs dérivés. En effet, si beaucoup d'études ont été effectuées sur le gossypol depuis sa synthèse totale jusqu'à ses utilisations chimiques et pharmacologiques, les autres composés phénoliques des graines de cotonniers sont peu connus. On sait pourtant qu'ils jouent un rôle important sur la qualité alimentaire et organoleptique des farines ainsi que des produits qui en découlent.

Dans un premier chapitre, nous étudierons globalement tous ces composés phénoliques. Mais, compte tenu des difficultés rencontrées lors de l'identification précise de chaque composé, et pour respecter notre objectif principal qui est celui de la détoxification des amandes, nous limiterons aux seules caractéristiques chimiques et spectrales des différentes substances phénoliques des amandes.

Dans un deuxième chapitre, pour montrer les inconvénients de la présence du gossypol en particulier, et d'autres composés phénoliques sur la valeur nutritive des amandes, nous étudierons les interactions qui se produisent entre les composés phénoliques et les autres constituants des amandes, en particulier la lysine et les sucres solubles, au cours de traitements technologiques.

Un dernier chapitre sera consacré à la mise au point des méthodes de détoxification par extraction gravimétrique des glandes, donc du gossypol. Tous les dérivés des amandes issus des procédés mis au point seront analysés et les phénomènes de coloration des farines par les composés phénoliques seront également étudiés.

P R E M I E R E P A R T I E

G E N E R A L I T E S

PREMIERE PARTIE

GENERALITES

I - LA PLANTE

Le cotonnier, genre Gossypium L., est une dicotylédone de la famille des Malvacées, tribu des Hibiscées, dont la fleur ressemble à celle de la rose trémière (Passerose) et de la guimauve. C'est une plante pérenne qui fructifie tous les ans. Cependant, pour des raisons phytosanitaires, la plupart des variétés sont cultivées d'une manière annuelle.

A côté d'une trentaine d'espèces sauvages (LAGIERE, 1966, PARRY, 1982) impropres à tout usage textile, quatre espèces seulement sont cultivées pour leurs fibres cellulosiques utilisées par l'industrie textile:

- Gossypium herbaceum et G. arboreum, à fibres courtes et épaisses (coton dit indien),
- Gossypium barbadense à fibres longues et fines (coton égyptien) et G. hirsutum à fibres intermédiaires (plus répandue en Afrique).

Après la floraison (fig. 2a), l'ovaire se transforme en une capsule oblongue, divisée en 3 à 5 loges carpellaires, qui, à maturité, s'ouvrent progressivement laissant apparaître un flocon de filaments plus ou moins blancs (fig. 2b). Le laps de temps qui s'écoule entre le semis et la maturité du cotonnier varie de 175 à 225 jours. Selon les variétés, le climat et les méthodes de culture, la hauteur du cotonnier peut dépasser 2 mètres.

II - LES CONSTITUANTS DES GRAINES

Le produit de la récolte, le coton-graine, contient plus d'une trentaine de graines qui portent quelques 10.000 fibres (le lint) et 5.000 à 10.000 poils courts formant le duvet (le linter ou fuzz). Après l'égrenage qui consiste à séparer la graine du lint, la graine non délintée est composée de linter et de deux parties :

- La coque ou tégument, qui constitue 40 à 45 % du poids de la graine délintée.

- L'amande, qui représente 55 à 60 % du poids de la graine délintée. Elle est formée par l'embryon avec ses deux cotylédons repliés renfermant essentiellement des réserves lipidiques et protéiques.

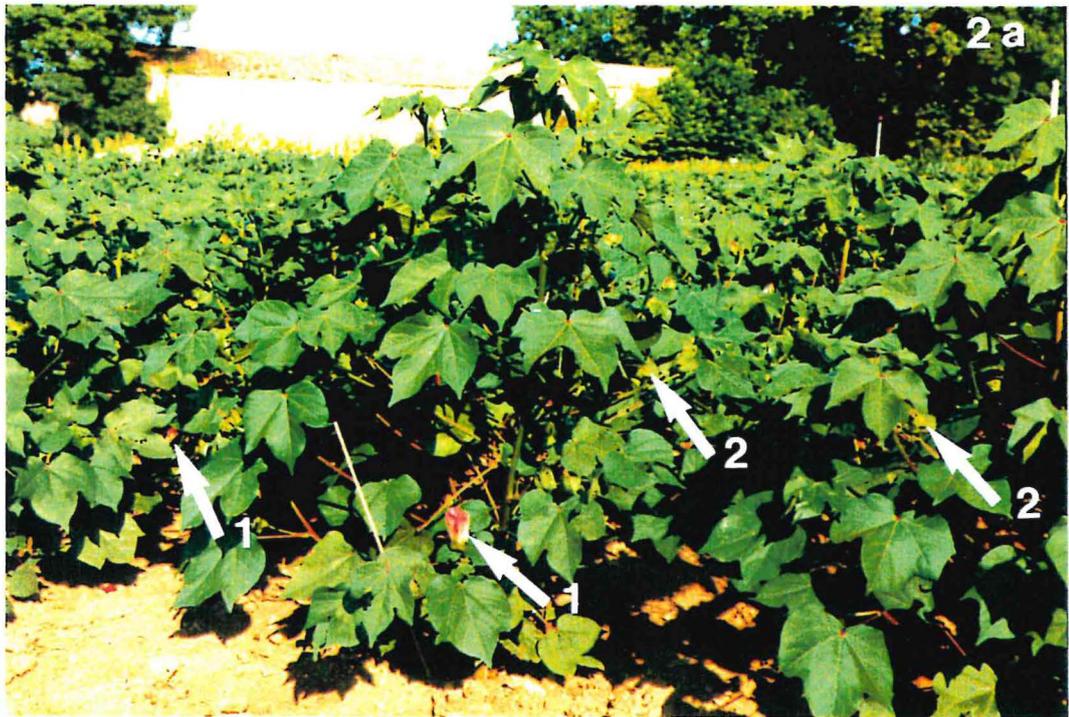


Fig. 2 a : Jeunes plants de cotonniers

- 1 - Fleurs
- 2 - Jeunes capsules

Fig. 2 b : Fructification de cotonniers

- 1 - Capsules mûres ouvertes
- 2 - Capsules mûres non ouvertes

III - LES CONSTITUANTS DES AMANDES

1 - Protéines et acides aminés

Les protéines de réserves des amandes constituent plus de 60 % des protéines totales (CUNNINGHAM et al., 1978). Ces réserves sont, dans la graine mûre, immobilisées dans des grains d'aleurones (TOUMA-TOUCHAN, 1977) renfermant des globoïdes (ALTSCHUL et al., 1966, LUI et ALTSCHUL, 1967, DIECKERT et DIECKERT, 1976, YATSU et KIRCHER, 1987).

La gossypine (protéine 11S) et la congossypine (protéine 7S) représentent plus de 65 % des fractions protéiques totales (REDDY et NARASINGA RAO, 1988 a et b).

Le tourteau qui subsiste après l'extraction industrielle de l'huile des amandes renferme 40 à 50 % de protéines. Le tableau 5 donne la composition en acides aminés d'une farine délipidée, d'un concentrat et d'un isolat.

2 - Lipides

Les amandes des graines de cotonniers contiennent 30 à 35 % d'huile dont la composition est donnée dans le tableau 6.

D'après YATSU et ALTSCHUL (1963), une partie des lipides est associée aux grains d'aleurones, tandis qu'une autre se trouve dans les sphérosomes répartis dans les cellules des amandes (HENSARLING et al., 1970, JACKS et al., 1974, YATSU et KIRCHER, 1987).

L'huile de coton est essentiellement constituée de triglycérides (TOUMA-TOUCHAN, 1977) qui après hydrolyse libèrent des acides gras libres.

En outre, l'huile contient des acides cyclopropénoïques dont les deux principaux sont les acides malvalique et sterculique qui représentent 0,6 à 1,5 % des acides gras totaux (BUFFET 1979, TAHA, 1986). Au cours du raffinage de l'huile, l'élévation de la température à 250 ° C. et la désodorisation sous vide les éliminent. Les acides gras cycliques ont des effets physiologiques néfastes sur les animaux (PHELPS et al., 1965, SHENSTONE et al., 1965). Ils sont responsables de l'élévation du taux de cholestérol dans le plasma et le foie et peuvent provoquer l'artériosclérose aortique. Ils potentialisent l'effet carcinogène des aflatoxines (HENDRICKS et al., 1980).

Tableau n° 5 : Teneurs en acides aminés des préparations protéiques de coton (acides aminés pour g/16 g d'azote) (source I.R.C.T*)

Acides aminés	Farines délipidées	Concentré protéique	Isolat protéique
Aspartique	9,35	7,78	9,66
Thréonine	2,80	2,89	3,03
Sérine	3,91	4,16	4,52
Glutamique	20,90	20,70	20,90
Proline	3,60	3,69	2,94
Glycine	3,47	3,49	3,67
Alanine	3,56	3,72	4,02
Valine	3,81	4,05	4,38
1/2 Cystine	1,44	2,14	1,90
Méthionine	0,81	0,96	1,06
Isoleucine	2,86	3,33	3,68
Leucine	4,98	5,48	5,97
Tyrosine	2,58	2,58	2,90
Phénylalanine	4,85	5,36	6,13
Lysine	3,66	3,36	3,25
Histidine	2,39	2,71	2,87
Arginine	10,20	9,59	10,09
Somme des acides aminés	85,17	85,99	90,97

* Institut de Recherches du Coton et des Textiles Exotiques

Ils se rencontrent aussi dans les huiles des plantes appartenant aux familles des bombacacées Sterculiacées, Styracées et Tiliacées. CARTER et FRAMPTON,(1964),PHELPS et al.,(1965) montrent que les acides cyclopropéniques sont fréquemment accompagnés d'une faible proportion d'acides cyclopropaniques (dihydrosterculique et dihydromalvalique) (fig. 3).

Tableau n° 6 : Composition d'une huile d'amandes de coton extraite par l'hexane (source I.R.C.T.). Les résultats sont exprimés en % relatifs des acides gras totaux.

<u>ACIDES GRAS</u>	<u>%</u>
Myristique C 14-0	1,0
Palmitique C 16-0	27,4
Palmitoléique C 16-1	0,7
Stéarique C 18-1	2,3
Oléique C 18-1	15,5
Linoléique C 18-2	51,1
Linoléinique C 18-3	0,5
Arachidique C 20-0	0,3
Malvalique* C 18-1	1,0
Sterculique* C 19-1	0,2

* Acides cyclopropéniques

3 - Sucres solubles

Les amandes des graines de cotonniers renferment essentiellement du raffinose ou gossypiose (plus de 80 % des sucres solubles totaux), du saccharose (11 à 15 %) et des traces de stachyose (environ 1 %). La présence d'oligosaccharides dans les farines est la principale cause de flatulence (RACKIS et al., 1970). Ils sont responsables du blocage d'une partie de la lysine dans les tourteaux de coton au cours des traitements technologiques (MARTINEZ et al., 1961). Le tableau 7 donne les teneurs en sucres solubles des farines délipidées de coton et de soja.

Tableau n° 7 : Teneurs en oligosaccharides solubles (g/100 g M.S.) des farines délipidées des amandes de coton et de soja (source I.R.C.T.)

Oligo- saccharides \ Farines	Farine de coton délipidée	Farine de soja délipidée
Raffinose	8,0	1,5
Saccharose	1,0	6,0
Stachyose	1,0	6,0
Sucres totaux	10,0	13,5

4 - Glandes à pigments

Les glandes à pigments sont de petits sacs sphériques ou ovoïdes de 100 à 400 µm de diamètre, entourés de plusieurs couches de cellules plus ou moins aplaties (BOATNER, 1948, MARKMAN et RZHEKHIN, 1969). Ces glandes jouent le rôle de réservoir à pigments dont le gossypol est le plus important. Le cotonnier classique diffère de la variété sans glande par l'existence des glandes réparties dans les amandes et sur tout le plant. La figure 4 montre des sections longitudinales de graines des deux types de cotonniers encore vêtues de leurs fibres.

4-1 Le gossypol et ses dérivés

Le gossypol fut isolé à l'état pur par MARCHLEWSKI (1899) qui lui donna son nom à cause de son origine Gossyp ...(ium) et de sa nature phénolique Phen... ol . De poids moléculaire égal à 518,54 (CARRUTH, 1918) et de formule C₃₀ H₃₀ O₈, il est soluble dans la plupart des solvants organiques polaires (acétone, alcool, chloroforme, diéthyléther, méthyléthylcétone etc ...) (BOATNER, 1948).

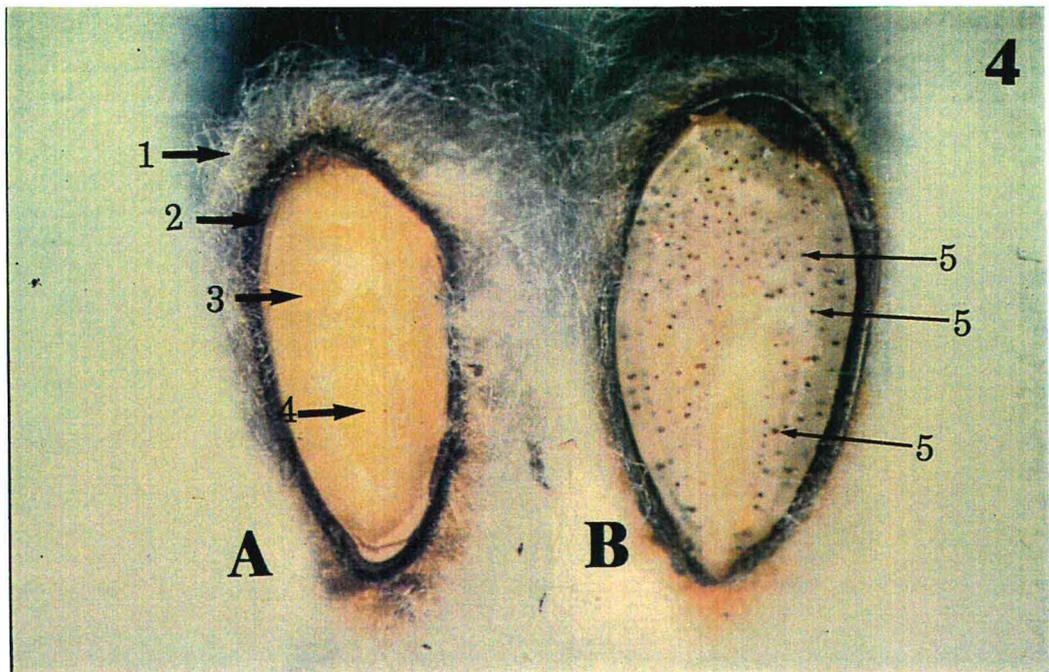


Fig. 4 : Coupes longitudinales d'amandes de cotonniers sans glande (A) et avec glandes (B).

1 = Fibres

4 = Cotylédon

2 = Coque

5 = Glandes

3 = Embryon

Les synthèses chimiques ont conduit ADAMS et al., (1938) et EDWARDS (1958) à montrer que le gossypol était le 2,2'-binaphthalène-8,8'-dicarboxaldéhyde 1,1',6,6',7,7' hexahydroxy-5,5' diisopropyl-3,3'-diméthyl. Il en existe 3 tautomères (fig. 5) : l'aldéhyde (Ia), l'hémiacétal (Ib) et le quinoïde (Ic) (ADAM et al., 1938). SHIRLEY, (1966), utilisant la RMN montra que la forme aldéhyde était prédominante. D'autres pigments, dérivés du gossypol ont été isolés dans les glandes : la gossypurpurine, la gossyverdurine, la gossyfulvine et la gossycaeruleine (BOATNER et al., 1947 a et b, 1949, VON DER HAAR et POMINSKI, 1952, LYMAN et al., 1963). Leur présence est fonction de la durée de stockage et des traitements physicochimiques des graines.

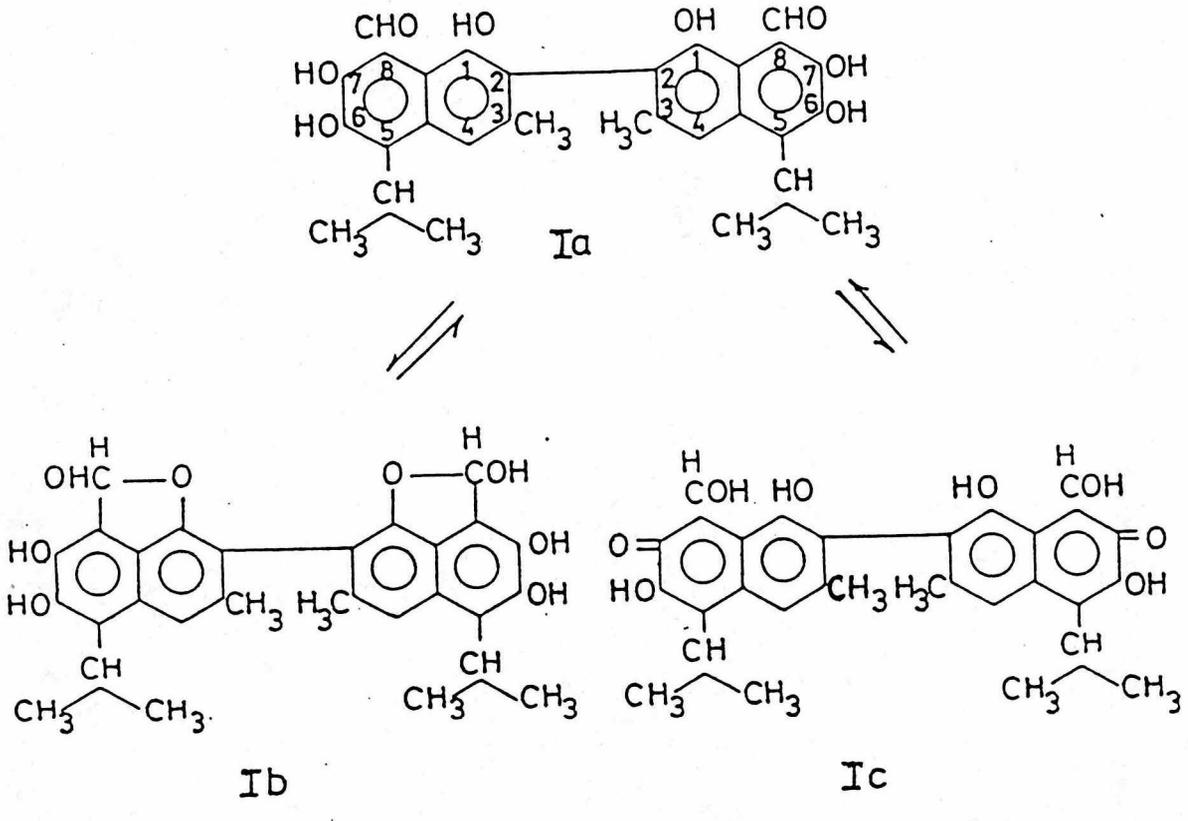
4-2. Les différentes formes du gossypol

Dans les glandes, le gossypol existe sous sa forme libre, c'est-à-dire soluble dans l'acétone aqueuse à 70 %. Au cours des traitements technologiques des amandes, les glandes contenant du gossypol et ses dérivés se rompent. Une fraction de gossypol se combine avec d'autres constituants des amandes et constitue le gossypol combiné ou lié, son groupement aldéhyde se liant avec des terminaisons ϵ -amines des protéines (CLARK, 1928). Dans les amandes n'ayant subi aucun traitement, le gossypol demeure sous sa forme libre. Le gossypol total constitue la somme des formes libre et combinée.

4-3. Les autres pigments

Comme dans le tournesol ou le soja, les autres pigments des amandes de cotonniers sont représentés par les acides phénoliques (MAGA, 1974), les flavonoïdes, les anthocyanosides et les caroténoïdes (BOATNER, 1948, MURTY et ACHAYA, 1975). Peu d'études ont été effectuées sur les composés phénoliques des amandes de cotonniers. Les acides phénoliques sont représentés par les acides hydroxybenzoïque, salicylique, vanillique, coumarique, gentisique, férulique, caféique, protocatéchuique, sinapique, syringique (MAGA et LORENTZ, (1974), MAGA, (1978), DABROWSKY et SOSULSKI, (1984 b).

Quant aux flavonoides, BLOUIN et al., 1981 signalent la présence de 7 dérivés majeurs à savoir, l'isoquercitrine, la rutine, le robinoside 3-O quercétol, le néhoespéridoside 3-O quercétol, le néohespéridoside 3-O kaempférol, le glucoglucoside 3-O quercétol et le glucoside 3-O kaempférol.



Ia : Tautomère aldéhyde

Ib : Tautomère hémiacétal

Ic : Tautomère quinoïde

Fig. 5 : Structures tautomériques du gossypol, $C_{30}H_{30}O_8$, selon ADAMS et al., (1938)

5 - Les autres constituants des amandes.

Les principaux sels minéraux des farines délipidées sont P, K, Ca, Mg, Fe, Na, présents en faibles quantités et Mn, Co, Zn, Cu seulement à l'état de traces (tableau 8). La plupart existent sous formes complexées à l'acide phytique (POUX, 1965, LUI et ALTSCHUL, 1967) qui représente plus de 4 % de la farine délipidée (BESANÇON et al., 1985).

Tableau n° 8 : Teneurs des autres constituants des amandes délipidées de coton d'après TURNER, (1967), HARPER et SMITH, (1968), BUFFET, (1979), BESANCON et al., (1985).

CONSTITUANTS	TENEURS
<u>CENDRES</u>	6 à 6,5
dont <u>SELS MINERAUX</u> :	
Phosphore (%)	1,1 à 1,3
Potassium (%)	1,2 à 1,5
Calcium (%)	0,15 à 0,18
Magnésium (%)	0,54 à 0,58
Fer (%)	0,01 à 0,05
Sodium (%)	0,03 à 0,05
Manganèse (mg/kg)	20 à 23
Cobalt (mg/kg)	0,1 à 0,2
Zinc (mg/kg)	112 à 314
Cuivre (mg/kg)	17 à 22
<u>VITAMINES</u> (mg/kg)	
Choline	présent
Acide folique	0,9 à 3,7
Niacine	33 à 46
Acide panthoténique	10 à 18
Riboflavine	4 à 6
Thiamine	5 à 8
<u>FIBRES</u> (%)	
Cellulose + lignine + hémicellulose	3 à 4 %
<u>PHYTATES</u> (%)	4,40

En outre, certaines vitamines, choline, acide folique, niacine, acide panthoténique, riboflavine et thiamine sont présentes.

Les fibres constituent plus de 3 % de la farine délipidée.

IV - HISTORIQUE DE L'UTILISATION DES AMANDES DE COTON DANS L'ALIMENTATION HUMAINE

La première utilisation alimentaire des amandes de cotonniers se situe en 1876 au Texas (LUSAS et JIVIDEN, 1985). On note ensuite les tentatives suivantes :

- En 1939, commercialisation au Texas du PROFLO qui contenait 55 à 60 % de protéines de coton et 4,5 % de lipides.

- Créé en 1950 par l'Institut de Nutrition de l'Amérique Centrale et du Panama (INCAP), puis commercialisé en Colombie, au Pérou et au Guatemala, l'INCAPARINA contenait 38 % de farine de coton.

- MILOUOT, farine à glandes détoxifiée par la chaleur à Haïfa en Israël est commercialisée de nos jours dans toute l'Europe, notamment en Allemagne. Cette farine sert à la fabrication de pains et d'aliments pour l'homme.

- Quelques ethnies du Nord-Cameroun, du Mali et du Burkina-Faso, fabriquent des beignets et des couscous à partir des farines à glandes qu'elles détoxifient par le natron ou par des extraits aqueux des cendres des feux de bois.

- Après la création des variétés de cotonniers sans gossypol par Mc MICHAEL (1959,1960), des essais de panification, de fabrication de biscuits, des boissons, des protéines filées ont été réalisés aux Etats-Unis (LUSAS et JIVIDEN, 1985).

- Vers les années 1970, des essais nutritionnels avec de la farine de coton sans gossypol ont été entrepris sur des enfants malnutris au Sénégal, Mali, Tchad et à l'extrême Nord-Cameroun (BUI-XUAN-NHUAN, 1971, CORNU et al., 1975, CORNU, 1979).

- En 1978, des essais d'incorporation de la farine de coton dans les fromages ont été réalisés en Egypte (ABOU-DONIA et al., 1983).

- En 1986, à New York, dans le New Jersey et en Pensylvanie, au Japon, la farine de coton a été mélangée dans des bonbons, des petits pains, des cookies, des chocolats (MORRIS, 1986).

V - LES COMPOSES PHENOLIQUES DANS L'ALIMENTATION

1 - Introduction

Alors que le nombre de composés phénoliques présents chez les animaux est réduit à quelques dizaines de molécules, par contre, on en recense plusieurs milliers dans le règne végétal. Les plus importants sont les acides phénoliques, les anthocyanes, les flavonoïdes et les tanins dont les localisations tissulaires et les concentrations sont très variables d'une plante à l'autre (SINGLETON et KRATZER, 1969, MAGA, 1978, HARBONE, 1980).

Par sa structure et sa localisation, le gossypol n'appartient à aucune des familles citées.

Les composés phénoliques participent à la lignification (BU'LOCK, 1965, HASLAM 1966, HASLAM et LILLEY, 1985). Ils protègent la plante contre les prédateurs et certains agents infectieux (BEART et al., 1985) et même, dans certains cas, ils inhibent la germination et la croissance (VARGA et KOVES, 1959, OHKAWA, 1985). Chez le cotonnier, le gossypol joue essentiellement un rôle protecteur contre les prédateurs (BOTTGER et al., 1964, LUKEFHAR et HOUGHTALING, 1969, SHARVER et LUKEFHAR, 1969, BELL et STIPANOVIC, 1978).

2 - Influence sur la qualité des aliments

Les composés phénoliques constituent des substances naturelles indésirables pour la fabrication des aliments à partir des tourteaux des graines des oléagineux, car ils ont une influence négative sur la qualité nutritionnelle et la couleur des protéines. C'est le cas de l'acide chlorogénique dans les graines de tournesol (MIKOLAJCZAK et al., 1970, SOSULSKI et al., 1972, SABIR et al., 1974, FELICE et al., 1976, DABROWSKI et SOLSULSKI, 1984 a et b), de l'acide sinapique dans le colza (FENTON et al., 1980, KRYGIER et al., 1982 a et b, TANTAWI, 1983) et du gossypol dans les amandes des cotonniers (MURTI et ACHAYA, 1975). Les composés phénoliques sont très facilement oxydables (RIBEREAU-GAYON, 1968, CUQ, 1981). En présence d'oxygène, aux pH alcalins ou neutres ou en présence de polyphénol oxydase, ils donnent naissance à des o-quinones. Des polymérisations ultérieures engendrent des pigments bruns de masses moléculaires élevées.

Les produits d'oxydation ou de polymérisation des composés phénoliques réagissent avec les amines terminales des protéines et certains résidus d'acides aminés comme la lysine, la cystéine, la méthionine, et le tryptophane (fig. 6) (FORSYTH et al., 1958, ROBERT, 1959, MASON et PATERSON, 1965, HORSPOOL, 1969, PIERPOINT, 1969 a et b, VITHAYATHYL et MURTHY 1972, HASLAM, 1974, LORENTZ, 1976, RAMASWAMY et REGE, 1976, SYNGE, 1976, CUQ, 1981, HURRELL et al., 1982, FINOT, 1983, RAYMOND et al., 1984).

Les réactions enzymatiques de brunissement se produisent au cours de certaines opérations technologiques de types récolte, entreposage, broyage et séchage. Ces conditions favorisent les contacts oxygène-polyphénols-polyphénol oxydase (JOSLYN et PONTING, 1951, HALUK et al., 1986, METCHE, 1986). Des changements indésirables de flaveur, d'odeur et de valeur nutritionnelle accompagnent souvent ces réactions qui sont à l'origine de la coloration des fruits blessés (JOSLYN et PONTING, 1951).

HORIGOME et KANDATSU (1968) observent une diminution de la digestibilité, de la valeur biologique et du pourcentage de lysine FNDB-réactive de la caséine après traitement par l'acide caféique ou par l'acide chlorogénique en présence d'o-diphénolase. DRYDEN et SATTERLEE, (1978), GRIFFITH et MOSELEY, (1980), CUQ, (1981), HURRELL et al., (1982) montrent également que les interactions protéines-quinones engendrent une baisse du taux de lysine FDNB-réactive et de la digestibilité des protéines.

3 - Toxicité et propriétés pharmacologiques

En raison de leur large distribution chez les végétaux, beaucoup de composés phénoliques sont ingérés régulièrement avec nos aliments. Certains sont doués de propriétés toxicologiques ou pharmacologiques.

PELLETIER et KEITH, (1974), KÜHNNAU, (1976), WILSON et al., (1976), HUGHES et FI-BIOL (1978) considèrent certains composés phénoliques (flavonoïdes et acides phénoliques) comme des constituants "semi-essentiels" des aliments.

Selon PLAKAS et al., 1985, la quercétine par exemple n'est pas toxique. Nous devons, avec SINGLETON et KRATZER, (1969), considérer que "tout polyphénol peut être toxique pour tout organisme en fonction de sa forme d'administration et de sa concentration".

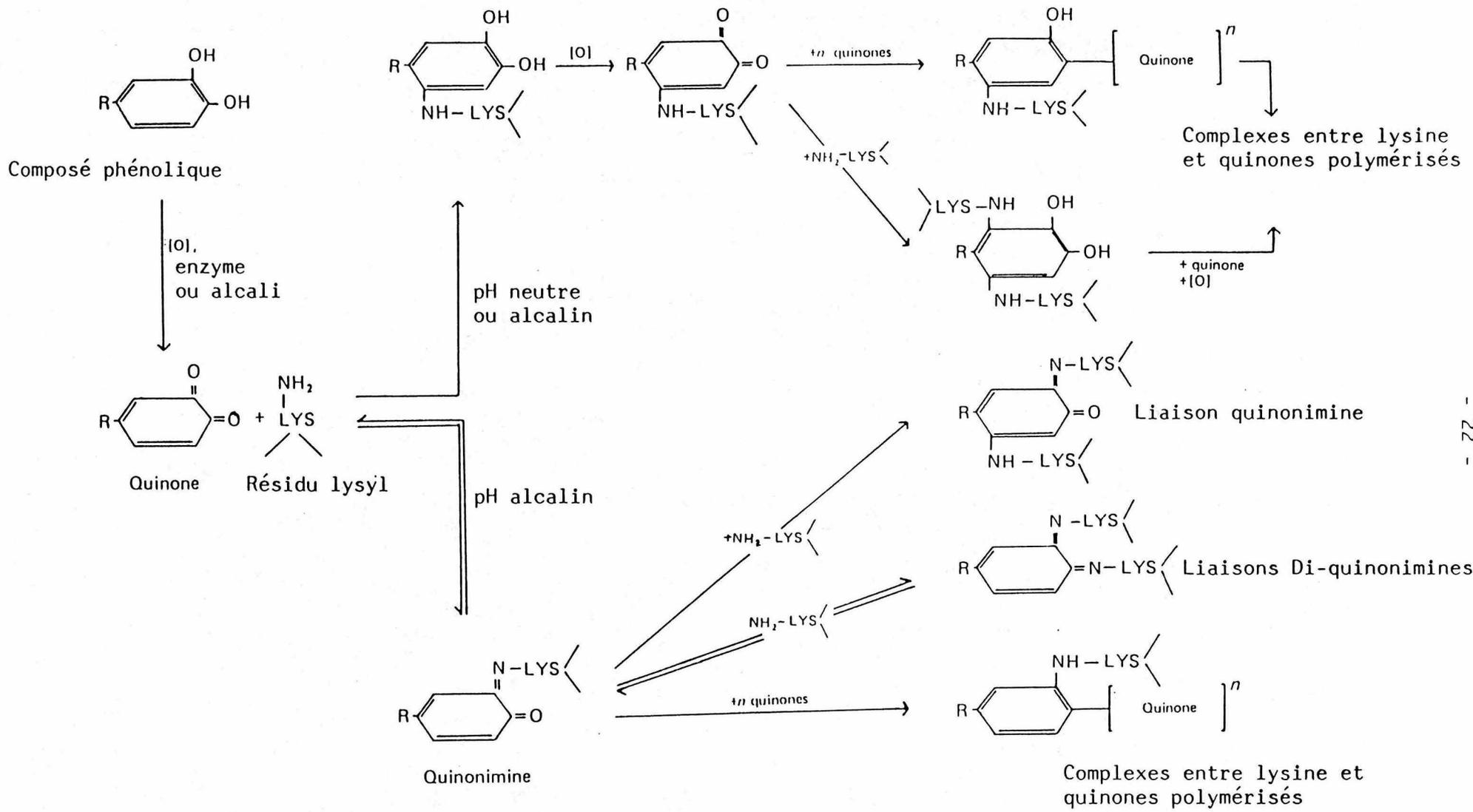


Fig. n° 6 : Interactions composés phénoliques-protéines : exemple avec un résidu lysyl d'après HURRELL et al., (1982).

Le gossypol, composé phénolique présent dans le cotonnier et autres plantes de la famille des Malvacées (Abelmoschus esculentus , Thespesia populnea) a été largement étudié pour sa toxicité (El-NOCKRASHY et al., 1963, BERARDI et GOLDBLATT, 1969, SMITH, 1970, SMITH et CLAWSON, 1970, ABOU-DONIA, 1976). En dehors de ses effets sur les spermatozoïdes de l'homme (BERARDI et GOLDBLATT, 1969 ; ABOU-DONIA, 1976 ; WALLER et al., 1980 ; QIAN, 1984 ; GUI-YUAN et al., 1985 ; JONES, 1985), le gossypol agit sur certains enzymes des testicules (les déshydrogénases et les oxydases) ou du sang (MEKSONGSEE et al., 1970, MORRIS et al., 1986) et sur l'absorption intestinale de la lysine, de la méthionine et de la valine (JONES et SMITH, 1975). Le gossypol diminue également la capacité de transport de l'oxygène du sang et réduit ainsi les constituants hématologiques (TONE et JENSEN, 1974). Il en résulte une baisse de la croissance chez le rat (TONE et JENSEN, 1970). La synthèse du DNA des mammifères est également perturbée par le gossypol (WANG et RAO, 1984).

Du point de vue pharmacologique, certains composés phénoliques ont des activités antibactériennes, antifongiques, antitumorales et laxatives encore peu élucidées (DELAVEAU et VIDAL-TESSIER, 1986). Les orthodiphénols, par un mécanisme indirect dû à la catécholamine (principalement l'adrénaline) et en augmentant la résistance apparente de leurs parois, diminuent le flux sanguin à travers les capillaires (GAZAVE et al., 1974).

PELLETIER et KEITH, (1974), KÜHNNAU, (1976), WILSON et al., (1976), HUGHES et FI-BIOL, (1978) montrent que les flavonoïdes et la vitamine C ont des relations physiologiques bénéfiques chez l'homme et le cobaye.

Certains dérivés du gossypol sont utilisés comme produits antimalariques (VANDER JAGT et al., 1984) et ont également une action sur le parasite (Trypanosoma cruzi) de la maladie du sommeil (BLANCO et al., 1983). Le β aminoéthylsulfonate de sodium du gossypol diminue l'action du virus herpétique (DUSHANBIEVA et BARINSKII, 1981). Le gossypol, le gossypolone et d'autres aldéhydes dérivés du gossypol possèdent des activités antivirales (BARAM et al., 1981) et antitumorales (KUZNETSOVA et al., 1979).

VI - TECHNOLOGIES DES GRAINES A GLANDES ET SANS GLANDE POUR LA FABRICATION DES FARINES ALIMENTAIRES.

1 - Technologie traditionnelle des graines à glandes.

Actuellement, les usines qui traitent les graines de coton sont équipées du système prépression-solvant (double extraction, d'abord par pression, puis à l'hexane) (fig. 7).

Le principal objectif des huileries traditionnelles est la production d'une huile détoxifiée de bonne qualité et en quantité importante.

Après décorticage, les amandes subissent un conditionnement entre 100 et 110° C., puis, sont aplaties pour produire des flocons qui, après taostage à 110° C., passent à la presse. Dans le but de favoriser la percolation de l'huile, 8 à 10 % des coques sont ajoutés avant pressage entre 130 et 150° C. Ce traitement thermique permet l'éclatement des parois cellulaires, la coagulation des protéines et matières muscilagineuses et l'augmentation de la fluidité de l'huile.

L'élévation de la température et le pressage provoquent la combinaison d'une partie du gossypol libre toxique avec d'autres constituants des amandes tels que la lysine et les phospholipides. Le gossypol lié, non toxique, reste fixé dans le tourteau et déprécie sa valeur nutritionnelle. Les farines issues de ce traitement sont fortement colorées, amères, et ne conviennent pas pour fabriquer des aliments de haute valeur nutritionnelle. Leur teneur en azote soluble est très faible.

2 - Revue des méthodes de détoxification des amandes à glandes.

Il existe plusieurs procédés de détoxification des amandes :

- le procédé chimique vise soit :

. à inactiver le gossypol en le combinant avec les sels minéraux (BRAHAM et al., 1967, MAYORGA et al., 1975, GAD et El-ZALAKI, 1980 a),

. à l'extraire du tourteau avec des solvants polaires tels que l'acétone (VACCARINO, 1961, DAMATY et HUDSON, 1975 a), l'acétone-hexane-eau (BRESSANI et al., 1966), le butanol-HCl (CANELLA et SODINI, 1977).

Les farines obtenues sont fortement colorées en brun et conservent encore les traces de solvants parfois toxiques ou de leurs dérivés. C'est

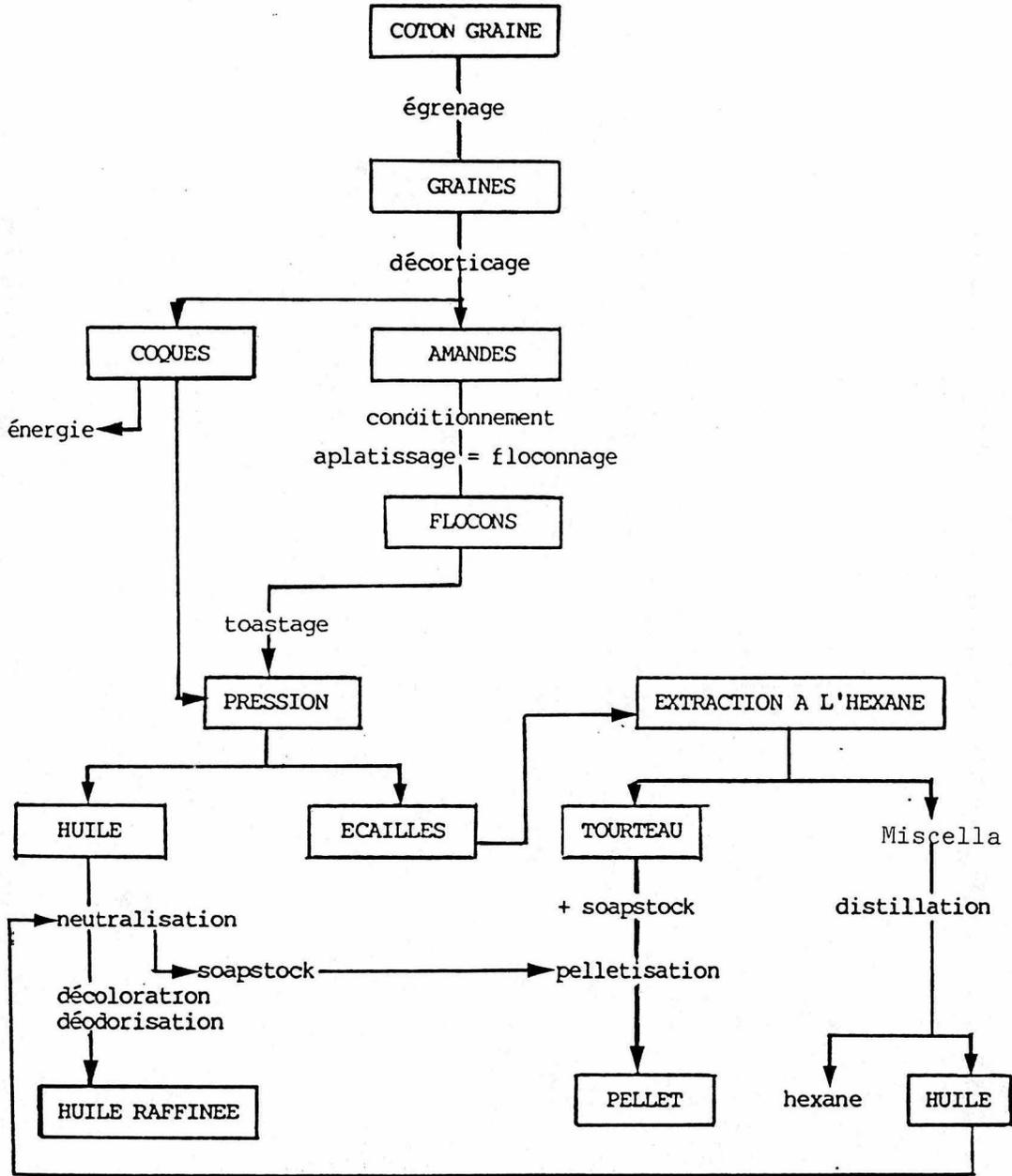


Fig. 7 : Technologie traditionnelle des graines de cotonniers à glandes (d'après BOURELY, 1985).

ainsi que l'oxyde de mésityle, produit de condensation de l'acétone, réagit avec les acides aminés soufrés pour dégager une odeur indésirable (AYLWARD et al., 1967, PEARCE et al., 1967).

- le procédé thermique consiste à provoquer par la chaleur l'éclatement des glandes et la combinaison du gossypol avec d'autres constituants des amandes (GAD et EL-ZALAKI, 1980 b). Les farines obtenues sont fortement colorées.

- le procédé physique vise à séparer les glandes à gossypol intactes, soit :

. par centrifugation différentielle après broyage des amandes dans l'hexane (VIX et al., 1947, 1971; HRON, 1981; HRON et al., 1982).

. par turboséparation à partir de la farine délipidée (KADAN et al., 1980, ZHUGE et al., 1988).

Les techniques de détoxification du gossypol mises au point aux U.S.A. n'ont pas eu les succès attendus à cause de leur complexité et de leurs faibles rendements, car il s'agit d'éliminer le maximum de gossypol toxique sans altérer la couleur, ni la valeur nutritive des farines. En outre, elles souffrent d'une réalisation industrielle difficile.

- l'élimination du gossypol par voie génétique est la solution la plus élégante. Elle consiste à créer des variétés de cotonniers sans gossypol en supprimant les gènes récessifs responsables de la présence des glandes. Cette voie fut ouverte depuis 1959, par la découverte aux Etats-Unis, par Mc MICHAEL (1959, 1960), d'un cotonnier mutant dont les organes végétatifs ne contenaient pas de glandes à gossypol. A partir des graines de ce premier cotonnier "glandless" (fig. 4), les généticiens ont créé, dans plusieurs pays producteurs, toute une gamme de cotonniers sans glande. Pour l'heure, ces variétés ne sont pas encore vulgarisées pour plusieurs raisons :

- une plus grande sensibilité aux insectes, due à l'élimination de l'insecticide naturel que constitue le gossypol (HANNY, 1980, HEDIN et al., 1984, LUSAS et JIVIDEN, 1985).

- les fibres produites par ces variétés ont un rendement à l'égrenage souvent plus faible que les cotonniers ordinaires,

d'où un désintéressement de la part des organismes de développement.

- l'introduction de ces variétés est difficile à réaliser car il faut convaincre le cultivateur qu'il gagnerait plus d'argent avec de nouvelles semences, problème d'autant plus ardu que rien ne lui garantit que l'huilerie achètera plus cher les graines sans glande à gossypol.

3 - Technologie future des graines sans glande

Les cotonniers à glandes constituent l'essentiel des cotonniers cultivés dans le monde. En attendant une éventuelle vulgarisation des variétés sans glande, l'I.R.C.T a déjà défini les traitements technologiques pour la préparation des farines sans gossypol destinées à l'alimentation humaine. Le procédé retenu est celui de l'extraction directe de l'huile à l'hexane (Fig. 8).

Les amandes, conditionnées à 11 % d'humidité, puis floconnées entre 60 et 80° C ou extrudées à froid et à faible pression, sont délipidées par 4 à 6 lavages à l'hexane, suivis d'une désolvantation à une température maximale de 90° C. (BOURELY, 1985). La farine obtenue est de bonne qualité (tableau 9) et convient pour la préparation de divers aliments humains.

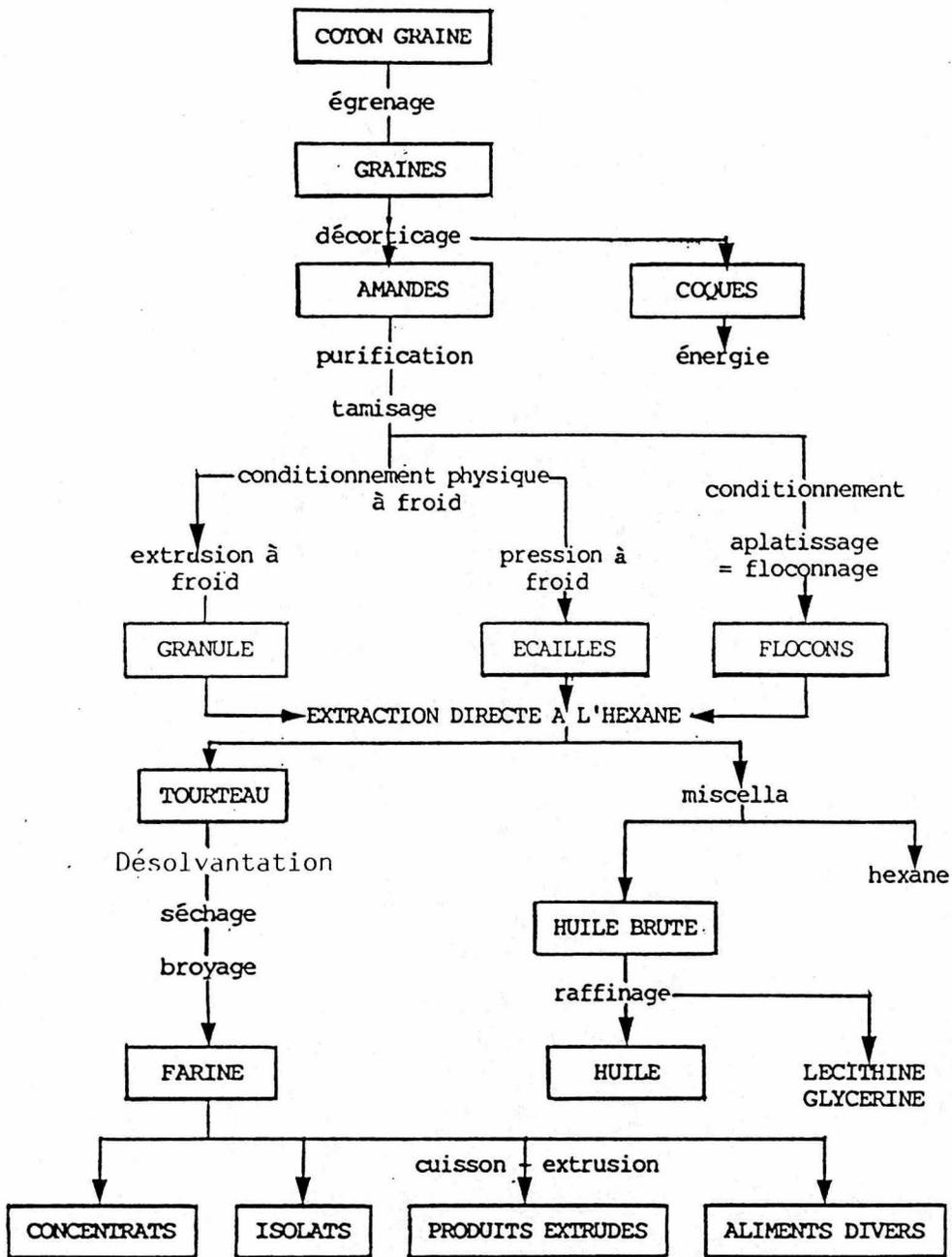


Fig. 8 : Technologie future des graines de cotonniers sans glande (d'après BOURELY, 1985).

Tableau n° 9 : Composition des amandes et farines de prépression-solvant et d'extraction directe à l'hexane, de cotonniers sans glande. Les résultats sont exprimés pour 100 g de matière sèche. (source I.R.C.T.)

	Lipides	Protéines totales N x 6,25	Protéines solubles dans NaOH 0,2 N N x 6,25	Fibres	Cendres
Amandes	36,00	42	91	2,5	4,83
Farines de Prépression- solvant	1,62	41-45	78	12,0	7,30
Farines d'extraction directe à l'hexane	0,53	68	97	3,0	7,00

DEUXIEME PARTIE

MATERIEL ET METHODES

DEUXIEME PARTIE

MATERIEL ET METHODES

A- MATERIEL VEGETAL

I - Nature des échantillons

Quatre variétés de cotonniers sont étudiées (tableau 10).

Trois variétés appartiennent à l'espèce Gossypium hirsutum L. dont deux variétés africaines sans glande, BC4 sélectionnée en Côte d'Ivoire et F281 mise au point au Tchad; une variété bulgare à glandes, Pavlikéni, expérimentée à Montpellier.

Une variété à glandes, Giza 75, cultivée en Egypte et qui appartient à l'espèce Gossypium barbadense L.

Tableau 10 : Nature des échantillons étudiés

ESPECES	Variétés		Lieux de culture
	A glandes	Sans glande	
<u>Gossypium hirsutum</u> L.		BC4	Côte d'Ivoire
		F-281	Tchad
	Pavlikéni	-	Montpellier
<u>Gossypium barbadense</u> L.	Giza 75	-	Egypte

II - Préparation du matériel végétal

Le produit de la récolte se présente sous la forme d'une masse appelée coton-graine. Elle est composée en proportions variables, suivant l'espèce ou la variété, de fibres, de duvet et de graines.

1 - Egrenage

Les égreneuses pilotes permettent la séparation des fibres et des graines.

2 - Délintage

C'est l'opération qui consiste à arracher de la graine les poils courts ou linters (fig. 9a) qui ont persisté après l'égrenage.

Au niveau du laboratoire, les graines vêtues de leur duvet sont imbibées d'acide sulfurique concentré pendant une minute. Les graines nues obtenues sont lavées d'abord à l'eau, puis dans une solution de bicarbonate de sodium 5 N, et rincées abondamment à l'eau du robinet. Elles sont ensuite séchées à l'air libre (fig. 9a).

3 - Décorticage

Au niveau du laboratoire, on utilise une petite décortiqueuse et les amandes sont triées à la main (fig. 9b). On obtient ainsi une matière première qui, broyée, servira aux différentes manipulations.

B- METHODES D'ANALYSE

- Humidité

L'humidité est déterminée par la méthode officielle de l'American Oil Chemist's Society (AOCS, 1958, Aa 3-38).

-Huile brute

I -Teneurs

Les teneurs en huile brute ou résiduelle sont évaluées après

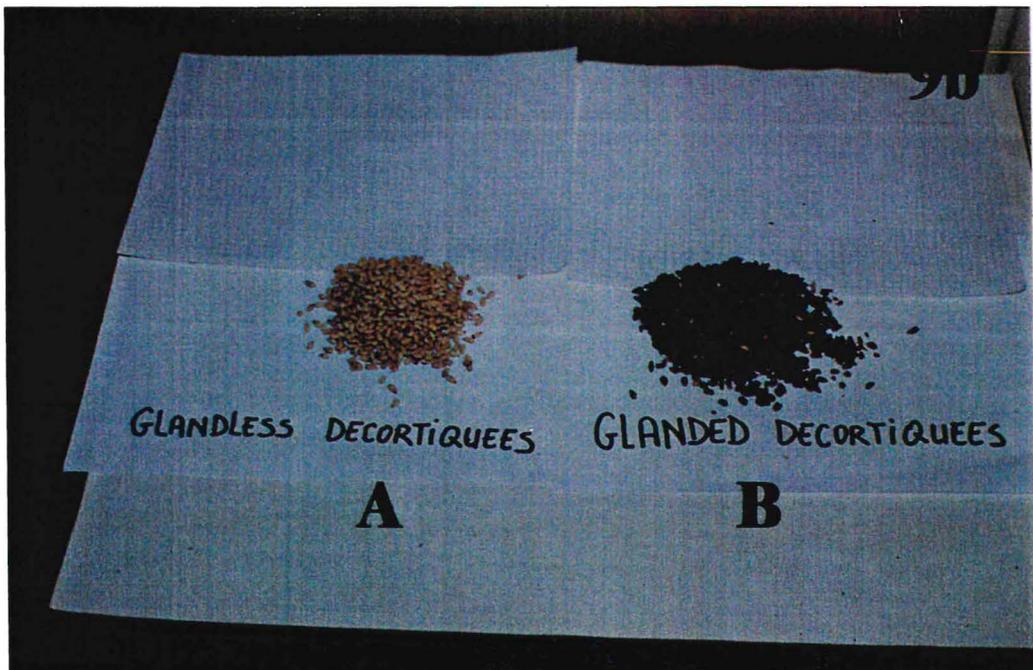
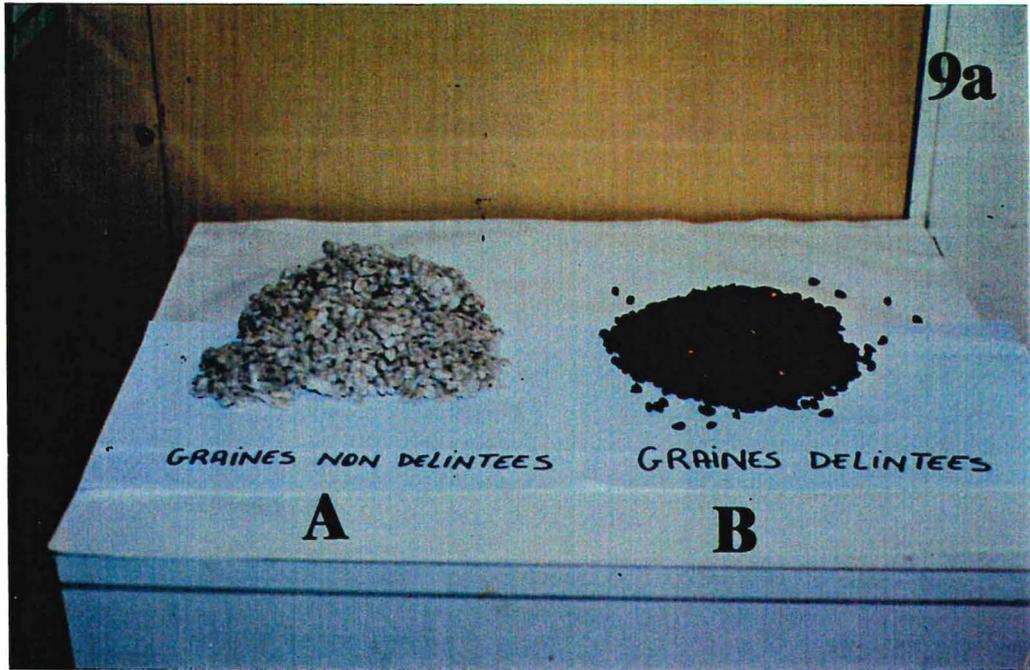


Fig. 9 a :

A - Graines de cotonnier non délintées

B - Graines de cotonnier délintées

Fig. 9 b :

A - Graines de cotonnier sans glande décortiquées (amandes)

B - Graines de cotonnier à glandes
décortiquées (amandes)

extraction au Soxhlet par l'hexane selon le protocole officiel Aa 4-38 défini par l'AACS (1958).

II - Pourcentages des constituants glycéridiques

Le pourcentage de chaque constituant glycéridique des huiles est déterminé par photodensitométrie après chromatographie quantitative sur couche mince.

Les plaques utilisées, de dimension 10 x 20 cm, sont recouvertes de gel de silice G 60 sur 0,25 mm d'épaisseur. 40 μ l de chaque huile, à une concentration de 0,1 % (P/vol) dans l'hexane distillé, sont déposés sur des plaques, en bandes de 15 mm de longueur et de 2 à 3 mm de largeur à l'aide d'un déposeur automatique CAMAG LINOMAT III.

La migration s'effectue pendant 8 minutes dans une cuve de verre contenant l'hexane distillé, le diéthyléther et l'acide acétique glacial dans les proportions respectives 75/25/1 (vol/vol/vol). Les différentes fractions mono, di, triglycérides et acides gras libres sont révélées par pulvérisation d'un mélange à volume égal d'une solution saturée de sulfate de cuivre dans l'eau bouillante et d'acide orthophosphorique.

Les bandes correspondant aux différentes fractions glycéridiques et aux acides gras libres apparaissent après étuvage des plaques pendant 5 minutes à 110° C.

Le pourcentage de chaque composant de l'huile est déterminé à 500 nm à l'aide d'un photodensitomètre à réflexion SCANNER-CAMAG couplé à un intégrateur HITACHI D-2000. Les différents constituants des huiles sont repérés par rapport aux R_f, des témoins de mono, di 1,2, di 1,3, trioléine et d'acide oléique.

- Protéines et acides aminés

I - Azote total et protéines totales

L'azote total est minéralisé selon la technique de KJELDAHL Aa 5-38, décrite par l'AACS (1958). L'ammoniaque est distillée sur l'appareil de NAVELLIER (1958), puis titrée par l'acide sulfurique décimormal en présence d'un indicateur constitué par le rouge de méthyle et le vert de bromocrésol respectivement à 0,066 g ‰ et 0,033 g ‰ dans l'éthanol (Aa 5-38, AACS, 1958).

Le taux des protéines totales est calculé en multipliant la teneur en azote par le facteur conventionnel de 6,25 (ANDERSON et WARNICK, 1966, WALDROUP et al., 1968, W H O , 1973, LAWHON et al., 1977).

II - Azote soluble et protéines solubles

Les protéines solubles sont extraites par la méthode décrite par LYMAN et al., 1953. Le mode opératoire est le suivant :

A un gramme de matière très finement broyée au mortier, on ajoute 100 ml de soude 0,02 N et quelques billes de verre. L'ensemble est incubé à 37° C. sous agitation pendant 1 heure dans un bain-marie. On effectue une centrifugation durant 10 minutes à 5.000 trs/mn. 50 ml du surnageant sont minéralisés, puis analysés comme précédemment. Les protéines solubles sont exprimées en pourcentages par rapport aux protéines totales de la farine initiale.

III -Acides aminés

Les acides aminés sont analysés après hydrolyse acide des protéines suivie d'une dérivatisation par l'orthophtaldialdéhyde, OPA (ROTH, 1971).

- Les protéines sont hydrolysées en milieu chlorhydrique 6 N sous atmosphère d'azote dans un tube pyrex. Environ 50 mg de farine finement broyée sont introduits dans le tube, puis additionnés de 10 ml d'HCl 6 N. L'ensemble est dégazé, soumis à un barbotage d'azote, bouché puis placé à l'étuve à 110° C. pendant 24 heures. Après refroidissement et évaporation à sec à 40° C. au rotavapor, le résidu sec est repris par 10 ml de tampon citrate de sodium 0,2 N à pH 2,2. Une prise d'essai est diluée 100 fois avec le tampon borate 0,4 N (pH 9,5). La dérivatisation est réalisée par l'orthophtaldialdéhyde (OPA) qui, en milieu alcalin et en présence du mercapto-2-éthanol, réagit avec les amines primaires pour former un dérivé fluorescent instable (Fig. 10), (ROTH, 1971).

Le réactif est constitué par 50 mg d'orthophtaldialdéhyde dans 1,25 ml de méthanol, 11 ml de tampon borate 0,4 N (pH 9,5) et de 100 µl de mercapto-2-éthanol.

La réaction de dérivatisation a lieu à température ambiante pendant 2 minutes en mélangeant 50 µl de prise d'essai d'hydrolysats d'acides aminés diluée dans le tampon borate, pour le même volume de réactif.

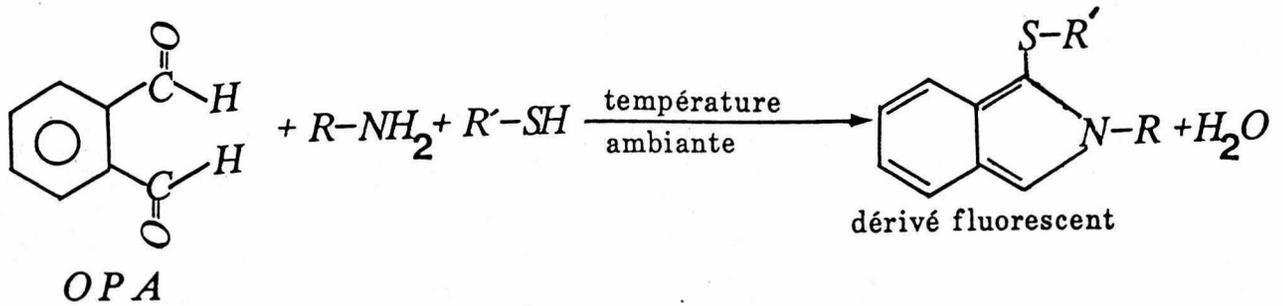


Fig. n° 10 : Réaction des acides aminés ($R-NH_2$) avec l'orthophtaldialdéhyde (O P A) en présence du mercapto-2 éthanol ($R'-SH$). (ROTH, 1971).

- 20 μ l du dérivé formé sont analysés sur un chromatographe H.P.L.C. BECKMAN à 360 nm pour l'excitation et à 455 nm pour la fluorescence. La colonne utilisée, de 12,5 cm de longueur et de 4,6 mm de diamètre interne, est remplie de particules de silice greffée C 18 hypersyl de 3 μ m de diamètre. Les solvants d'élution sont composés d'acétate de sodium 0,02 N et de méthanol pur. Le débit de l'élution est programmé à 1,2 ml/mn (tableau 11).

Tableau 11 : Programme du gradient d'élution des acides aminés

Temps (mn)	méthanol (%)	acétate de sodium 0,02 N (%)
0,0	12,5	87,5
0,30	25	75
8	35	65
13	45	55
16	55	45
20	80	20
25	12,5	87,5

Les acides aminés sont quantifiés par rapport à un mélange standard à 500 μ moles/l dans le tampon citrate de sodium traité dans les mêmes conditions. La cystéine et la cystine sont oxydées après hydrolyse acide, en acide cystéique par 300 μ l de diméthylsulfoxyde, qui est dérivatisé et élué uniquement par l'acétate de sodium.

IV - Dosage du tryptophane

Le tryptophane se décompose durant l'hydrolyse acide des protéines. Il ne peut donc être dosé qu'après une hydrolyse basique, puis déterminé par colorimétrie (FRIEDMAN et FINLEY, 1971), par H.P.L.C. (DE VRIES et al., 1980, NIELSEN et HURRELL; 1985) ou par voie enzymatique (FRIEDMAN et FINLEY, 1971).

La méthode de dosage colorimétrique que nous avons utilisée s'inspire des travaux de SPIES et CHAMBERS, (1948), (1949), SPIES, (1967) et de DE VRIES et al., (1980). Le tryptophane réagit en milieu sulfurique avec le para-diméthylaminobenzaldéhyde (DAB) pour donner un composé chromogène qui, oxydé in-situ par le nitrite de sodium, conduit à un composé chromophore bleu dont l'absorption maximale se situe à 590 nm (fig. 11).

Le protocole suivi est le suivant :

Environ 1 g de matière délipidée et finement broyée est introduit dans un tube pyrex. Après ajout de 4 g d'hydroxyde de baryum (DREZE, 1956) et de 10 ml d'eau déminéralisée, le tube est hermétiquement fermé et l'hydrolyse se réalise pendant 15 heures à l'étuve à 110° C. Après refroidissement à température ambiante, le contenu du tube est transvasé dans un bécher de 40 ml placé dans un bac renfermant des glaçons. Le tube est rincé avec 10 ml de solution tampon phosphate à pH 5,5 (4,40 g de Na_2HPO_4 + 4,40 g de K_2HPO_4 pour 1 l d'eau déminéralisée). La solution de rinçage est ajoutée dans le même bécher. L'hydrolysate est neutralisé sous agitation par l'acide sulfurique 3,6 N ajouté goutte à goutte. Le pH est rigoureusement contrôlé à l'aide d'indicateur de pH jusqu'à une valeur comprise entre 7 et 7,5. Dans ces conditions, 5 à 5,85 ml d'acide sulfurique 3,6 N sont nécessaires pour la neutralisation. Le baryum précipite sous forme de sulfate. L'hydrolysate neutralisé (de couleur blanc laiteux) est transvasé quantitativement dans une fiole de 50 ml qui est complétée au volume avec la solution de tampon phosphate.

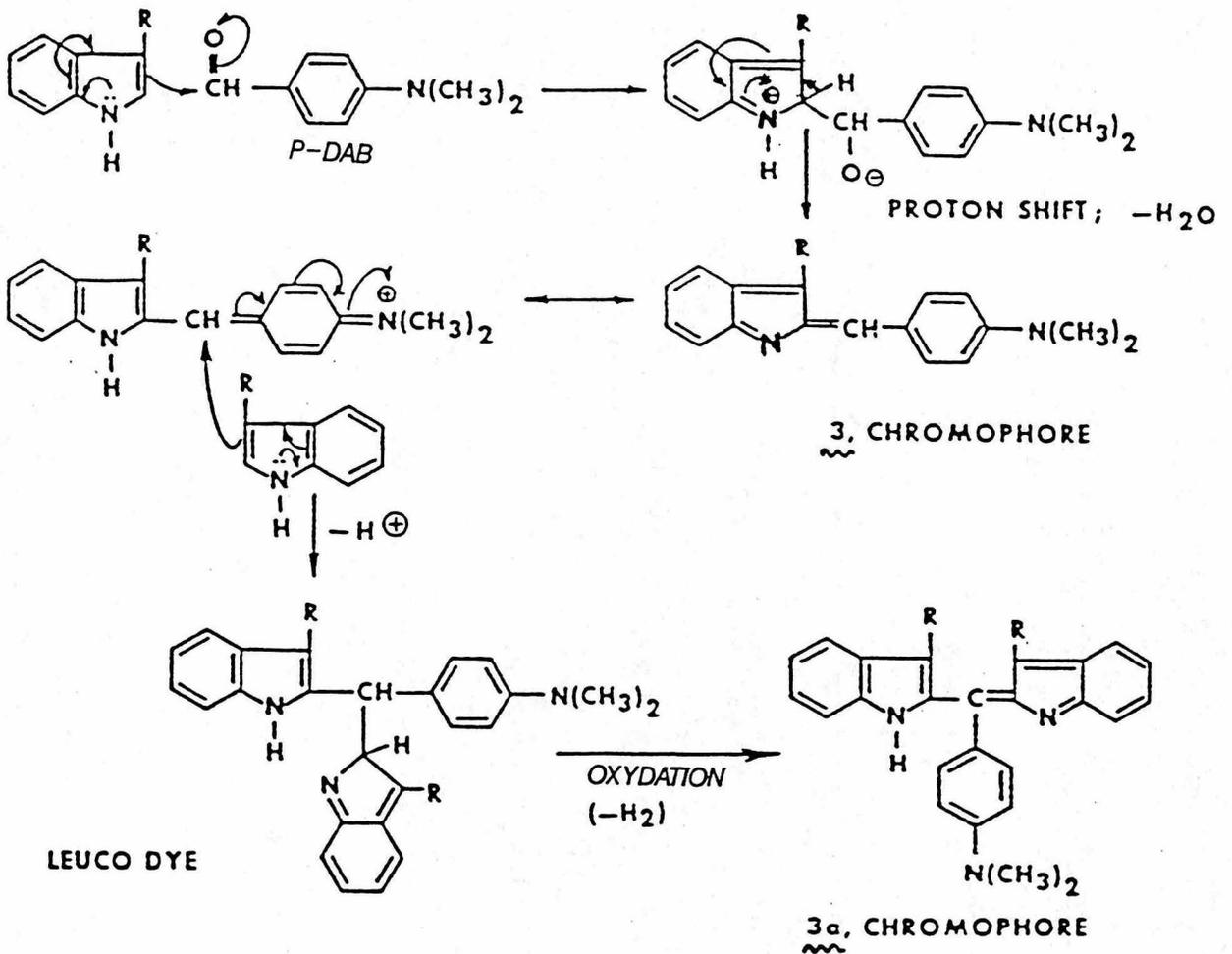


Fig. n° 11 : Mécanisme de formation d'un composé chromophore à partir du tryptophane et du p-diméthylaminobenzaldéhyde (DAB) (FRIEDMAN et FINLEY, 1971).

Un essai à blanc constitué par les seuls réactifs est préparé simultanément dans les mêmes conditions et dans un tube à essai enveloppé de papier d'aluminium, on introduit successivement :

- 8 ml de diméthylaminobenzaldéhyde à 3g/l dans l'acide sulfurique 19 N.

- 1 ml d'hydrolysats neutralisés.

Le mélange est agité, puis laissé au repos pendant 1 heure à l'obscurité. On ajoute alors 0,1 ml de nitrite de sodium à 0,048 % dans l'eau déminéralisée et la couleur bleue du complexe formé se développe à l'obscurité pendant 30 minutes. On mesure la densité optique à 590 nm contre un essai à blanc traité dans les mêmes conditions.

La teneur en tryptophane est déterminée en se reportant à une courbe étalon établie avec une gamme de 10 à 100 µg/ml de L-tryptophane dans le tampon phosphate, traitée dans les mêmes conditions. Trois essais sont effectués pour chaque analyse.

V - Dosage de la lysine disponible

1 - Définition

Des traitements technologiques de types broyage, chauffage, etc... peuvent affecter certains acides aminés, surtout la lysine. Dans ces conditions, le groupement epsilon-amine de la lysine des protéines se combine avec d'autres constituants des aliments pour former des liaisons résistantes aux enzymes digestives. On parle de lysine biologiquement indisponible et chimiquement non réactive par opposition à la lysine biologiquement disponible et chimiquement réactive (fig. 12). La disponibilité des acides aminés est donc un des facteurs importants dans la détermination de la valeur nutritionnelle des protéines.

2 - Principe et choix de la méthode

La détermination chimique de la lysine disponible est basée sur la formation de complexes colorés après hydrolyse acide des protéines. Les principaux réactifs utilisés sont :

- le 1 fluoro 2,4 dinitrobenzène (FDNB) (CARPENTER, 1960, 1973),

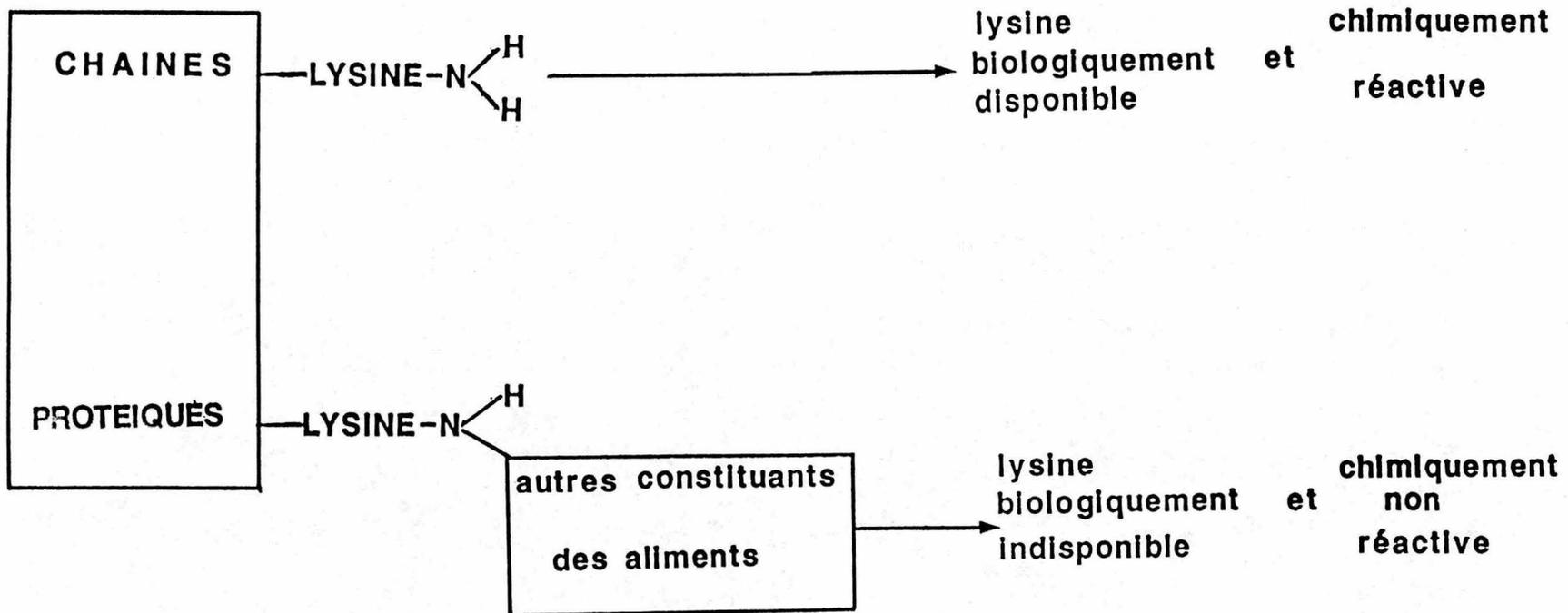


Fig 12 Définitions théoriques des formes de la lysine dans les aliments

- l'acide 2,4,6 trinitrobenzène sulfonique (TNBS) (KAKADE et LIENER, 1969),

- l'acide orange 12 et l'orange G (colorants de UDY) (ASHWORTH, 1966, UDY, 1971).

Nous avons utilisé l'acide 2,4,6 trinitrobenzène sulfonique qui forme avec la lysine, un complexe jaune de trinitrophényllysine mesuré colorimétriquement après hydrolyse acide (fig. 13).

3 - Protocole expérimental

10 g de farine finement broyée sont pesés dans un tube à essai. On ajoute 1 ml de NaHCO_3 à 4 % dans l'eau distillée (pH 8,5) et après incubation à 40° C. pendant 10 minutes, on additionne 1 ml d'acide 2,4,6 trinitrobenzène sulfonique (TNBS) à 1 % fraîchement préparé dans l'eau distillée. L'incubation est poursuivie pendant deux heures à la même température. 3 ml d'HCl concentré sont versés et le tube, hermétiquement bouché, est placé à l'étuve à 120° C. pendant une heure, avec un essai à blanc constitué uniquement des réactifs.

Après refroidissement à température ambiante, les contenus des tubes sont dilués avec 5 ml d'eau distillée, puis filtrés sur papier. Afin d'éliminer les α amino-TNP des autres acides aminés et des peptides, on effectue trois lavages dans une ampoule à décanter avec 3 x 10 ml de diéthyléther. On élimine les traces de ce solvant de la phase aqueuse en plaçant les tubes dans un bain-marie à 40° C. pendant 30 minutes.

Une prise d'essai de 5 ml est introduite dans une fiole jaugée de 25 ml, additionnée de 7 ml d'HCl normal, puis complétée au volume avec l'eau distillée. La densité optique du complexe jaune d' ϵ -TNP-lysine est déterminée à 346 nm contre l'essai à blanc. L'absorbance relevée permet de calculer la teneur en lysine disponible à partir de l'absorptivité molaire d'epsilon-TNP-lysine ($\epsilon = 1,56 \times 10^4$ /M/cm) (KAKADE et LIENER, 1969) et du poids moléculaire de la lysine (PM = 146,19 g/mole).

Les résultats sont exprimés en grammes de lysine disponible pour 100 g de matière sèche.

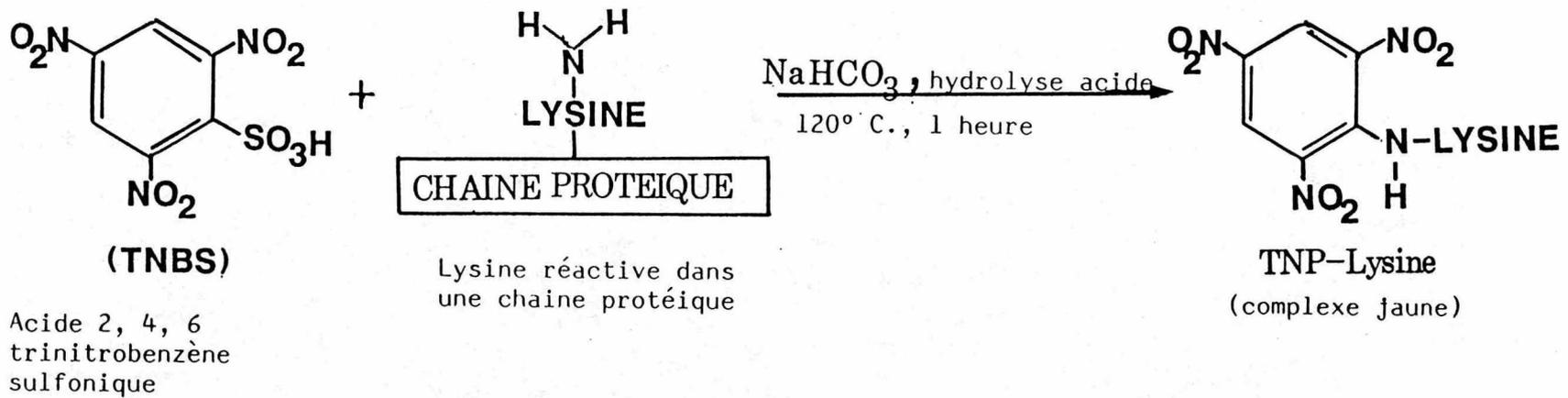


Fig. n° 13 : Estimation de la lysine disponible

- Sucres solubles totaux

Pour doser les sucres solubles totaux, on peut utiliser la C C M (CHAMPAGNOL et BOURZEIX, 1971, DOAT, 1974, HANSEN, 1975), la colorimétrie (DUBOIS et al., 1956), la C P G (TAHA, 1986) et l'H.P.L.C. (CEGLA et BELL, 1977).

Nous avons employé la CCM (BOURELY, 1980), qui donne des valeurs voisines de la C P G (TAHA, 1986), pour doser les principaux sucres des amandes de cotonniers.

I - Extraction des sucres solubles totaux

5 g de matière finement broyée sont traités au reflux, par 50 ml d'éthanol 80° G.L. à ébullition pendant une demi-heure. Après refroidissement, on centrifuge et on extrait à nouveau les sucres solubles du résidu solide par 30 ml d'alcool. On procède comme précédemment, puis on mélange les extraits alcooliques dans une fiole jaugée de 100 ml que l'on complète au volume.

II - Chromatographie sur couche mince

5 ml de l'extrait alcoolique sont évaporés à sec dans un ballon, puis repris par 1 ml d'eau distillée.

Pour l'analyse quantitative, on utilise des plaques de silice G 60 (20 x 20 cm et 0,25 mm d'épaisseur) sans indicateur de fluorescence et tamponnées par une solution aqueuse d'acide borique 0,1 N. On sèche la plaque avant de l'activer à l'étuve à 100° C. pendant une heure.

A 2 cm de la base, sur toute la longueur de la plaque, et sur les points équidistants de 0,9 cm, on effectue après chaque 1,8 cm, des dépôts successifs de 1 μ l de chacune de 6 solutions témoins de sucres. Chacun des témoins contient une quantité identique de glucose, fructose, saccharose, raffinose et stachyose respectivement à des concentrations de 0,5; 1; 2; 3; 4 et 5 g/l. De part et d'autres des témoins, on dépose 1 μ l de la solution à analyser. Les taches sont séchées à l'air chaud et la plaque est ensuite placée dans une cuve de verre contenant un mélange fraîchement préparé de l'éluant composé de méthanol, acétate d'éthyle, acide acétique et d'eau distillée dans les proportions respectives 10/60/15/10 (vol/vol).

On procède à 3 développements successifs d'une heure à température ambiante et en atmosphère sèche (entre deux développements, la plaque est séchée à l'air chaud). La révélation des sucres est effectuée par pulvérisation d'un mélange composé de 2 g de diphénylamine dans l'aniline, l'acétone, l'acide phosphorique à 80 % dans les proportions respectives de 2/10/15 (vol/vol/vol).

Les taches correspondant à chaque sucre apparaissent après chauffage de la plaque à l'étuve à 110° C. pendant 15 minutes. Le fructose et le glucose sont respectivement rose et bleu. Les oligosaccharides ont des teintes bleues. On compare la dimension et la coloration des taches de chacun des sucres inconnus avec celles des témoins. On calcule la concentration de chaque sucre en g/l pour 1 µl de l'extrait déposé. Connaissant la prise d'essai de la solution mère, et en fonction du poids de l'échantillon, on détermine la teneur en sucre en g/100 g de matière sèche.

La somme des différentes teneurs constitue les sucres solubles totaux.

- Les composés phénoliques

I - Extraction

1- Extraction des composés phénoliques

1-1 - Essais pour déterminer un solvant
convenable

Chacun des solvants suivants a été étudié pour extraire les composés phénoliques des amandes de cotonniers :

- 1-Ethanol aqueux à 80 %
- 2-Méthanol aqueux à 80 %
- 3-Acétone-hexane-eau 53/44/3 (vol/vol/vol)
- 4-Acétone-acétate d'éthyle-eau 80/10/10 (vol/vol/vol)
- 5-Méthanol 80 %-éthanol 80 % 1/1 (vol/vol)
- 6-Ethanol à 95° G.L.

Chacun des solvants est conservé à 4° C pendant 24 heures, dans une chambre froide avant son utilisation.

Les amandes sont broyées dans un mortier en porcelaine en présence d'azote liquide ; 100 ml de chacun des solvants sont utilisés pour extraire à 25° C. et pendant 45 minutes, les composés phénoliques des prises d'essai de 1,5 g d'amandes broyées. Les extraits sont filtrés sous vide, évaporés à sec à 40° C., puis repris et complétés à 200 ml avec l'éthanol à 80 %.

Les spectres des extraits correspondant à chacun des 6 solvants sont enregistrés à l'aide d'un spectrophotomètre PERKIN ELMER 551 muni d'un enregistreur PERKIN ELMER 56.

Pour les extraits contenant du gossypol, les densités optiques sont lues à 370 nm (maximum d'absorption du gossypol). Pour ceux qui n'en renferment pas, les absorbances sont déterminées à 270 nm (maximum d'absorption dû à la seule présence des composés autres que le gossypol).

Les plus fortes densités optiques sont obtenues avec les solvants 1, 3 et 5 (tableau 12).

Le fait de donner de très fortes densités optiques ne prouve pas que les solvants utilisés (par exemple les solvants 3 et 5 pour les extraits sans glande) extraient plus de composés phénoliques. Elles sont dues à la fois à la présence des composés phénoliques et d'autres constituants des amandes. Par conséquent, elles ne nous permettent pas de justifier la présence des seuls composés phénoliques. Nous avons eu recours à la C C M pour recenser le nombre des composés phénoliques extraits par chacun des six solvants, selon la méthode décrite à la page 57. Le maximum de composés phénoliques ayant été obtenu avec le solvant 1 (éthanol à 80 %), c'est ce dernier que nous utiliserons dans la suite de notre travail.

1-2 Protocole retenu pour l'extraction des composés phénoliques autres que le gossypol libre.

Le protocole suivi est celui décrit par FLEURIET et MACHEIX, 1972 (fig. 14).

Environ 4 g d'amandes broyées sont traités sous agitation avec 100 ml d'éthanol à 80 % à froid pendant 45 minutes. On filtre et on poursuit l'extraction du résidu solide 4 fois avec le même solvant durant 15 minutes. L'ensemble des filtrats constitue l'extrait hydroalcoolique brut des composés phénoliques totaux.

Tableau n° 12 : Comparaison des densités optiques des extraits des composés phénoliques d'amandes de cotonniers avec ou sans glande avec différents solvants.

N°	Solvants utilisés	Variété à glandes PAVLIKENI D.O. à 370 nm	Variété sans glande BC4 D.O. à 270 nm
1	Ethanol à 80 %	1,70	1,14
2	Méthanol à 80 %	1,60	1,11
3	Acétone-Hexane-Eau 53/44/3 (vol/vol/vol)	1,71	4,76
4	Ethanol à 95°	1,10	1,09
5	Acétone-Acétate d'Ethyle-Eau 80/10/10 (vol/vol/vol)	2,12	3,00
6	Méthanol à 80 % - Ethanol à 80 % 1/1 (vol/vol)	1,26	0,41

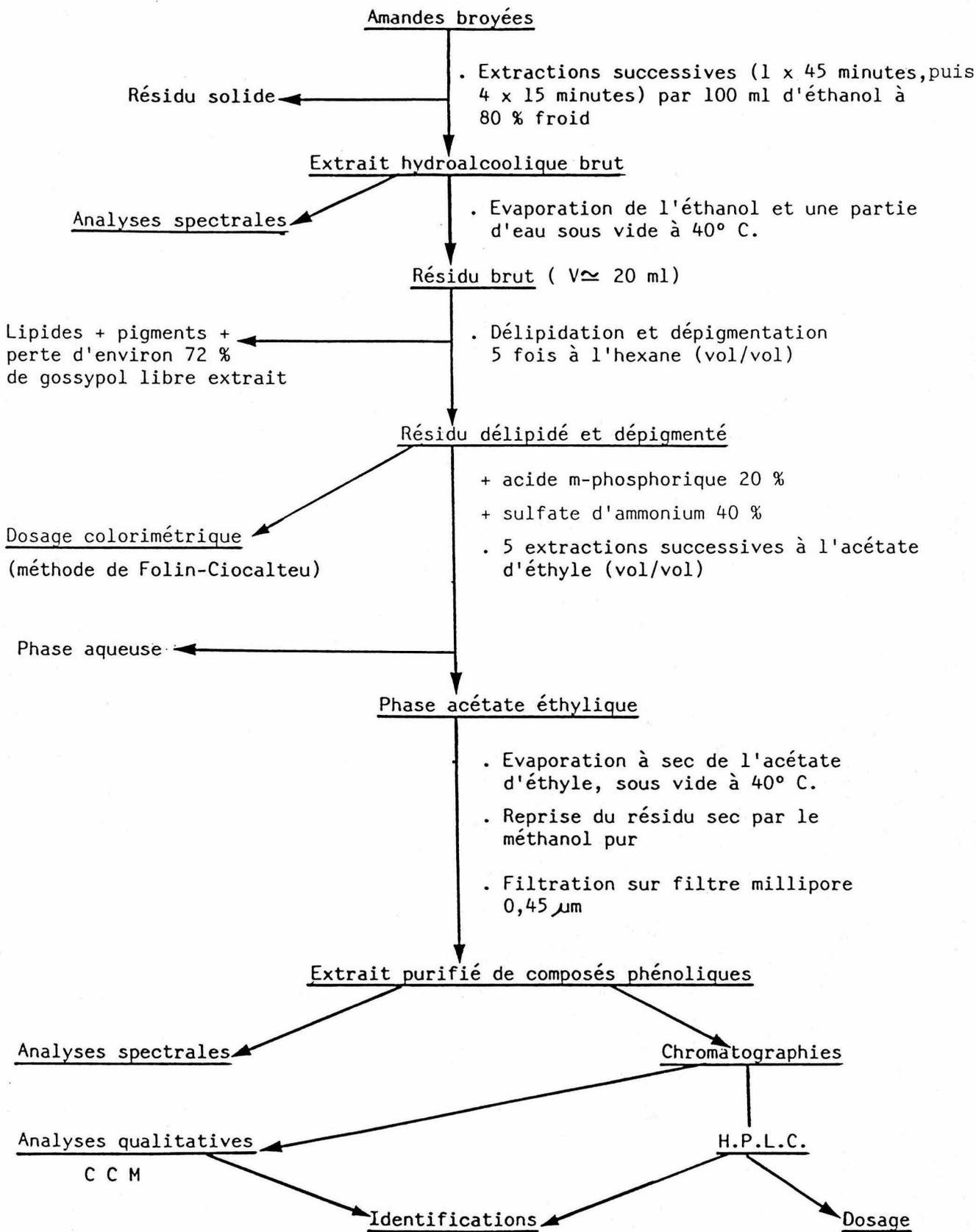


Fig. n° 14 : Protocole d'extraction des composés phénoliques des amandes des graines de cotonniers.

1-3 Délipidation complémentaire de l'extrait hydroalcoolique

L'extrait hydroalcoolique renferme de nombreuses substances solubles non phénoliques, en particulier des matières grasses, des sucres, des protéines, des acides aminés, des caroténoïdes et d'autres pigments. Afin de le délipider, il est concentré sous vide à 40° C. à l'aide d'un évaporateur rotatif jusqu'à l'obtention d'un résidu d'environ 20 à 25 ml à partir duquel seront extraites les substances liposolubles. Pour cela, le résidu obtenu est lavé par un volume égal d'hexane dans une ampoule à décanter. 5 lavages avec le même volume d'hexane permettent de délipider totalement le résidu. Les lipides qui passent dans la phase supérieure en même temps qu'une partie du gossypol sont éliminés. Nous avons déterminé par dosages colorimétriques (voir page 62) que la perte en gossypol s'élevait à environ 72 % du gossypol présent dans le résidu. Ceci rend par conséquent impossible la détermination de la teneur en gossypol libre en même temps que celle des autres composés phénoliques.

1-4 Purification du résidu délipidé.

Les composés phénoliques du résidu délipidé qui contient encore d'autres substances non phénoliques sont extraits 5 fois par un volume égal d'acétate d'éthyle (FLEURIET et MACHEIX, 1972, MACHEIX, 1974) (voir plus haut, Fig. 14) dont la force ionique est renforcée et le pH diminué par ajout de sulfate d'ammonium et d'acide m-phosphorique respectivement à 20 et 2 % en concentrations finales. Les sucres et les autres composés polaires restent en totalité dans la phase aqueuse (FLEURIET et MACHEIX, 1972, MACHEIX, 1974).

Certains composés polaires comme les anthocyanosides ne sont cependant pas extraits par l'acétate d'éthyle dans ces conditions (POESSEL, 1983). Après purification, les différentes fractions de composés phénoliques sont réunies, évaporées à sec à 40° C., récupérées par le méthanol pur et constituent ainsi l'extrait méthanolique final.

2 - Extraction du gossypol

2-1 Gossypol libre

Pour extraire le gossypol libre, nous avons utilisé l'acétone aqueuse à 70 % (PONS et GUTHRIE, 1949) qui est le solvant préconisé par la méthode officielle Ba 7-58 de l'AACS (1958).

Une prise d'essai d'environ 0,25 g de matière broyée est agitée pendant 1 heure à la température du laboratoire avec 50 ml d'acétone aqueuse à 70 % (Fig. 15). Les glandes éclatent et le gossypol se dissout dans le solvant. La solution de gossypol libre est filtrée sous vide, recueillie dans une fiole jaugée de 50 ml puis complétée au volume avec le même solvant d'extraction. Cette solution acétonique de gossypol servira aux dosages.

Bien que l'acétone aqueuse extrait d'autres composés phénoliques et des lipides, leur présence n'interfère pas dans le dosage du gossypol libre par H.P.L.C. lorsque la prise d'essai est suffisamment faible.

Le gossypol combiné aux autres constituants des amandes lors de leur broyage n'est pas hydrolysé dans ces conditions et les étapes de délipidation et de purification de l'extrait ne sont pas nécessaires.

Pour les analyses par H.P.L.C., il est important d'éliminer l'acétone, qui présente une forte absorption en UV entre 250 et 280 nm qui est la plage des longueurs d'onde d'absorption du gossypol. Pour cela, l'extrait acétonique de gossypol libre est évaporé sous vide à 30° C. jusqu'à un volume très réduit (environ 2 à 5 ml). On obtient un résidu liquide qui est repris par un mélange de méthanol et de diéthyléther 95/5 (vol/vol) et complété à 10 ou 20 ml par le même mélange. Cette solution méthanolique de gossypol libre servira aux analyses par H.P.L.C. (Fig. 15).

2-2 Gossypol total

Le gossypol combiné ou lié n'est pas soluble dans les solvants aqueux. Sa libération nécessite une hydrolyse par l'acide oxalique (Ba 8-55, AACS., 1958,) ou acétique (PONS et al., 1958). Le gossypol libre et le gossypol décombiné passent simultanément en solution, constituant ainsi le gossypol total.

Nous utiliserons l'acide oxalique (AACS., 1958, Ba 8-55) lorsque la matière solide ne sera pas récupérée après l'hydrolyse. Par contre, nous employerons l'acide acétique (PONS et al., 1958) toutes les fois que les résidus solides devront faire l'objet d'analyses. En effet, l'hydrolyse à l'acide acétique est plus douce, elle ne dure que 30 minutes au lieu de 6

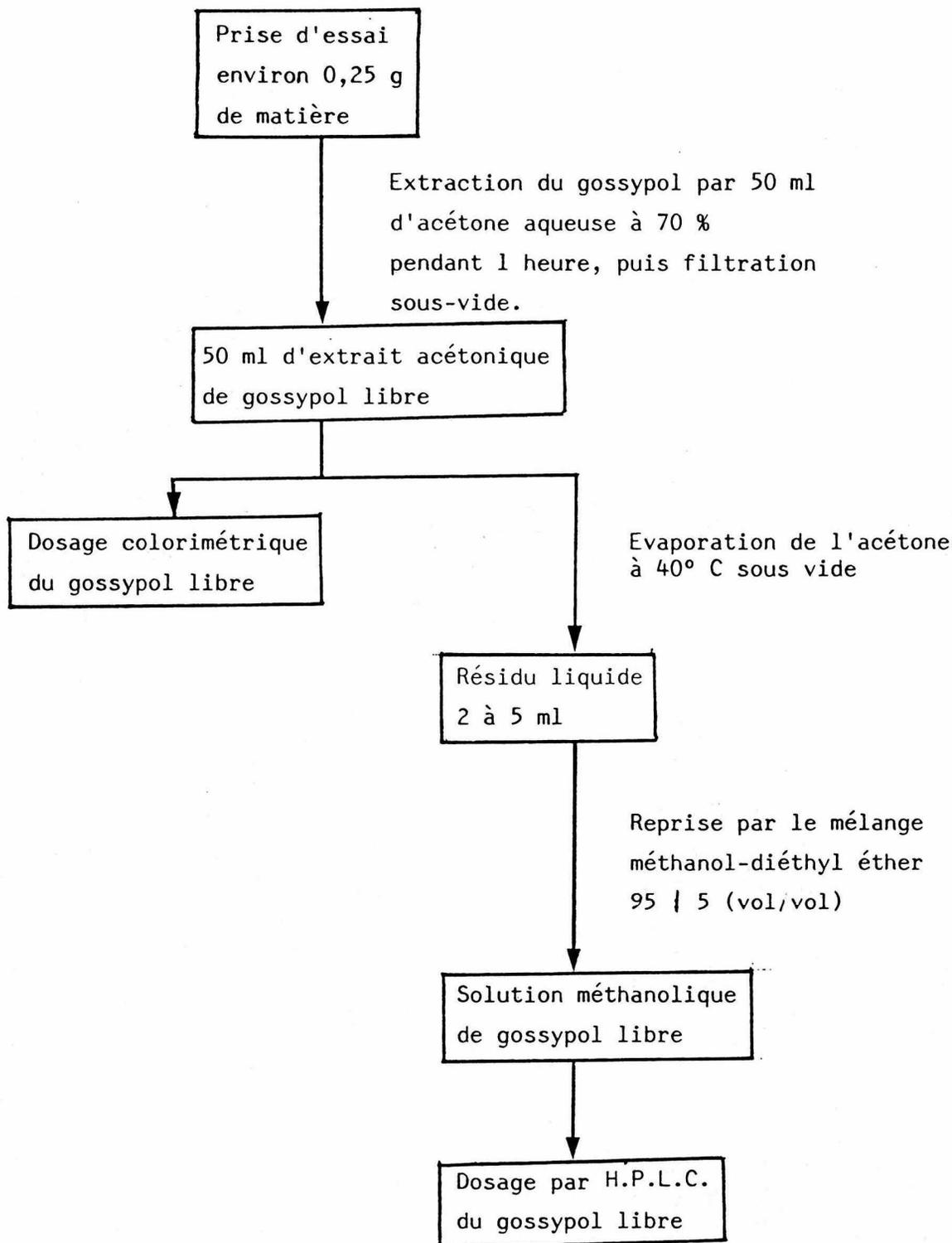


Fig. n° 15 : Protocole d'extraction et de dosage du gossypol libre

heures et même plus pour l'acide oxalique. En outre, l'usage de l'acide oxalique nécessite une neutralisation de l'hydrolysate par l'acétate de baryum, ce qui ne permet pas d'obtenir un résidu solide pouvant être analysé.

Nous employerons ces deux méthodes en parallèle, pour établir une comparaison entre la méthode officielle AOCS de dosage du gossypol total, qui est plus longue et celle de PONS et al., (1958) qui est par contre plus courte et simple.

2-2-1 Hydrolyse par l'acide oxalique

0,25 g de matière broyée est hydrolysée pendant 6 heures à 75° C. par 25 ml d'une solution aqueuse d'acide oxalique 0,2 M dans un mélange azéotrope de méthyléthylcétone et d'eau. Après refroidissement, on ajoute 25 ml d'acétone aqueuse à 70 % et 5 ml d'acétate de baryum 0,5 M dans l'eau distillée. L'ensemble est agité pendant 5 minutes et laissé au repos durant 15 minutes pour permettre la précipitation complète de l'excès d'acide oxalique, sous forme d'oxalate de baryum. Après filtration sous vide, le volume est complété à 100 ml avec l'acétone aqueuse à 70 %. On obtient ainsi une solution acétonique de gossypol total qui servira aux dosages (Fig. 16).

Par dosages H.P.L.C. ou colorimétriques, nous avons déterminé si l'hydrolyse du gossypol combiné n'était pas complète avant 6 heures. Pour les dosages colorimétriques, on prépare dans les mêmes conditions, un essai à blanc contenant uniquement 25 ml d'acide oxalique 0,2 M.

L'analyse du gossypol total par H.P.L.C. nécessite comme précédemment l'élimination de l'acétone et de la méthyléthylcétone et la dilution du résidu sec à un volume fixe par le mélange méthanol-diéthyléther 95/5 (vol/vol).

2-2-2 Hydrolyse par l'acide acétique

L'hydrolyse par l'acide acétique (PONS et al. 1958) est suivie d'une complexation du gossypol par l'amino-3-propanol-1 (A3P1) dans le N,N, diméthylformamide (DMF) (Fig.17). Le protocole est le suivant :

- 0,25 g de matière broyée est hydrolysé pendant 30 minutes, au bain-marie bouillant, en présence de 10 ml d'agent complexant constitué de 2 ml d'amino-3-propanol-1, 10 ml d'acide acétique glacial et de 88 ml de N,N diméthylformamide pur (Fig. 18).

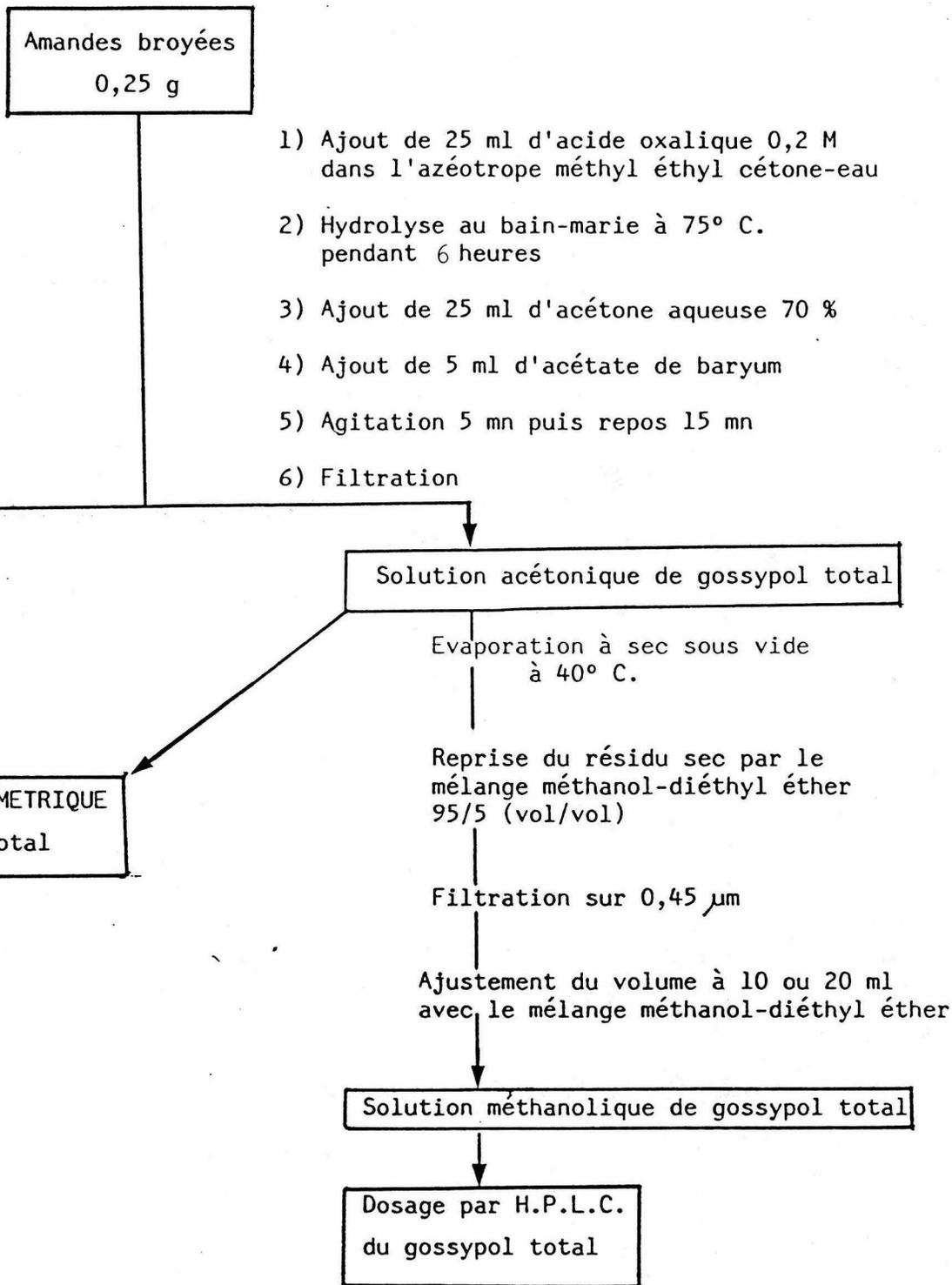


Fig. n° 16 : Protocole d'extraction et de dosage du gossypol total par l'acide oxalique

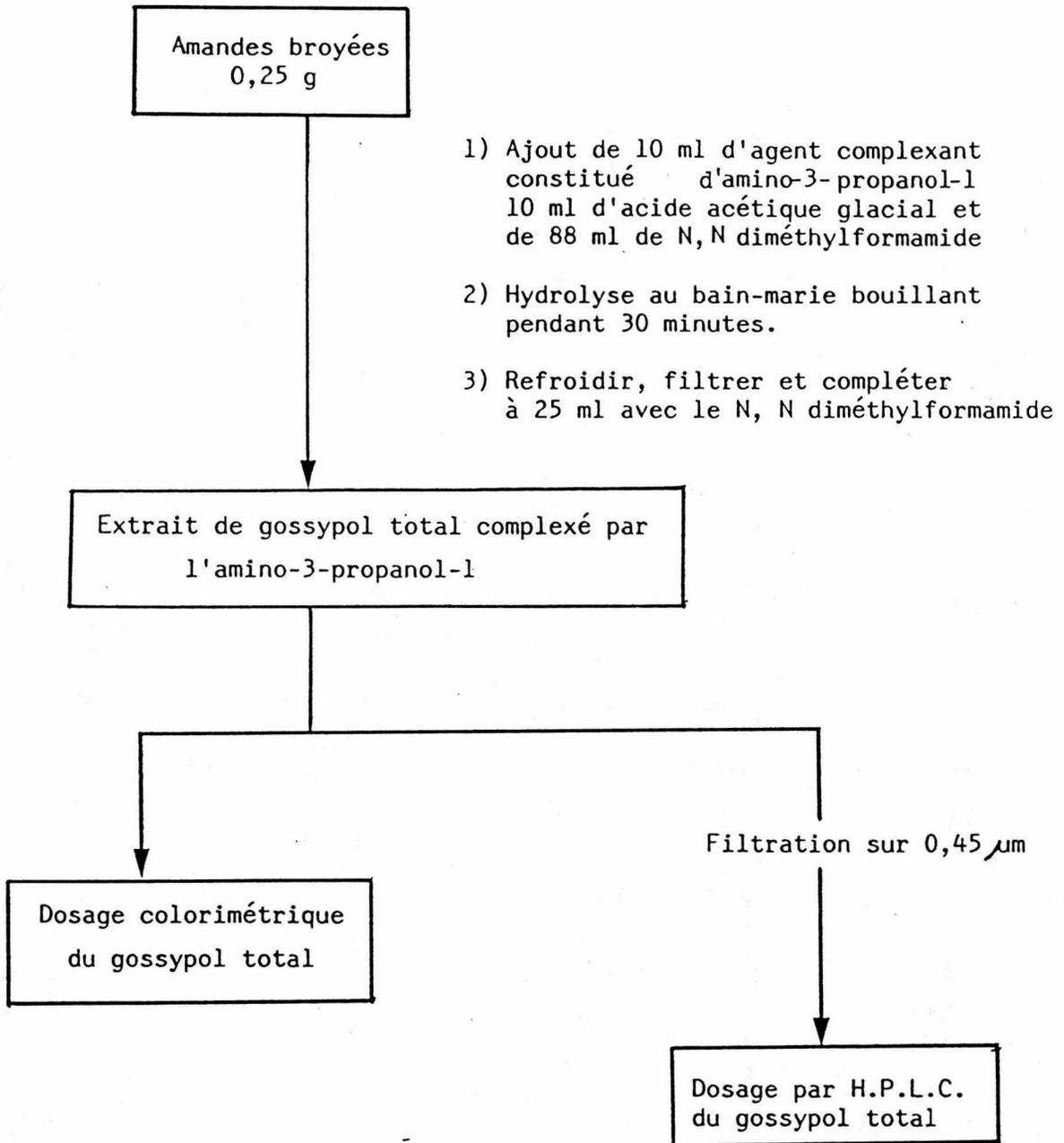


Fig. n° 18 : Protocole d'extraction et de dosage du gossypol total après hydrolyse par l'acide acétique

Après refroidissement, la solution de gossypol total est filtrée sur papier, dans une fiole de 25 ml, puis complétée au volume par le N, N diméthylformamide. On obtient une solution mère de gossypol total qui servira aux analyses colorimétriques et H.P.L.C. (Fig. 18).

3 - Préparation du gossypol témoin

Quelle que soit la méthode de détermination des teneurs en gossypol, il est nécessaire d'utiliser un témoin de gossypol. Le gossypol pur ne se conservant pas, on est amené à réaliser un complexe avec l'acide acétique, le gossypol-acétique qui est beaucoup plus stable. La méthode de préparation du gossypol-acétique que nous avons utilisée s'inspire des travaux de CARRUTH, (1918), KING et THURBER, (1953), PONS et al., (1959).

3-1 Préparation des amandes

Les amandes à glandes sont préalablement délipidées à l'hexane, au SOXHLET, pendant 11 heures selon la méthode Aa 4-38 de l'AACS (1958). La farine obtenue est séchée sous une hotte ventilée durant une journée.

3-2 Extraction du gossypol

Le gossypol est extrait au reflux à 75° C. pendant deux heures par une solution d'acide oxalique 0,2 M dans la méthyléthylcétone distillée (1 ml de solvant pour 0,9 g de farine délipidée). Cette opération permet en même temps l'hydrolyse du gossypol combiné, ainsi que la dissolution du gossypol libre.

L'extrait contenant le gossypol total est refroidi à 37° C., filtré, transvasé dans un bécher, puis réfrigéré à 10° C. On obtient une phase supérieure qui contient essentiellement du gossypol. La phase inférieure, renfermant les phosphatides est lavée 3 fois avec un peu de méthyléthylcétone distillée. Les phases supérieures réunies constituent l'extrait total de gossypol qui est concentré 3 fois environ sous vide à 40° C.

3-3. Purification et combinaison du gossypol avec l'acide acétique

En présence d'excès d'acide acétique glacial, il se forme des cristaux du complexe équimolaire de gossypol et d'acide acétique (CARRUTH, 1918, CHANGFU et al., 1982) stabilisés uniquement par les interactions de Van der Waals (CHANGFU et al., 1982). L'extrait concentré de gossypol est additionné d'acide acétique glacial (1 volume d'extrait pour 3 volumes d'acide), puis agité pendant une heure à la température du laboratoire (environ 25° C.). Le complexe de gossypol-acétique se forme à l'obscurité pendant 48 heures. Le surnageant est écarté avec précaution et le complexe de gossypol-acétique formé redissous dans un mélange à volume égal de méthyléthylcétone et d'hexane distillés. La précipitation du complexe de gossypol-acétique est reconduite par ajout d'acide acétique glacial (1 volume de complexe de gossypol-acétique pour 3 volumes d'acide). Après 48 heures le gossypol complexé est séché sous vide à 40° C. avant de séjourner dans un dessiccateur pendant 5 jours.

La pureté du produit, 98 %, est vérifiée par H.P.L.C.

L'analyse spectrale du complexe de gossypol-acétique dans le méthanol entre 200 et 450 nm montre des maxima d'absorption à 270 et à 360 nm semblables à ceux d'un extrait de gossypol.

Le facteur de conversion du complexe de gossypol-acétique en gossypol pur est de 0,896 en considérant que 27,9 mg du complexe correspondent à 25 mg de gossypol pur (HOFFPAUIR et al., 1960).

II - Séparations chromatographiques

1 - Choix des techniques utilisées

La séparation chromatographique des composés phénoliques peut être :

- qualitative, pour la séparation et l'identification éventuelle des composés phénoliques,
- quantitative, pour l'estimation de leurs teneurs,
- semi-préparative, pour l'obtention des produits purifiés.

La chromatographie sur papier et la chromatographie sur couche mince ont servi depuis longtemps à la séparation des composés phénoliques sous toutes leurs formes (RIBEREAU-GAYON, 1968, MACHEIX, 1974).

La chromatographie liquide sur colonne semi-préparative sur divers types d'absorbants (polyamide, Sephadex G-15, LH20) a été utilisée pour isoler les familles de composés purs (JOHNSTON et al., 1968, REPÁŠ et al., 1969, LEA et CRISPIN, 1971, YOKOTSUKA et al., 1978). Elle a été appliquée au cotonnier pour purifier les flavonoïdes des amandes de la variété sans gossypol (BLOUIN et CHERRY, 1980, BLOUIN et al., 1981).

La chromatographie en phase gazeuse avec divers types de phases, OV-17 (MAGA et LORENZ, 1974), OV-1 (DABROWSKY et SOSULSKI, 1984 a et b) a déjà permis la séparation des acides phénoliques des amandes de cotonniers.

La chromatographie liquide à haute performance (H.P.L.C.) en phase inverse offre un gain de temps, moins de perte d'échantillon et se déroule à température ordinaire. L'H.P.L.C. fut développée pour la séparation des composés phénoliques, par WULF et NAGELS, (1976), NAGELS et PARMENTIER, (1976) et les conditions d'analyses furent définies par MURPHY et STUTTLE, (1978), GRODZIŃSKA-ZACHWIEJA et al., (1979) ; PRICE et al., (1979), ROSTON et KISSINGER, (1982) et NISSERON et al., (1984).

La seule H.P.L.C. ne permet pas cependant de caractériser et d'identifier tous les composés phénoliques par leur temps de rétention. On doit, pour cela, avoir recours à d'autres techniques telles que la spectroscopie de masse et infra-rouge qui sont onéreuses.

Pour les amandes de cotonniers, l'H.P.L.C. n'a été utilisé que pour la séparation du gossypol libre (ABOU-DONIA et al., 1981, NOMEIR et ABOU-DONIA, 1982, 1985).

Pour notre travail, nous avons employé successivement :

- la chromatographie bidimensionnelle sur couche mince de cellulose pour séparer les différents groupes de composés phénoliques.
- la chromatographie liquide à haute performance à détecteur avec ou sans barrettes de diodes pour séparer, caractériser et doser ces composés.

Afin de respecter notre objectif qui est celui de la détoxification des amandes, nous nous sommes surtout attaché à caractériser, par ces deux techniques, les différents groupes de composés phénoliques.

2 - Chromatographie sur couche mince

10 à 30 μ l d'extrait purifié de composés phénoliques préparé selon le protocole déjà décrit (Fig. 14) sont déposés sur des plaques en aluminium (20 x 20 cm) recouvertes d'une couche de cellulose de 0,1 mm d'épaisseur, sans indicateur de fluorescence. La chromatographie est ascendante et bidimensionnelle.

2-1. Choix de solvant de migration

Nous avons essayé plusieurs systèmes de solvants pour séparer les composés phénoliques des amandes de cotonniers (Fig.19).

Les systèmes 1,2 et 6 permettent d'obtenir de bonnes séparations, avec un même nombre de composés repérés sur les chromatogrammes. Nous avons finalement retenu le seul système 6 : M.F.E. 3/1/2 (vol/vol) (phase supérieure) en première dimension et l'acide acétique à 5 % en deuxième. La M.F.E. permet de séparer finement les divers isomères de l'acide chlorogénique (MACHEIX, 1974). L'acide acétique ou l'acide formique, dans les proportions de 2 à 15 % sont particulièrement utiles pour séparer les esters hydroxycinnamiques, les flavonoïdes, les isomères cis et trans des acides cinnamiques et leurs dérivés (RIBEREAU-GAYON, 1968).

<u>Première dimension</u>	<u>Deuxième dimension</u>
1 - Acétate de butyle-Acide acétique-Eau (ABAE) 4/1/5 (vol/vol)	Acide acétique (ACH) à 2 ou 5 % dans l'eau distillée.
2 - Butanol-1-Acide acétique-eau (BAE) 4/1/5 (vol/vol)	Acide acétique à 5 %
3 - BAE 4/1/5 (vol/vol)	Butanol-1-Ammoniaque 1/1 (vol/vol)
4 - BAE 4/1/5 (vol/vol)	Méthyl isobutyloétone-Acide formique-Eau (M.F.E.) 3/1/2 (vol/vol) (phase supérieure).
5 - ABAE 4/1/5 (vol/vol)	BAE 4/1/5 (vol/vol)
6 - M.F.E. 3/1/2/ (vol/vol) (phase supérieure)	Acide acétique à 5 %
7 - Toluène-Acétate d'éthyle-Acide acétique 52/10/2 (vol/vol)	Toluène-Acide acétique 25/3 (vol/vol)
8 - Toluène-Acétate d'éthyle-Acide acétique 52/10/2 (vol/vol)	Chloroforme-Méthanol-Eau 65/25/4 (vol/vol)

Figure 19 : Systèmes de solvants essayés pour la séparation des composés phénoliques des amandes de cotonniers

3 - Chromatographie liquide à haute performance.

3-1 Séparation des différents composés phénoliques.

3-1-1 Utilisation du détecteur à barrettes de diodes.

Les techniques les plus récentes de chromatographie en phase liquide utilisant un détecteur à barrettes de diodes couplé à un ordinateur permettent les analyses spectrales de tous les pics séparés par détection en lumière UV/visible à haute sensibilité. L'appareillage utilisé est :

- Un H.P.L.C. Varian 5000 muni d'un détecteur à barrettes de diodes Hewlett-Packard (HP-1040M).

- Un ordinateur Hewlett Packard (HP-9000 série 300), qui effectue l'intégration des pics et le tracé des spectres.

- Une table traçante Hewlett Packard (HP 7440A COLOR PRO) qui réalise des copies des chromatogrammes et des spectres.

- Une colonne C 18 μ Bondapack (Waters) de 30 cm de longueur et de 3,9 mm de diamètre interne, remplie de particules de 5 μ m de diamètre.

- Une précolonne, du même type, de 5,5 cm de longueur et 3,9 mm de diamètre interne. Le volume de la boucle d'injection est de 10 μ l. Les solvants d'élution sont constitués par le méthanol pur et l'eau bidistillée ajustée à pH 2,6 avec l'acide orthophosphorique, puis filtrée sur millipore (0,45 μ m). Les analyses sont effectuées à 280 ou 360 nm avec la programmation de gradient définie dans le tableau 13.

Tableau 13 : Programmation de gradient utilisée pour la séparation de composés phénoliques purifiés.

Temps (mn)	Débit (ml/mn)	Méthanol (%)	Eau (%)
0	0,70	5	95
5	0,70	5	95
10	0,70	10	90
15	0,70	20	80
30	0,70	20	80
35	0,70	25	75
45	1,00	80	20
55	1,00	80	20
60	1,00	80	20
65	1,00	80	20

3-1-2 Utilisation du détecteur UV/visible simple.

Pour séparer et quantifier les composés phénoliques, nous avons également utilisé un équipement H.P.L.C. composé :

- de deux pompes Waters, modèles 510,
- d'un spectrophotomètre UV/visible Waters 481,
- d'un programmeur de gradient Waters 680,
- d'un intégrateur Shimadzu, CR-3A Chromatopac,
- d'une colonne Lichrospher 100RP 18 (250 x 4,0 mm, particules de 5 μm de diamètre) munie d'une précolonne C18 (WATERS) de 25 mm de longueur et 3,9 mm de diamètre interne. Le volume de la boucle d'injection est de 20 μl . Pour l'élution, à 280 nm, (tableau 13), le méthanol est remplacé par l'acétonitrile pur.

3-2 Séparation du gossypol

Le programme de gradient défini plus haut (tableau 13) ne permet pas de quantifier avec exactitude le gossypol qui se sépare, dans ces conditions, en 3 tautomères (Fig. 20). En revanche, en commençant le programme de gradient au niveau qui correspond au temps de 45 minutes dans le tableau 13, c'est à dire avec le mélange acétonitrile/eau 80/20 (vol/vol), on sépare, à 280 nm, en moins de 15 minutes, le complexe de gossypol-acétique témoin, le gossypol libre ou le gossypol total issu d'une hydrolyse oxalique, en un pic unique. Le gossypol complexé à l'amino-3-propanol-1 absorbe aux mêmes longueurs d'ondes que le complexe gossypol-acétique et l'extrait végétal de gossypol (Fig. 21). Il est également séparé en un pic unique dans les mêmes conditions.

Pour les raisons expliquées plus haut (pages 48 et 50), le gossypol total est analysé après hydrolyse du gossypol combiné, soit par l'acide oxalique (Fig. 16), soit par l'acide acétique et le gossypol est alors complexé par l'amino-3-propanol-1 (Fig.18).

III - Techniques d'identification des composés phénoliques

1 - Spectrophotométrie UV/visible

Elle permet de déterminer les spectres des extraits hydroalcooliques bruts ou purifiés des composés phénoliques entre 200 et 450 nm.

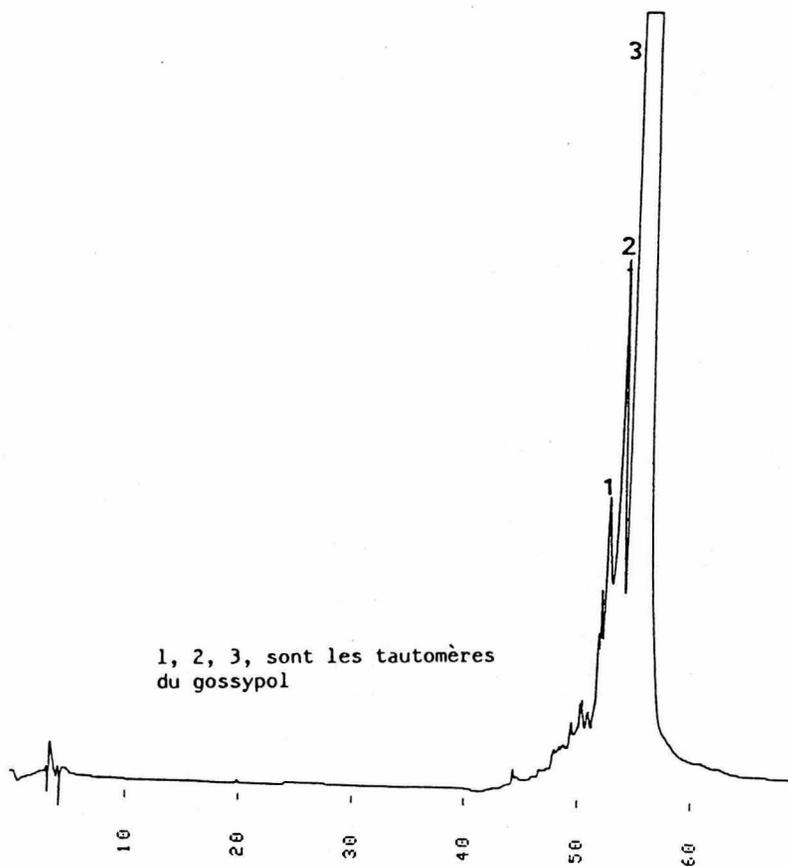


Fig. 20 : Chromatogramme HPLC à 280 nm d'un extrait correspondant strictement aux glandes

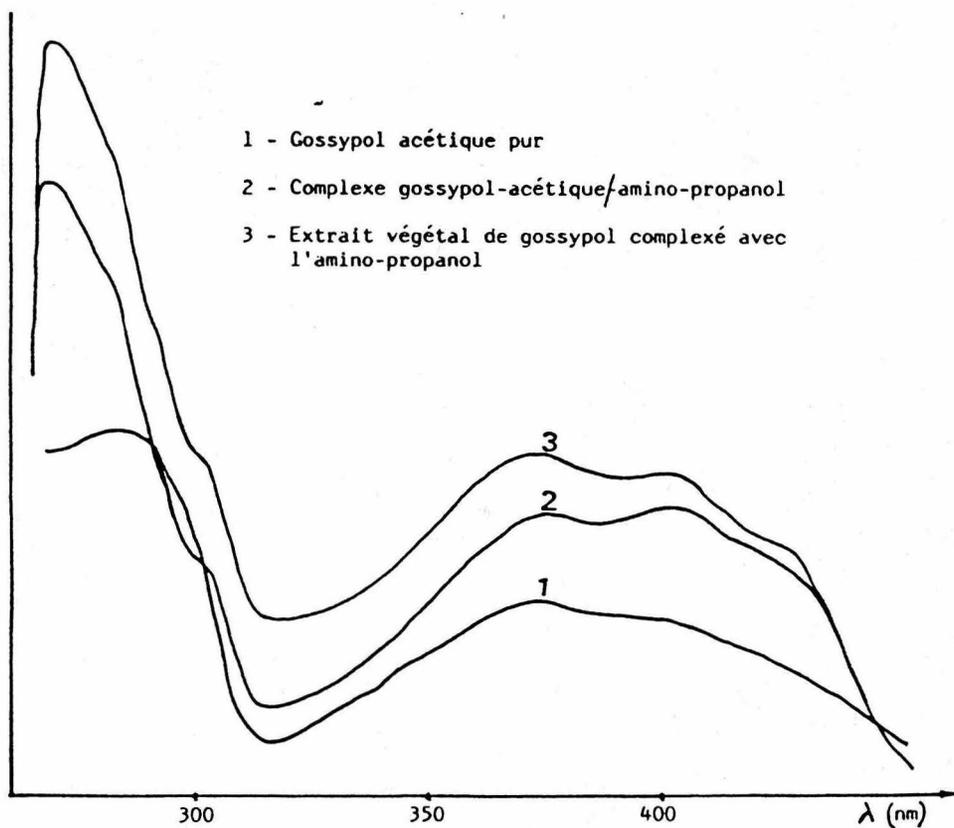


Fig. 21 : Spectres des dérivés du gossypol réalisés dans le N,N diméthylformamide entre 200 et 500 nm.

2 - Révélations chimiques des chromatoplaques

Parmi les nombreux révélateurs des composés phénoliques, nous avons retenu :

- La lumière UV à 254 et 366 nm en absence ou en présence de vapeurs d'ammoniaque.

- L'azote liquide. Il stimule la fluorescence de nombreux composés phénoliques à 254 nm (RIBEREAU-GAYON, 1968).

- La para-nitroaniline diazotée préparée selon le procédé SWAIN décrit par RIBEREAU-GAYON, (1968).

- Le chlorure ferrique à 1 % dans l'eau, composé qui n'est cependant pas spécifique des fonctions phénoliques (RIBEREAU-GAYON, 1968).

- Le réactif de Benedickt (REZNIK et EGGER, 1961) qui permet de repérer les composés possédant un groupe o-diphénolique libre et ceux qui n'en présentent pas et qui se comporteraient alors comme des monophénols dans la famille des hydroxycinnamiques.

- Le chlorure d'aluminium à 1 % dans l'éthanol (STAHL, 1965, RIBEREAU-GAYON, 1968) qui confirme la présence des flavonoïdes et les rend orange fluorescent sous les UV.

- Le réactif de Neu (1956) qui détecte les flavonoïdes monophénols ou diphenols sous les UV. à 366 nm.

- La vaniline à 1 % dans l'HCl 12 N qui détecte la plupart des flavan-3-ols.

3 - Utilisation d'un détecteur à barrettes de diodes

L'H.P.L.C. couplé à la spectrophotométrie UV/visible utilisant un détecteur à barrettes de diodes permet de caractériser par son spectre d'absorption chaque pic séparé. Cette technique a déjà été utilisée par HOSTETTMANN, (1984), SIEWEK et GALENSA (1984), HOSTETTMANN, (1985), pour identifier les flavonoïdes et les xanthones de plusieurs espèces de Gentiana sp.

IV - Dosages des substances phénoliques.

1 - Colorimétriques

1-1 Composés phénoliques totaux

Parmi les nombreuses techniques de dosage des composés phénoliques totaux (MACHEIX et DELAPORTE, 1973, RAMBOURG et MONTIES, 1980, 1983), nous avons adopté la méthode au réactif de Folin-Ciocalteu (SWAIN et HILLIS, 1959, MARIGO, 1973, VILLENEUVE, 1982).

A partir d'un extrait brut de 100 ml (solution mère) correspondant à 2,5 g de matière, on prélève 5 ml que l'on dilue avec 45 ml d'eau distillée (solution A). On prélève à nouveau 10 ml de la solution mère que l'on acidifie à pH 3,5 (HCl 0,1 N) et on ajoute 10 ml d'eau distillée plus 4 g de polyvinylpyrrolidone (PVP) insoluble. Après 10 minutes d'agitation, on filtre sur fibres de verre et on complète à 25 ml (solution B). A 1 ml de chacune des solutions A et B, on additionne 6 ml d'eau distillée et 1 ml de réactif de Folin-Ciocalteu. On agite, puis, après 3 minutes de repos, on ajoute 2 ml d'une solution aqueuse de bicarbonate de sodium à 20 %. Les tubes sont incubés pendant 40 minutes à 40° C. Il se développe une coloration bleue dont la densité optique est lue à 760 nm contre un blanc constitué des seuls réactifs. Trois dosages sont effectués pour chaque extrait et les valeurs moyennes des densités optiques sont comparées à celles d'une courbe étalon d'acide gallique de concentrations variant de 5 à 200 µg/ml dans l'eau distillée. Les composés phénoliques totaux correspondent à la différence A-B. Les résultats sont exprimés en grammes d'acide gallique pour 100 g de matière sèche.

1-2 Gossypol libre.

L'analyse spectrophotométrique du gossypol libre est basée sur la formation de complexes colorés avec :

- les sels de certains métaux (Fe, Cu,...) (BOATNER et al., 1944, PODOLS'KAYA, 1944, SHIEH et al., 1968, ADAMASU et CHANRAVANSI, 1984),

- le phloroglucinol (STORHERR et HOLLEY, 1954),
- la P-anisidine (PONS et GUTHRIE, 1949),
- l'aniline (SMITH, 1946 a et b, PONS et HOFFPAUIR, 1957, DEACON, 1968).

Nous avons utilisé la méthode de dosage officielle Ba 7-58 de l'AACS (1958,) qui nécessite la formation d'un complexe diimine coloré entre le gossypol et l'aniline : le dianilinogossypol (Fig. 22) lu à 440 nm.

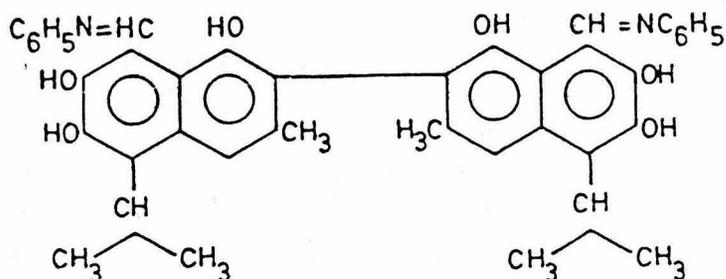


Fig. 22 : Le dianilinogossypol

La teneur en gossypol libre est évaluée en g/100 g de matière sèche en se reportant à une courbe étalon de complexe de gossypol-acétique dans la gamme de 2 à 8 $\mu\text{g/ml}$ dans l'acétone aqueuse, établie dans les mêmes conditions.

1-3 Gossypol total.

Le dosage du gossypol total est basé sur la formation de complexes colorés avec:

- l'aniline (SMITH et HALVERSON, 1933, SMITH, 1958, PONS et al., 1958),
- la P-anisidine (PONS et al., 1950),
- le chlorure d'antimoine (BOATNER et al., 1944).

Pour des raisons déjà évoquées plus haut (pages 48 et 50), nous avons choisi deux principales méthodes de dosages qui ne diffèrent que par l'hydrolyse du gossypol combiné, mais qui nécessitent la formation du dianilinogossypol (Fig. 22). Il s'agit de :

- la méthode officielle Ba 8-55 de l'AACS (1958,) qui est une adaptation du procédé mis au point par PONS et al., (1950) et qui est utilisée lorsque le gossypol combiné est hydrolysé par l'acide oxalique.

- la technique de PONS et al., (1958), selon laquelle le gossypol combiné est hydrolysé par l'acide acétique puis complexé par l' amino-3-propanol-1.

Dans les deux cas les absorbances sont lues à 440 nm et les teneurs en gossypol total sont calculées en se reportant à des courbes étalons établies avec des solutions de complexe de gossypol-acétique de concentration variant de 2 à 8 µg/ml, préparées dans les mêmes conditions opératoires. Les résultats, moyennes de deux essais, sont exprimés en gramme de gossypol pour 100 g de matière sèche.

2 - H.P.L.C.

2-1 Estimation de la somme des teneurs des composés phénoliques dosés par HPLC.

Les extraits de composés phénoliques purifiés (voir plus haut, Fig. 14) sont ramenés à 10 ml par le méthanol pur, puis filtrés sur filtre millipore 0,45 µm. Les principaux composés phénoliques sont dosés par étalonnage interne. Les teneurs en gossypol libre sont déterminées séparément sur d'autres prises d'essais (voir page 59). 10 µl de chaque extrait sont mélangés à 10 µl de l'étalon puis analysés. L'aire de l'étalon est comparée à celle du pic inconnu. L'acide gallique, retenu comme étalon interne, est bien séparé des autres pics; son temps de rétention est de 9 minutes.

Les dosages sont effectués sur chromatographe Waters, à 280 nm, longueur d'onde moyenne où absorbent tous les composés phénoliques. Cinq analyses sont effectuées pour chaque extrait. Les résultats sont exprimés en mg/100 g de matière sèche. Les teneurs en composés phénoliques représentent la somme des teneurs de tous les pics ou familles de composés séparés.

2-2 Gossypol libre

L'H.P.L.C. est une méthode très sensible, sélective et rapide pour le dosage du gossypol libre (ABOU-DONIA et al., 1981). Elle est non destructive et le gossypol élué peut servir à une utilisation ultérieure. L'extrait de gossypol libre (voir plus haut, Fig. 15) est dilué à 10 ou 20 ml avec un mélange de méthanol et de diéthyléther 95/5 (vol/vol). Après filtration sur filtre millipore (0,45 µm), 10 µl de la solution de gossypol libre sont analysés à 280 nm sur un chromatographe Waters. Les teneurs en gossypol libre sont déterminées par étalonnage externe.

L'aire du pic d'un extrait de gossypol libre est comparée à celle d'une solution du complexe de gossypol-acétique de référence analysée dans les mêmes conditions. Les résultats sont exprimés en mg de gossypol pour 100 g de matière sèche. Cinq analyses sont effectuées pour chacun des extraits.

2-3 Gossypol total

Pour les raisons déjà évoquées plus haut (pages 48 et 50), nous distinguons deux variantes dans le dosage du gossypol total en fonction de la méthode d'hydrolyse du gossypol combiné :

- dans le cas où l'hydrolyse est effectuée par l'acide oxalique, l'extrait concentré de gossypol total est repris par le mélange de méthanol et de diéthyléther (95/5, vol/vol), puis analysé par H.P.L.C. comme le gossypol libre.

- lorsqu'on utilise l'acide acétique pour l'hydrolyse, la solution de gossypol total complexé par l'amino-3-propanol-1 est analysée telle quelle à 280 nm. Une solution témoin de gossypol-acétique complexé par l'amino-3-propanol-1 est préparée dans les mêmes conditions pour servir d'étalon externe.

Dans les deux cas, le gossypol total est dosé par étalonnage externe, le volume injecté étant de 10 μ l.

V - Analyses statistiques.

Les analyses statistiques sont effectuées selon les méthodes de SNEDECOR et COCHRAN, (1971), PEARCE, (1978). Elles permettent de comparer les teneurs en gossypol de différents échantillons, déterminées soit par colorimétrie, soit par H.P.L.C. et de confronter ainsi les deux méthodes de dosages. Pour cela, nous avons calculé successivement :

- le terme de correction (T.C.),
- la somme des carrés pour la variance totale (S.C.T.),
- la somme carrée des répétitions (S.C.R.) des analyses,
- la somme des carrés "variétés de cotonniers" (S.C.V.),
- la somme carrée de l'erreur (S.C.E.),
- la somme des carrés moyens (S.C.M.),
- la variance (F).
- les droites de régression, $y = ax + b$,
- les probabilités de régression (texp),
- les coefficients de corrélation r,

- COMBINAISON DU GOSSYPOL AVEC D'AUTRES CONSTITUANTS DES AMANDES
OU DES FARINES

Pour essayer de comprendre les réactions qui ont lieu au cours des traitements technologiques des amandes, nous avons combiné le gossypol ou le gossypol-acétique avec les autres constituants des amandes ou des farines, à chaud à 75°C, ou à température ambiante. Les échantillons sont analysés avant et après combinaison, puis après hydrolyse du gossypol combiné.

I - Combinaison à chaud du gossypol libre, puis hydrolyse du gossypol lié.

1 - Amandes à glandes

Les amandes de la variété à glandes Pavlikéni sont broyées finement au mortier, imbibées d'alcool à 80° G.L. à raison d'un gramme de matière pour un volume d'alcool, puis étuvées à 75° C. pendant deux heures. Les glandes à gossypol éclatent sous l'action de la solution hydroalcoolique et de la chaleur et libèrent ainsi leur contenu pigmentaire au contact des autres constituants des amandes. La matière, devenue très jaune est lavée à l'hexane distillé (1/12,5 ; P/vol). Cette opération élimine la majeure partie du gossypol libre et des lipides. Après séchage sous une hotte durant une nuit, on obtient une farine très jaune. Sur une partie de cette farine, la lysine, dont une grande partie serait liée au gossypol, est libérée par hydrolyse à l'acide acétique en présence du N, N diméthylformamide (DMF) et de l'amino-3-propanol-1 (A3P1) selon le procédé précédemment décrit (voir plus haut, Fig. 18). Après filtration, on obtient le gossypol complexé dans la phase liquide et la farine exempte de gossypol qui sera ensuite séchée à l'air libre. La figure 23 résume l'ensemble des opérations et des analyses effectuées.

2 - Farine de coton sans gossypol et farine de soja

10 g de farine de coton sans gossypol ou de farine de soja, toutes deux délipidées à l'hexane, sont finement broyées au mortier, puis imbibées de 16 ml d'une solution du complexe de gossypol-acétique pur à 5,05 mg/ml dans l'éthanol à 80° G.L. Ces préparations sont ensuite placées à l'étuve à 75° C. pendant deux heures, puis lavées à l'hexane distillé (1/12,5 ; P/vol) pour éliminer la majeure partie du complexe de gossypol-acétique résiduel non combiné aux constituants des farines. Au cours de ces opérations (Fig. 24), le gossypol-acétique se fixe sur les constituants des farines, dont la couleur devient brun foncé et dans lesquelles la lysine est essentiellement sous forme liée. Comme précédemment, une partie des échantillons est soumise à l'hydrolyse par l'acide acétique et les produits obtenus sont analysés (Fig. 24).

ANALYSES EFFECTUEES

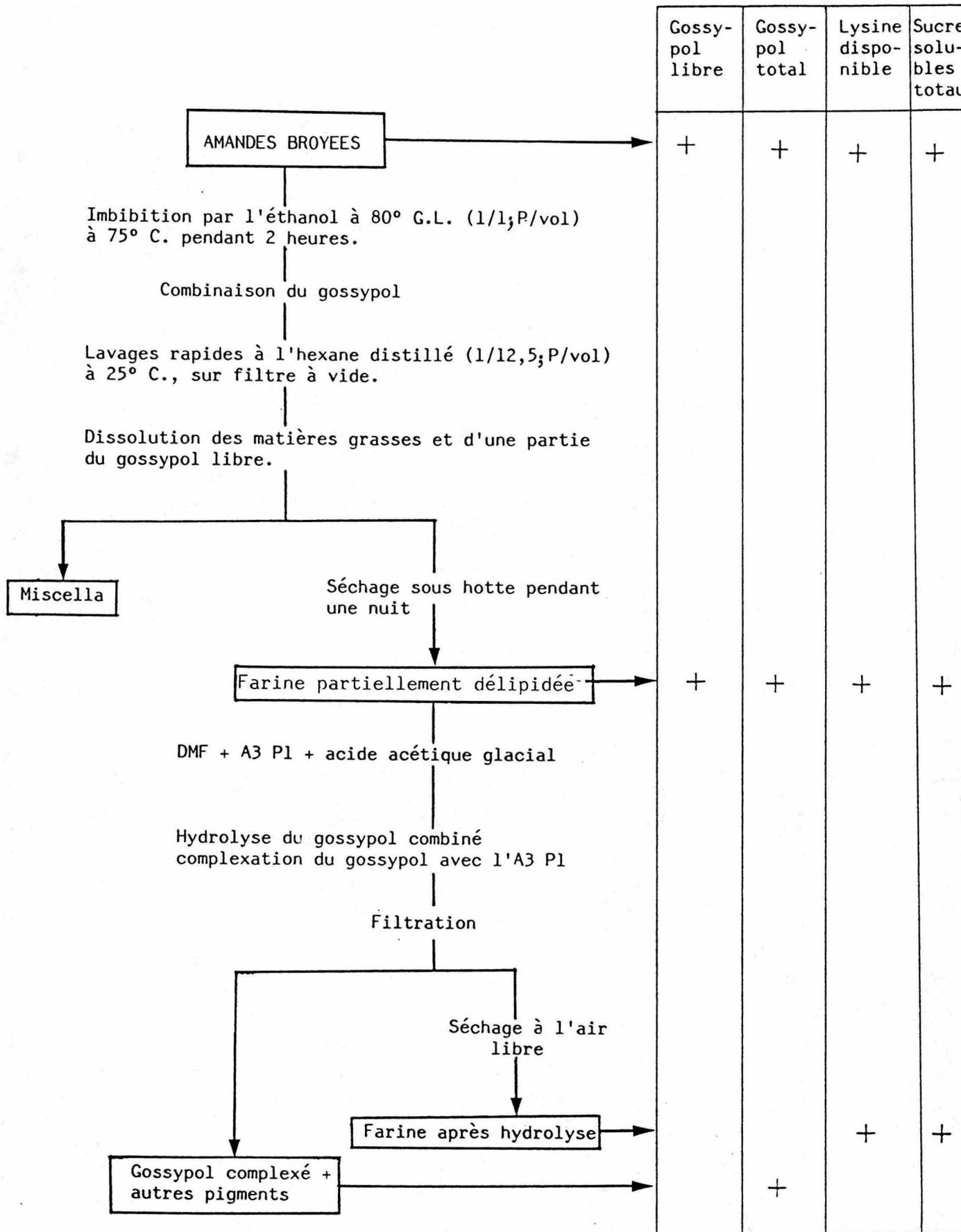


Fig. n° 23 : Protocole de combinaison à chaud du gossypol libre, puis hydrolyse du gossypol lié dans les amandes broyées d'une variété à glandes à gossypol.

ANALYSES EFFECTUEES

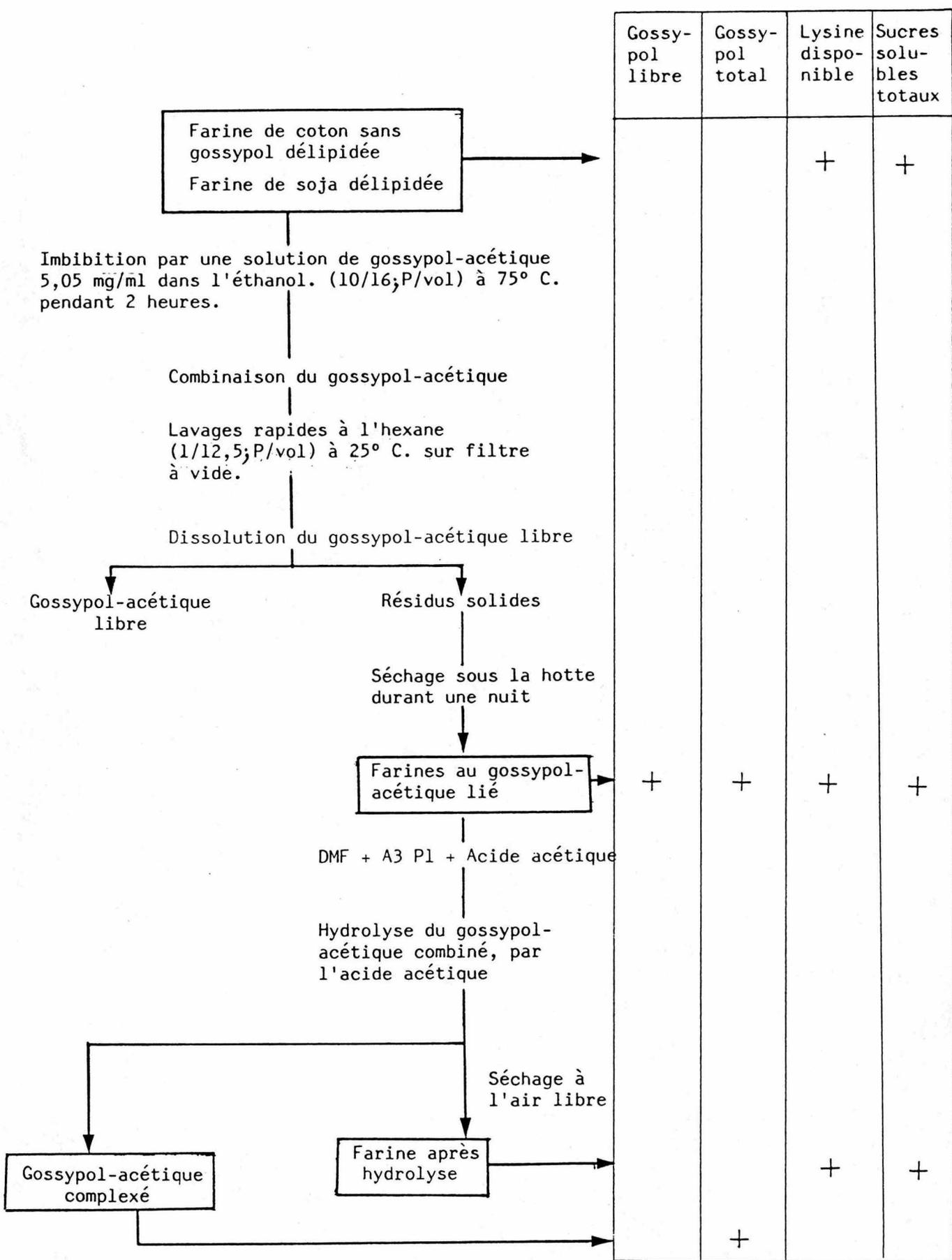


Fig. n° 24 : Protocole de combinaison à chaud du gossypol-acétique, puis hydrolyse du gossypol-acétique lié dans les farines délipidées de coton sans graine et de soja

II - Combinaison à froid du gossypol libre,
puis hydrolyse du gossypol lié.

1 - Amandes à glandes

Les amandes finement broyées et traitées à l'alcool à 80° G.L. (1/1 P/vol) sont laissées au repos pendant 24 heures, lavées à l'hexane distillé (1/12,5 ; P/vol) et séchées sous une hotte durant une nuit (fig. 25). Le gossypol combiné de la farine ainsi obtenue est hydrolysé par l'acide acétique et les produits résultants sont analysés (fig. 25).

2 - Farine de coton sans gossypol et farine de soja.

Les farines délipidées et finement broyées sont imbibées d'alcool comme précédemment. L'excès du complexe de gossypol-acétique est éliminé par lavages à l'hexane (fig. 26). Une partie des farines obtenues est traitée par une solution d'acide acétique et les produits qui en résultent sont analysés.

- DETOXIFICATION DES AMANDES

I - Principe de la technique retenue et
choix des solvants utilisés

1 - Principe de la détoxification.

Le gossypol ainsi que ses dérivés sont contenus dans des glandes à pigments dont le diamètre varie entre 100 et 400 μm (BOATNER, 1948, MARKMAN et RZHEKIN, 1969). Leur densité (1,26 à 1,38 g/cm^3) est inférieure à celle des autres tissus des amandes (1,40 à 1,45 g/cm^3) (BOATNER, 1948). Cette propriété permet d'envisager la séparation gravimétrique des glandes dans des solvants de densité intermédiaire entre celle des tissus et celle des glandes pour simultanément délipider les farines et extraire les glandes à pigments.

ANALYSES EFFECTUEES

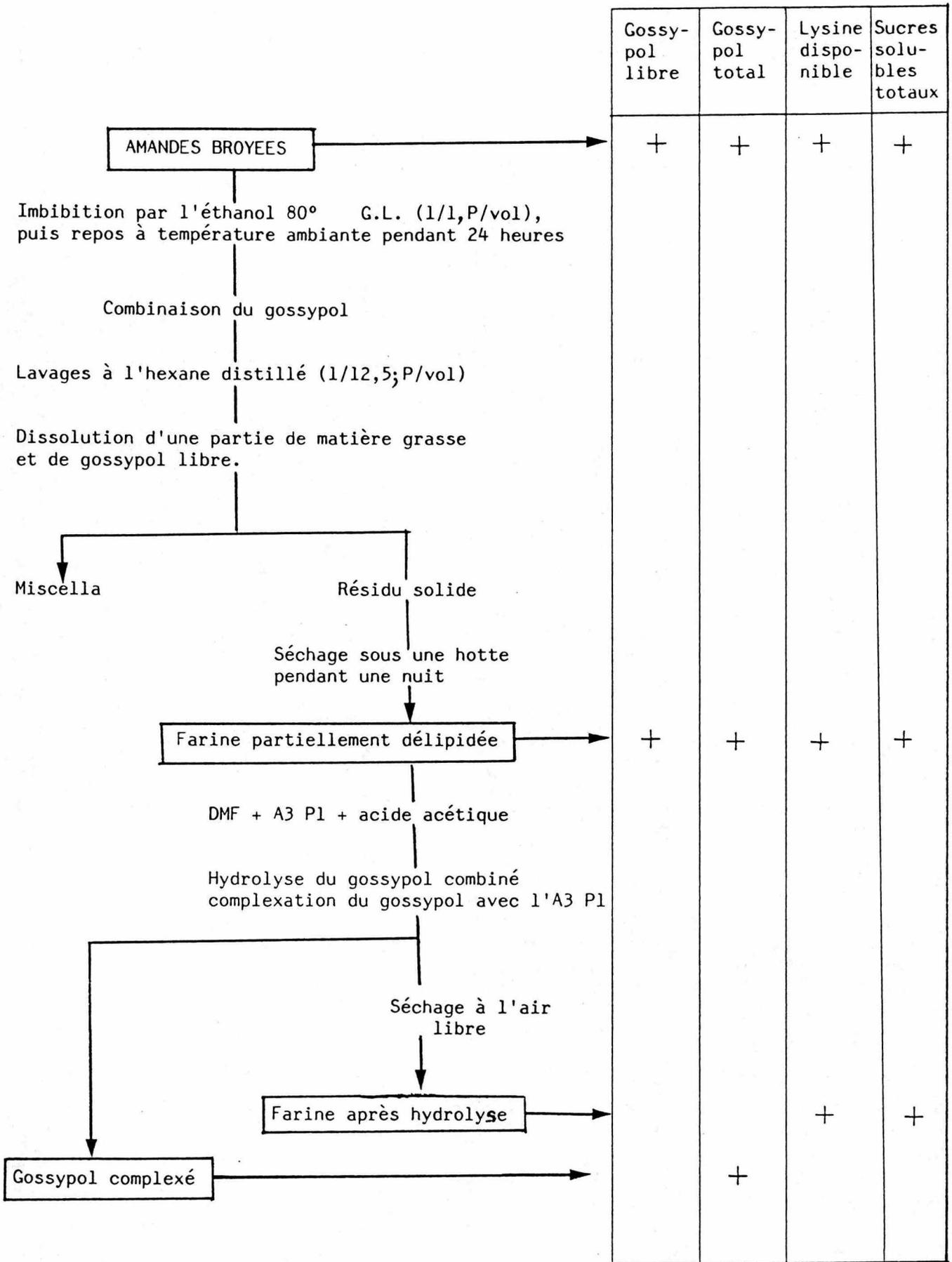


Fig. n° 25 : Protocole de combinaison à froid du gossypol libre, puis hydrolyse du gossypol lié dans une farine de coton à glandes.

ANALYSES EFFECTUEES

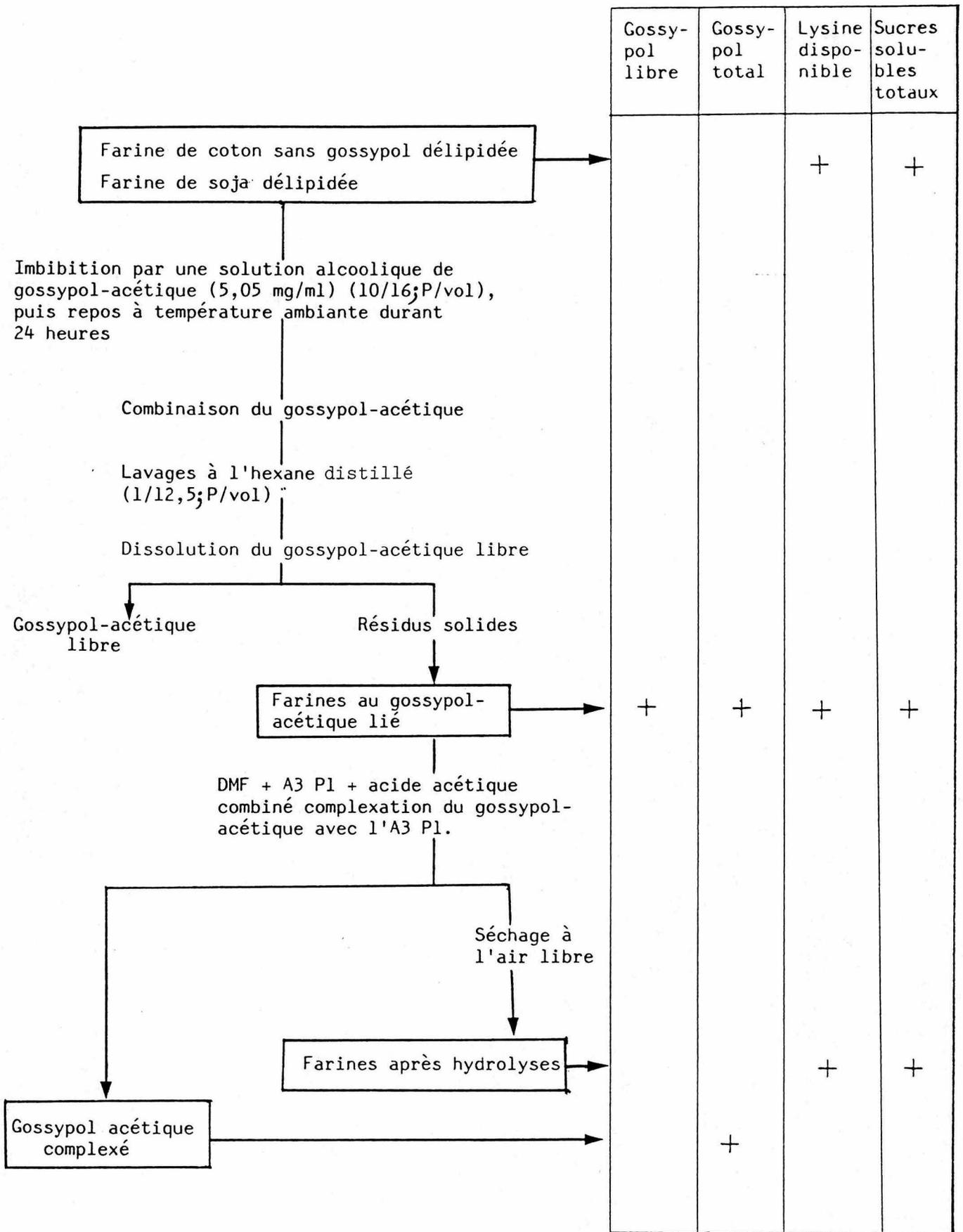


Fig. n° 26 : Protocole de combinaison à froid du gossypol-acétique, puis hydrolyse du gossypol-acétique lié dans les farines délipidées de coton sans gossypol et de soja.

2 - Choix des solvants de détoxification

2-1 Mélange hexane-fréon

Le fréon (flugène 113) ou trichloro-1,2,2 trifluoroéthane, de densité 1,57 à 20° C. et de point d'ébullition 47,6° C. sous 760 mm de mercure est un solvant ininflammable couramment utilisé dans les teintureriers et pour les dégraissages, ainsi que dans les industries électroniques, du froid, des aérosols et des synthèses organiques (FARHI et al., 1967, DESOILLE et al., 1968). Ce solvant a déjà été employé pour extraire les lipides des graines des oléagineux (KAUFMANN et VOM ORDE, 1955, GUILLAUMIN, 1974, TEMPLE, 1976). Il ne modifie ni la qualité organoleptique, ni la valeur nutritionnelle de l'huile et des tourteaux (GUILLAUMIN, 1974).

Nous avons choisi le mélange hexane-fréon dans les proportions 23/77 (vol/vol) (densité ajustée à 1,35 g/cm³), pour séparer les glandes à gossypol des autres constituants des amandes de cotonniers. Ce mélange est utilisé par SAUVAIRE et al., (1984), pour décanter certaines particules constituant les graines du fenugrec (Trigonella foenum graceum L.)

2-2 Dichlorométhane

Le dichlorométhane ou chlorure de méthylène, de densité 1,33 g/cm³ à 20°C. fait partie des solvants chlorés ininflammables, ni mutagènes, ni carcinogènes. Couramment utilisé dans les industries d'aérosols, des peintures, d'adhésifs et pour le nettoyage des métaux, il est aussi employé pour pêler les tomates, décaféiner les amandes de café (VALLE-RIESTRA, 1974), pour extraire les épices et les aliments (Chemical and Engineering News, 1978). Son utilisation dans les industries alimentaires a été autorisée par la FAO en 1970 (VALLE-RIESTRA, 1974). Son action chimique est nulle sur les protéines (CHEFTEL et al., 1985). Il est efficace pour extraire les lipides, les aflatoxines et le gossypol libre des dérivés des graines de coton (VALLE-RIESTRA, 1974, CHERRY et GRAY, 1981, JOHNSON et al., 1986).

2-3 Mélange dichlorométhane-éthanol

Etant légèrement polaire, le dichlorométhane casse une petite partie des glandes des amandes de coton et fait passer ainsi du gossypol dans la farine. Aussi, afin d'éliminer complètement le gossypol et de parachever la détoxification et l'extraction des lipides, nous n'avons utilisé des mélanges de dichlorométhane et d'éthanol (dans les proportions 75/25 ou 50/50 (vol/vol) que pour laver les farines.

II - Méthodes de détoxification

1 - Préparation des amandes

Les amandes sont broyées grossièrement dans un mortier en porcelaine. La matière ainsi obtenue est séchée à l'étuve à 70° C. pendant deux heures pour ramener l'humidité entre 1,5 et 2 %.

Cette opération permet :

- d'enlever l'eau qui pourrait provoquer l'éclatement des glandes à pigments,
- de rendre les parois des glandes plus rigides, donc plus résistantes,
- de fluidifier les globules lipidiques et de rendre ainsi friables les autres particules des amandes.

2 - Utilisation du mélange Hexane-fréon

6 à 7 g d'amandes broyées et séchées sont introduits dans un ballon rond à col court adapté à un broyeur à hélice TURAX. On ajoute le mélange hexane-fréon dans les proportions de 1 g de matière pour 10 ml du mélange de solvants. On observe déjà un début de décantation des glandes. Un broyage de deux minutes avec une vitesse de rotation des couteaux de l'hélice du TURAX à 12.000 trs/mn permet aux glandes de se détacher des autres tissus des amandes et de monter en surface. Le broyat est donc constitué du miscella (solvant + huile), de la farine et des glandes à pigments. Une centrifugation à 6.000 trs/mn pendant deux minutes permet de les séparer.

Le broyage détruit une petite partie des glandes et le gossypol libéré se trouve essentiellement dissous dans l'huile brute, mais aussi en partie retenu dans la farine. Afin de l'éliminer, la farine est lavée plusieurs fois avec le même mélange de solvants.

Cinq lavages successifs sont nécessaires pour délipider et éliminer la majeure partie du gossypol libre résiduel de la farine. Cette dernière est séchée sous une hotte et l'huile est concentrée sous vide pour être analysée. La figure 27 résume le protocole utilisé pour la détoxification.

3 - Utilisation du dichlorométhane

Ce solvant est utilisé dans les mêmes conditions que précédemment (fig. 27) pour séparer les glandes des amandes. 5 lavages successifs avec le dichlorométhane sont nécessaires pour délipider la farine et extraire la majeure partie du gossypol libre.

4 - Utilisation du mélange hexane-fréon + dichlorométhane

Après broyage et 3 lavages successifs avec le mélange hexane-fréon, la farine est lavée deux fois avec le dichlorométhane dans l'optique de diminuer encore sa teneur en gossypol libre et en lipides.

5 - Utilisation des mélanges dichlorométhane-éthanol

Après broyage dans le dichlorométhane, suivi de deux lavages par le dichlorométhane, la farine est traitée 5 fois avec des mélanges polaires de dichlorométhane et d'éthanol dans les proportions 75/25 ou 50/50 (vol/vol).

III - Détermination de la couleur des farines.

1 - Définition de la couleur

Pour les aliments, la couleur traduit plutôt un indice de qualité (par exemple, la couleur d'une bonne farine de blé doit être blanche) et un caractère distinctif auxquels le consommateur est très sensible (par exemple, un bon café torréfié a une couleur plus ou moins foncée en fonction du goût du consommateur).

Pour mesurer la couleur, on se place dans les conditions définies par la Commission Internationale d'Eclairage (C.I.E.) (CLYDESDALE, 1977). On peut définir toute couleur dans l'espace développé par HUNTER en 1942 et qui comporte trois coordonnées L, a, b (L = brillance variable, + a = rouge, - a = vert, + b = jaune, - b = bleu). Pour comparer les couleurs des farines, celle du blé sera prise comme référence.

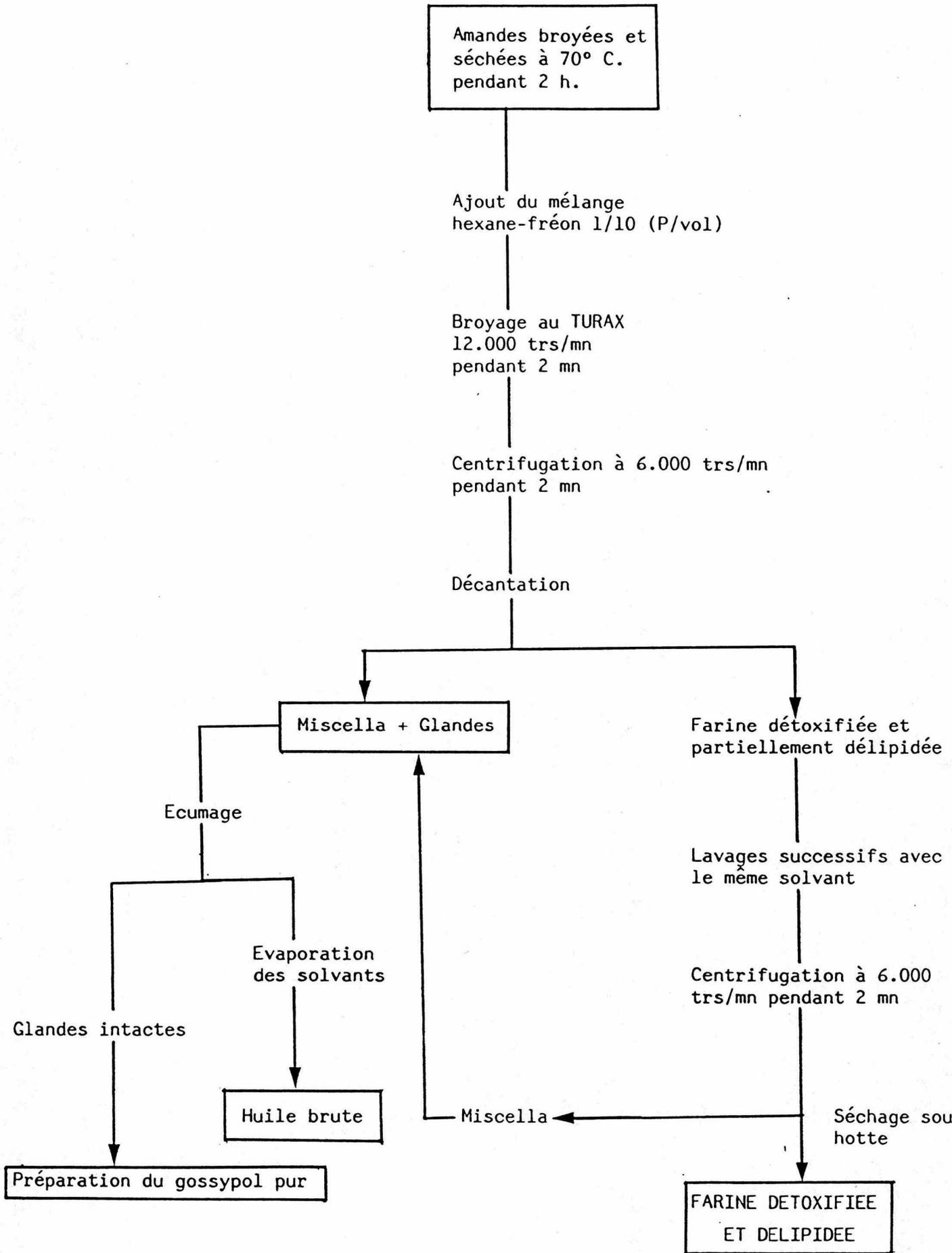


Fig. n° 27 : Protocole utilisé pour la détoxification des amandes de cotonniers.

2 - Système de mesure

L'appareil utilisé pour la détermination des couleurs des farines est un chromamètre électronique CR-100/CR-110 (Minolta Chroma meter III) offrant plus de 5 modes de mesure.

Une source pulsée à arc xénon illumine uniformément la farine. La lumière réfléchiée par la surface à analyser est transmise par une fibre optique à l'analyseur. Un second canal mesure simultanément les caractéristiques de l'illumination. Cette lumière traverse trois filtres spéciaux dont les spectres d'absorption restituent les fonctions de l'observateur standard de la C.I.E., compte tenu de la réponse spectrale des photo-cellules. Ces dernières convertissent l'énergie lumineuse en signaux électriques. Le microprocesseur corrige ces signaux pour tenir compte des conditions d'illumination mesurée par le second canal, puis les traduit en coordonnées L, a, b, dans l'espace HUNTER choisi. Les résultats sont affichés sur un écran à cristaux liquides.

L'appareil est calibré par une plaque blanche standard (Minolta reflector n° 101451) possédant les valeurs L = 95,0, a = 1,7, b = 0,3. Les mesures sont effectuées sur 20 g de chaque farine très finement broyée et tassée dans une boîte cylindrique transparente. En des points différents de chaque préparation, on réalise trois mesures. Les écarts entre les valeurs des trois stimuli ne doivent pas dépasser + ou - 0,1. Afin d'éviter les variations trop grandes, l'appareil est recalibré après passage de 3 échantillons.

3 - Modes de calcul

L'utilisation des coordonnées L, a, et b de HUNTER nous permet de retrouver les conditions d'observation de l'oeil humain.

En utilisant les formules de GULLET et al., (1972), SOUKUP et YOUNG MAING, (1977) et MAC DOUGALL, (1986), nous calculons successivement :

- la teinte (Hue), qui est définie comme étant l'inverse de la tangente de a sur b

$$\text{Hue} = \text{tg}^{-1}(a/b)$$

- la différence totale de couleur ΔE , qui représente l'écart de la couleur entre deux points référence/ mesure. Elle est le positionnement dans l'espace euclidien couleur (fig. 28), et se définit par la racine carrée de la somme des carrés des trois valeurs représentant la différence entre les coordonnées de l'échantillon et la référence (farine de blé).

$$\Delta E = (\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2)^{1/2}$$

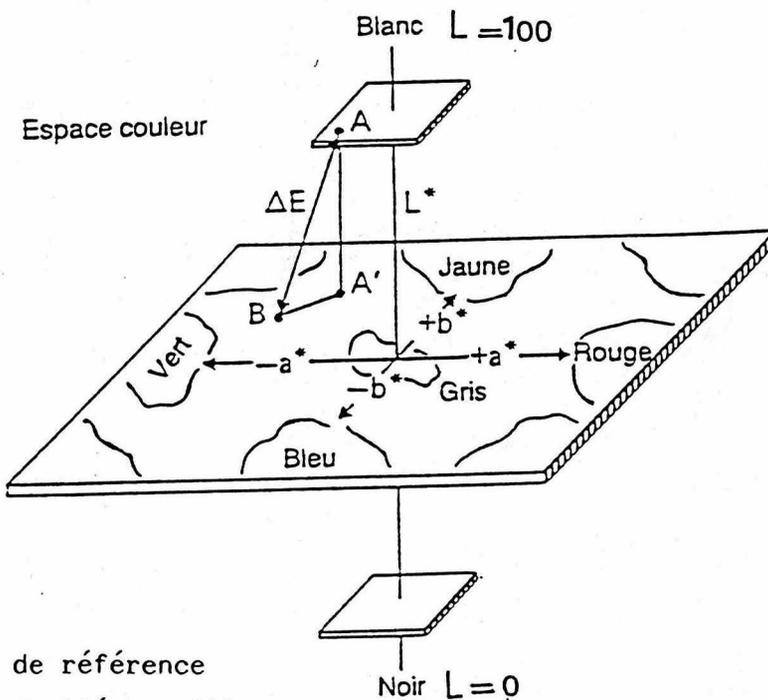
(équation de JUDD-HUNTER)

La farine de blé, utilisée comme référence possède les coordonnées suivantes :

$$L = 90,4; \quad a = - 0,9; \quad b = 7,9$$

- La saturation (C) ou CHROMA, encore appelée pureté est donnée par la racine carrée de la somme des carrés de a et de b. Elle précise la teinte dominante dans la couleur.

$$C = (a^2 + b^2)^{1/2}$$



A = Couleur de référence

B = Couleur de l'échantillon

A' = Projection du point A ramené dans un même plan

Fig. n° 28 : Espace couleur L, a, b et déviation couleur (ΔE)

TROISIEME PARTIE

RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE I :

EXTRACTIONS, SEPARATIONS, IDENTIFICATION,
ET DOSAGES DES COMPOSES PHENOLIQUES.

Ce chapitre est consacré aux résultats de l'étude de l'extraction et de la purification des composés phénoliques pour des analyses autres que celles du gossypol. Les chromatographies C C M et H.P.L.C. sont réalisées dans le but de doser ces composés et de les caractériser par leurs spectres d'absorption et les réactifs chimiques. Une étude particulière est consacrée aux différentes méthodes de dosage du gossypol libre et du gossypol total.

I - Extraction et purification des composés phénoliques

1 - Variations liées à l'extraction

Les composés phénoliques de 5 prises d'essai, chacune de 2 g d'amandes broyées des deux types de cotonniers, sont extraits à l'éthanol à 80 % dans des conditions expérimentales identiques. Les densités optiques, appréciées à 270 nm, montrent que si l'on se limite à cette approche spectrophotométrique, les coefficients de variation liés aux extractions s'élèvent à 2,49 % et 3,78 % respectivement pour les amandes broyées avec et sans glande à gossypol (tableau 14).

Tableau 14 : Variations des densités optiques, lues à 270 nm, des extraits à l'éthanol à 80 % des composés phénoliques des amandes de cotonniers avec et sans glande.

	Cotonnier à glandes Pavlikéni	Cotonnier sans glande BC4
Numéro des Extractions	(dilution 1/10)*	(dilution 1/5)*
1	1,28	0,48
2	1,32	0,47
3	1,38	0,49
4	1,34	0,52
5	1,35	0,51
\bar{X}	1,33	0,49
σ	0,03	0,01
C.V.	2,49	3,78

* Les volumes des extraits sont ramenés à 200 ml et 250 ml avec le même solvant, respectivement pour les amandes avec et sans glandes.

2 - Extraction des composés phénoliques

Nous avons étudié les spectres d'absorption de 4 extraits hydroalcooliques successifs obtenus par épuisement au solvant de 1 g d'amandes broyées des variétés à glandes Pavlikéni (fig. 29a) et sans glande BC4 (fig. 29b) par balayage entre 200 et 450 nm. Les densités optiques sont lues à 270 nm qui est un maximum d'absorption commun aux extraits de chacune des deux variétés de cotonniers (tableau 15). Si l'on se limite aux seules approches spectrophotométriques à 270 nm, on peut conclure que quelle que soit la variété, 4 traitements successifs du même échantillon sont nécessaires pour obtenir le maximum de composés phénoliques.

Tableau 15 : Densités optiques des extractions successives à l'éthanol à 80 % des composés phénoliques des amandes des deux types de cotonniers.

Extractions successives	Cotonnier à glandes (Pavlikéni)		Cotonnier sans glande (BC4)	
	DO à 270 nm	% total extrait*	DO à 270 nm	% du total extrait*
1	1,32	72,13	0,90	60,00
2	0,32	89,61	0,40	86,66
3	0,13	96,72	0,12	94,66
4	0,06	100,00	0,08	100,00
DO	1,83		1,50	

* Rapport

$$\frac{DO_n}{\sum_{n=4} DO} \times 100$$

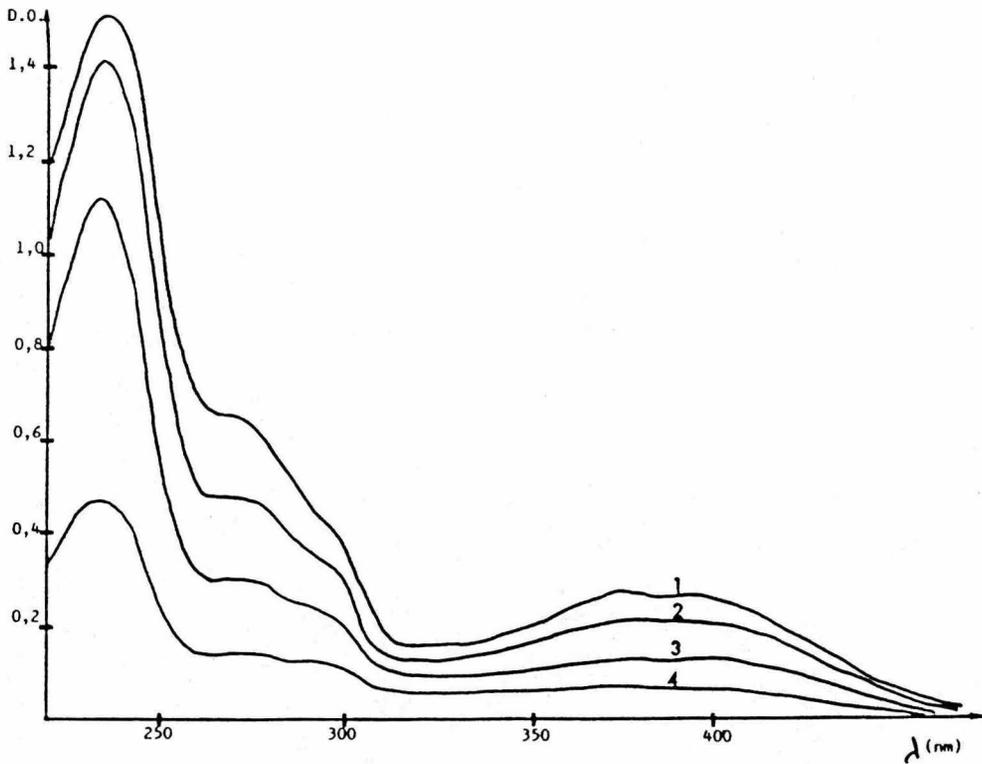


Fig. n° 29 a : Spectres d'absorption des 4 extraits hydroalcooliques successifs de composés phénoliques réalisés à partir d'une prise d'essai de 1 g d'amandes de cotonniers à glandes Pavlikéni.

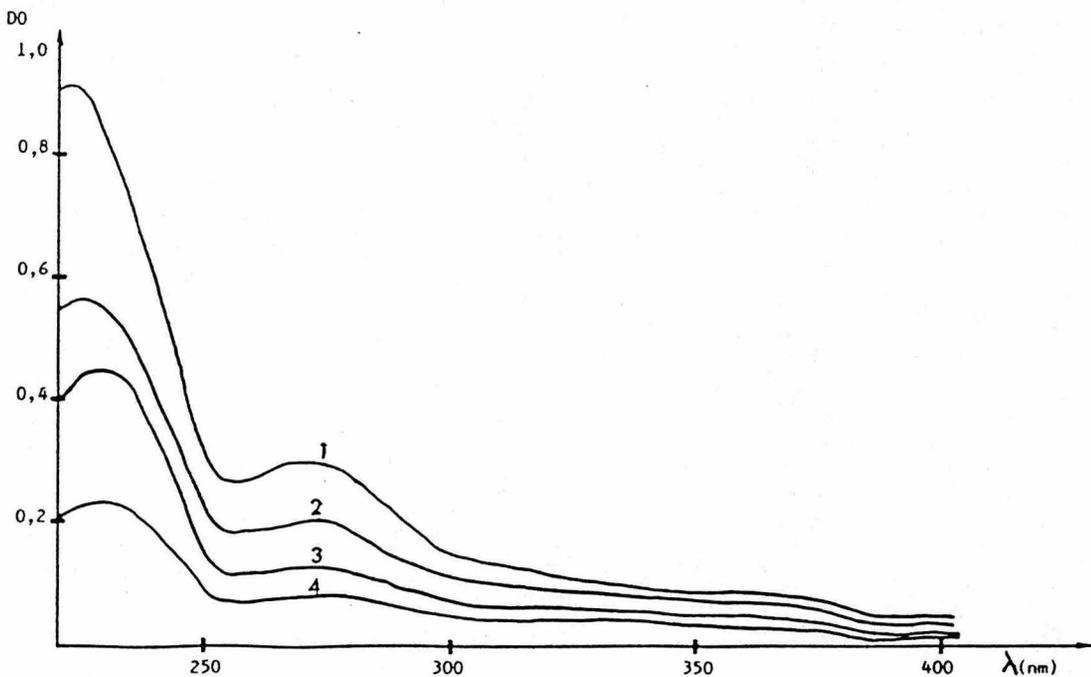


Fig. n° 29 b : Spectres d'absorption des 4 extraits hydroalcooliques successifs de composés phénoliques réalisés à partir d'une prise d'essai de 1 g d'amandes de cotonniers sans glande BC4.

3 - Purification des composés phénoliques

Les purifications successives par l'acétate d'éthyle des extraits délipidés de composés phénoliques des deux variétés de cotonniers sont appréciées par les spectres d'absorption entre 200 et 450 nm (fig. 30a et 30b). Les densités optiques sont lues à 360 nm et 320 nm respectivement pour les cotonniers à glandes et sans glande (tableau 16). Ces approches spectrophotométriques respectives à 360 nm et 320 nm montrent que quatre purifications successives par l'acétate d'éthyle permettent d'obtenir le maximum de composés phénoliques contenus dans les amandes de chacune des deux variétés de cotonniers.

Tableau n° 16 : Densité optique des extraits purifiés de composés phénoliques des amandes des deux variétés de cotonniers.

Extractions successives	COTONNIERS			
	Variété à glandes (PAVLIKENI)		Variété sans glande: (BC4)	
	D.O. à 360 nm	% du total extrait*	D.O. à 320 nm	% du total extrait*
1	2,70	75,00	0,97	55,42
2	0,66	93,33	0,47	82,28
3	0,15	97,50	0,18	92,57
4	0,06	99,30	0,10	98,28
5	0,02	100,00	0,03	100,00
Σ D0	3,60		1,75	

* Rapport

$$\frac{D0_n}{\sum_{n=4} D0} \times 100$$

II - Caractérisation des composés phénoliques des amandes de cotonniers

1 - Comparaisons spectrophotométriques des extraits totaux purifiés ou non

La spectrophotométrie UV/visible jusqu'à 450 nm permet d'obtenir les spectres des composés phénoliques des extraits hydroalcooliques totaux des amandes de cotonniers avec ou sans glande (fig. 31).

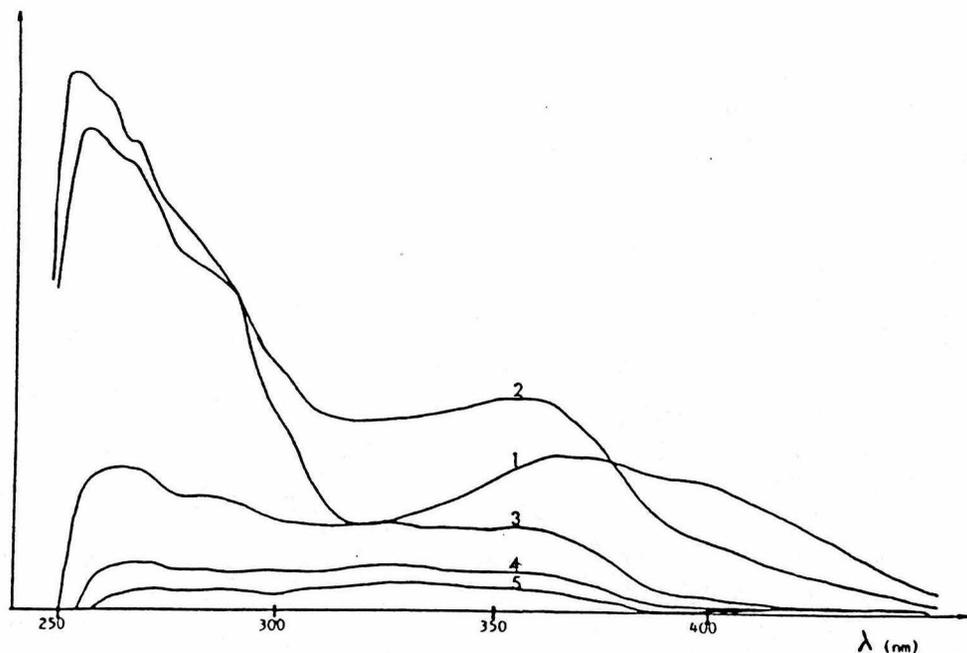


Fig. n° 30 a : Spectres d'absorption entre 250 et 450 nm de 5 extraits acétate éthyliques successifs de composés phénoliques purifiés obtenus à partir d'une prise d'essai. de 1 g d'amandes de cotonnier à glandes Pavlikéni.

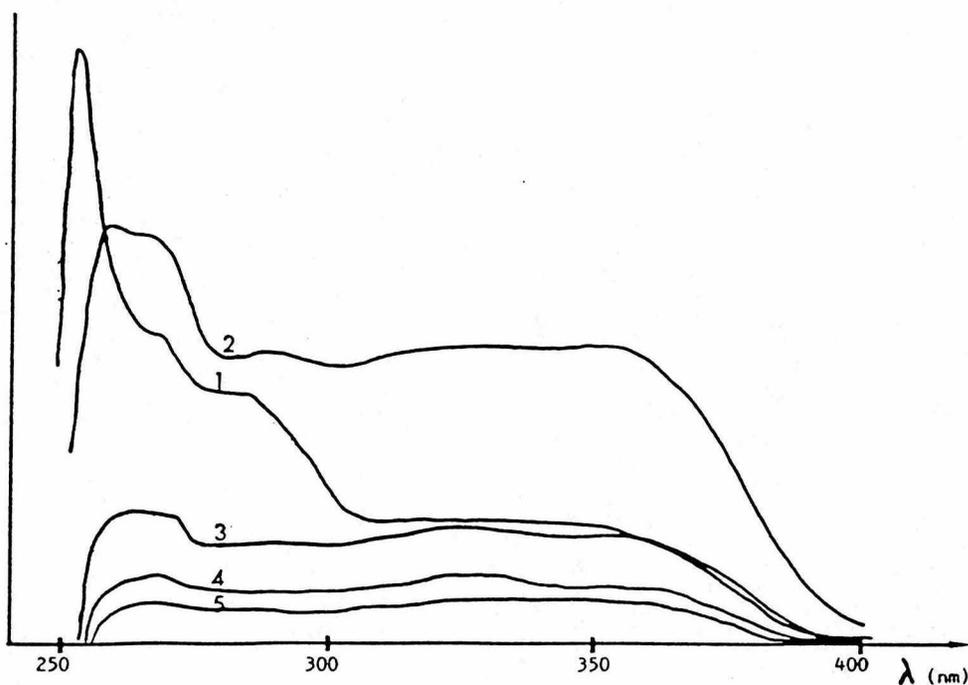


Fig. n° 30 b : Spectres d'absorption entre 250 et 450 nm de 5 extraits acétate éthyliques successifs de composés phénoliques purifiés obtenus à partir d'une prise d'essai de 1 g d'amandes de cottonniers sans glande. BC4.

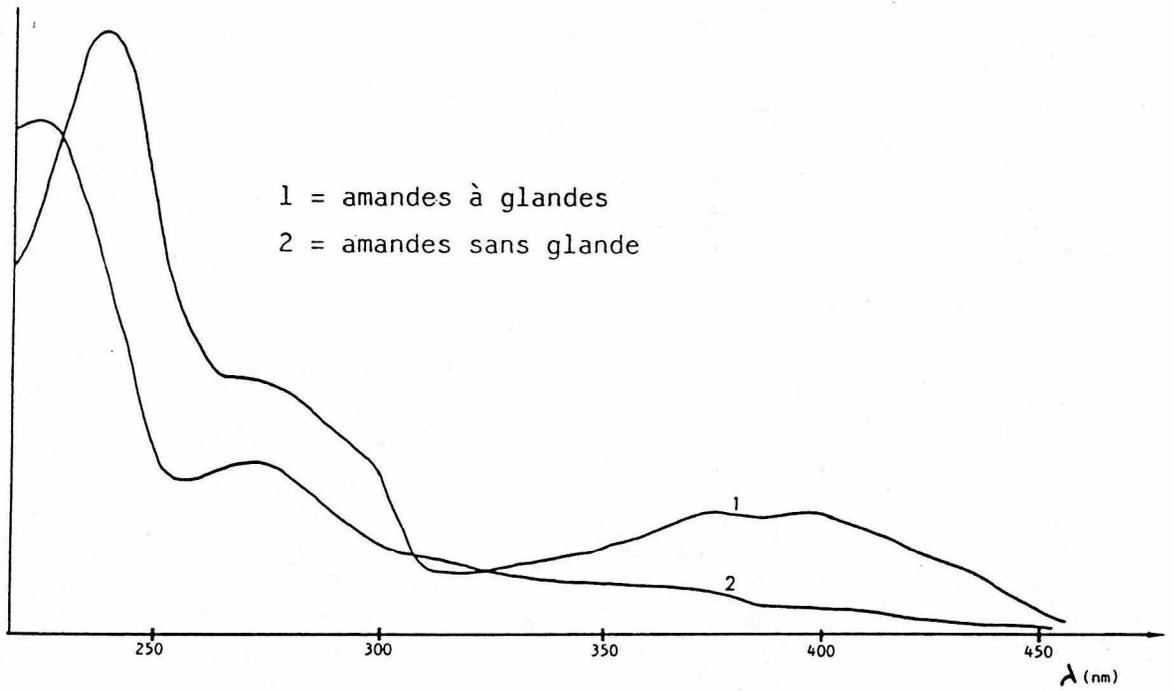


Fig. n° 31 : Spectres d'absorption des extraits hydroalcooliques bruts de composés phénoliques des amandes des deux variétés de cotonniers.

On note une similitude d'absorption entre 250 et 350 nm. L'extrait hydroalcoolique des amandes de cotonnier à glandes présente un maximum d'absorption entre 370 et 410 nm, alors que dans la même région, celui du cotonnier sans glande montre une plage d'absorption presque nulle.

Les spectres des extraits phénoliques purifiés (fig. 32) présentent deux pics nettement distincts entre 200 et 240 nm qui pourraient correspondre à des composés différents ou à des concentrations non identiques des mêmes composés selon qu'il s'agisse de cotonniers avec ou sans glandes. L'extrait de composés phénoliques des amandes à glandes présente un épaulement bien prononcé à 290 nm. Entre 300 et 400 nm, l'extrait phénolique purifié des amandes sans glande absorbe sous la forme d'une plage qui correspondrait à des terpénoïdes intermédiaires de la biosynthèse du gossypol (BELL et STIPANOVIC, 1977). Le maximum à 370 nm pour l'extrait purifié des amandes à glandes caractérise la présence de noyaux naphtyls et des groupements aldéhydes du gossypol (ADAMS et KIRKPATRICK, 1938, BOATNER, 1948). Les différentes familles de composés phénoliques solubles des amandes de cotonniers avec ou sans glandes sont donc comparables entre elles, en dehors de la présence du gossypol, caractérisé par le maximum d'absorption à 370 nm.

2 - Chromatographie sur couche mince

La chromatographie bidimensionnelle sur couche mince permet non seulement la séparation de différents composés phénoliques des amandes de cotonniers, mais aussi une approche de leur identification (Figure 33). Le gossypol et ses dérivés (tache G pour les amandes à glandes) et les autres composés apparentés au gossypol (tache X pour les amandes sans glande) se situent à un même emplacement sur les chromatoplaques, pour former des taches très importantes sur la ligne de première dimension (fig. 33). En effet, ces taches ne migrent pas en seconde dimension car leurs composés forment avec l'acide acétique des complexes insolubles.

L'utilisation des différents révélateurs conduit à distinguer 6 grandes familles ou sous-groupes de composés phénoliques que leurs caractéristiques, rassemblées dans le tableau 17 permettent de les classer en 3 grands groupes :

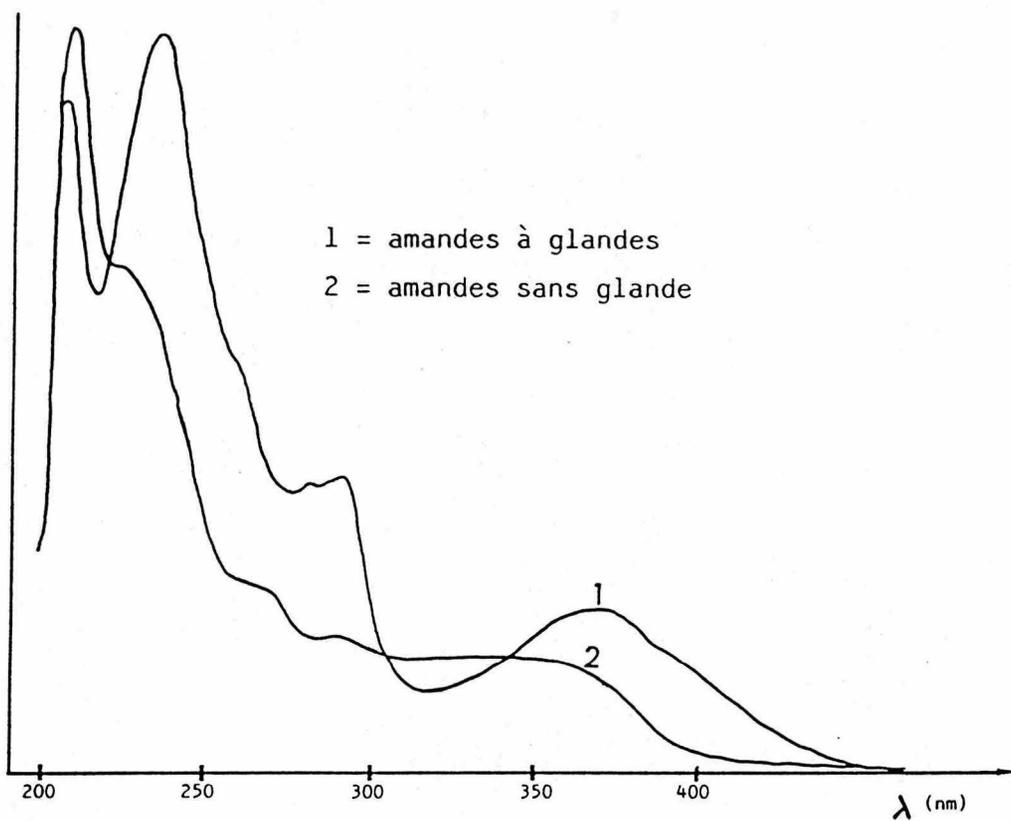


Fig. n° 32 : Spectres d'absorption entre 200 et 400 nm des extraits purifiés de composés phénoliques des amandes de deux variétés de cotonniers.

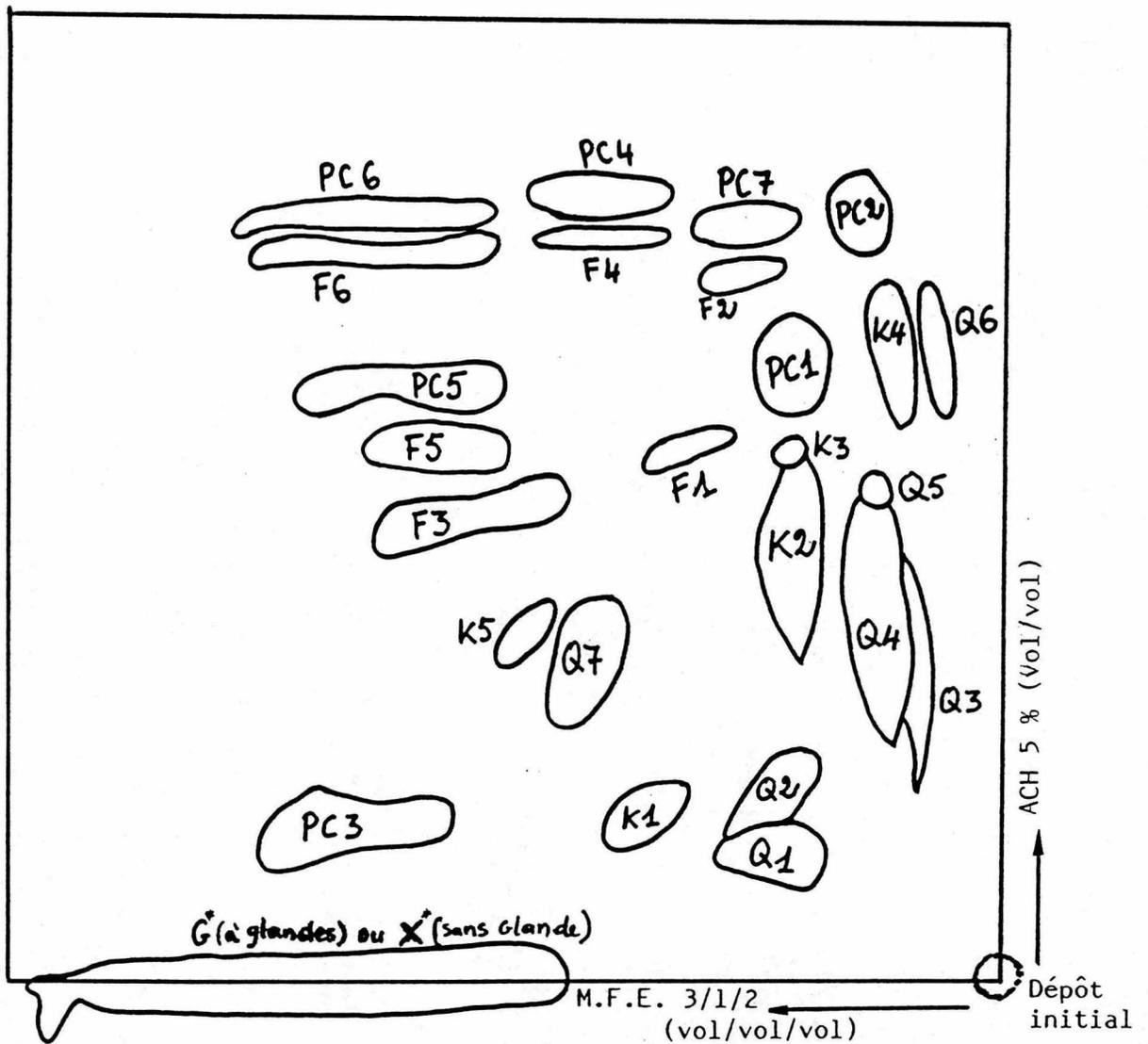


Fig. 33 : Chromatogramme récapitulatif des différents composés phénoliques présents dans les amandes de cotonniers.

* Les taches G (variétés à glandes) et X (variétés sans glande) ont le même emplacement sur les chromatogrammes.

Tableau n° 17 : Caractéristiques chromatographiques (C C M) des différents composés phénoliques identifiés : réponses aux réactifs.

Désignations des composés	UV 366 nm	NH ₃ 366 nm	BENEDIKT 366 nm	NEU 366 nm	AlCl ₃ 366 nm	Rf 2 ^e dimension (variété sans glande)	Rf 2 ^e dimension (variété à glandes)	Familles de composés	Sous-groupes	Groupes		
Q1 Q2 Q3 Q4 Q5 Q6 Q7	J.G. J.G. J.G. J.G. J.G. J.G. J.G.	J.G. J.G. J.G. J.G. J.G. J.G. J.G.	+ + + + + + +	J.OR J.OR J.OR J.OR J.OR J.OR J.OR	J. J. J. J. J. J. J	0,14 0,18 0,37 0,42 0,49 0,65 0,42	0,14 0,20 0,33 0,38 0,53 0,67 0,42	Dérivés de la quercétine (Q)	IA	I FLAVONOÏDES		
K1 K2 K3 K4 K5	J. Ve J. Ve J. Ve J. Ve J. Ve	J. Ve J. Ve J. Ve J. Ve J. Ve	- - - - -	J. Ve J. Ve J. Ve J. Ve J. Ve	J. J. J. J. J.	0,15 0,50 0,53 0,65 0,45	0,17 0,47 0,59 0,67 0,47	Dérivés de kaempférol (K)	IB			
PC1 PC2 PC3 PC4 PC5 PC6 PC7		Vi Vi Vi Vi Vi Vi Vi	- - - - - - -			0,68 0,92 0,18 0,92 0,77 0,90 0,90	0,70 0,90 0,20 0,90 0,77 0,91 0,88	Dérivés de l'acide paracoumarique (PC)	IIA		II ACIDES PHÉNOLIQUES	
F1 F2 F3 F4 F5 F6	B	B B B Ve B Ve B B				0,69 0,84 0,65 0,84 0,70 0,89	0,67 0,83 0,63 0,86 0,72 0,90	Dérivés de l'acide ferulique (F)	IIB			
G Variété à glandes	J	J.F	+	J.F	J.F		0,00	Gossypol et ses dérivés	G			III Gossypol et composés voisins
X Variété sans glande	Or	Or	+	Or			0,00	Composés voisins autres que le gossypol	X			

J. Or : Jaune Orange Or : Orange - : gain de fluorescence
 J.F. : Jaune foncé Vi : Violet + : perte de fluorescence
 J.G. : Jaune gris B. Ve : Bleu violet
 J. Ve : Jaune vert B : Bleu

Groupe I : Les flavonoïdes.

Les fluorescences de ces composés avec les réactifs de Neu et de Benedikt permettent de les subdiviser en deux sous-groupes IA et IB.

Le sous-groupe IA est représenté par les composés qui perdent leur fluorescence (réaction +) avec le réactif de Benedikt et qui se colorent en jaune orange en présence du réactif de Neu. L'ensemble de ces caractéristiques permet de les classer dans la famille de flavonols orthodiphénoliques, qui sont des dérivés de la quercétine. Ce sont les composés Q1 à Q7.

Le deuxième sous-groupe, IB, intensément fluorescent avec le réactif de Benedikt (réaction -), se colore en jaune vert en présence du réactif de Neu. Ces caractéristiques permettent de classer ces composés dans la famille des flavonols monophénoliques, qui sont des dérivés du kaempférol (composés K1 à K5).

La vaniline à 1 % dans l'HCl 12 N, destinée à révéler la plupart des flavanes ne détecte aucun de ces composés sur les chromatogrammes.

GROUPE II : Les acides phénoliques

Ils sont subdivisés en deux sous-groupes IIA et IIB selon leurs teintes de fluorescence en UV. Tous ces composés donnent des réactions (-) (gain de fluorescence à 366 nm) avec le réactif de Benedikt, ce qui indique la présence de monophénols constitués par les dérivés para-coumariques (PC) (groupe II A) et féruliques (F) (groupe IIB).

Les dérivés para-coumariques se colorent en violet devenant intense avec le réactif de Benedikt.

Les dérivés d'acide férulique (F) se colorent en bleu ou bleu vert, devenant intense avec le réactif de Benedikt.

Groupe III : Le gossypol et ses dérivés (variété à glandes) et autres composés voisins (variété sans glande).

Ce groupe comprend deux familles de composés dont G (gossypol et ses dérivés) et X (autres composés apparentés au gossypol), respectivement pour les amandes de cotonniers à glandes et sans glande.

La famille des composés G est jaune, visible à l'oeil nu. Cette couleur est intense et très peu fluorescente avec tous les réactifs. Ces composés pourraient être constitués par les différentes formes tautomériques du gossypol et par des dérivés terpénoïdes mis en évidence dans les glandes par BELL et STIPANOVIC, (1977). Les conditions des manipulations par HPLC ne nous permettent pas de dissocier tous ces composés.

La famille des composés X est très peu visible à l'oeil nu. Elle forme cependant des complexes orange très fluorescent avec les réactifs de Neu, Benedikt, le chlorure d'aluminium et les vapeurs d'ammoniaque. Ces caractéristiques ne permettent pas de les situer dans les différentes familles de composés présents dans les amandes des deux variétés de cotonniers. Ces composés pourraient regrouper certains terpénoïdes voisins du gossypol.

3 - Séparations H.P.L.C., caractérisations spectrales et propositions d'identification

3-1 Séparation H.P.L.C. utilisant un détecteur à barrettes de diodes

L'H.P.L.C. utilisant un détecteur à barrettes de diodes permet d'obtenir les chromatogrammes des figures 34a et 34b respectivement à 280 et à 360 nm pour un extrait purifié de composés phénoliques des amandes sans glande.

La figure 34a nous servira comme base pour caractériser les composés phénoliques ainsi séparés. Les chromatogrammes obtenus pour les extraits de composés phénoliques des deux types de cotonniers sont identiques. Seule la présence des pics du gossypol les différencie. Ils seraient situés au delà du pic 19 sur les figures 34a et 34b. Par conséquent, pour les identifications, nous ne nous intéresserons qu'aux pics qui sont communs aux deux extraits purifiés de composés phénoliques des deux types de cotonniers.

3-2 Caractérisations spectrales et propositions d'identification.

L'utilisation d'un détecteur à barrettes de diodes a pour avantage l'acquisition des spectres de tous les pics séparés (fig. 35 a à 35 g). Leurs maxima et minima d'absorption (tableau 18) permettent d'après les données fournies par RIBEREAU-GAYON, (1968) et MARBRY et al., (1970), de distinguer deux principaux groupes de composés phénoliques.

Fig. : 34 a

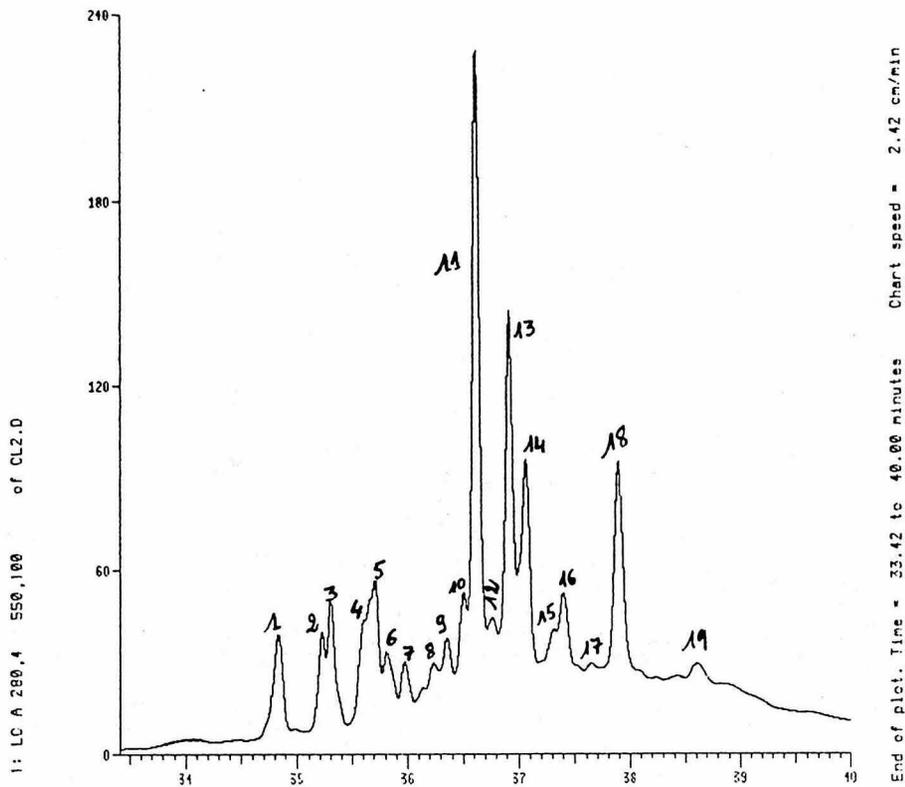


Fig. : 34 b

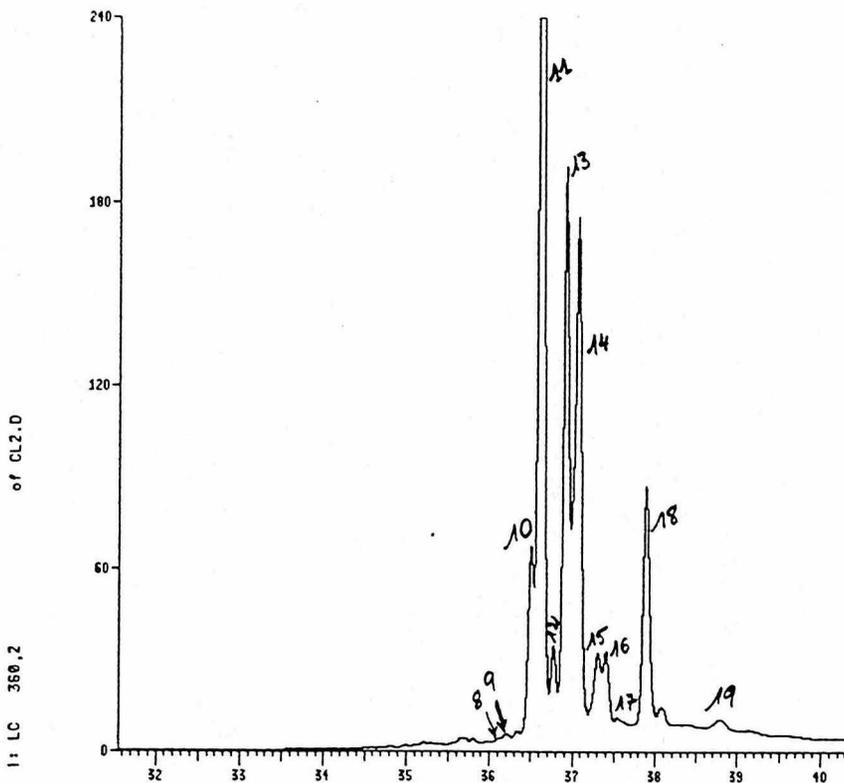


Fig. 34 a et 34 b : Chromatogrammes HPLC, respectivement à 280 et 360 nm d'un extrait purifié de composés phénoliques d'amandes sans gossypol obtenus avec un détecteur à barrettes de diodes.

Fig. 35 a

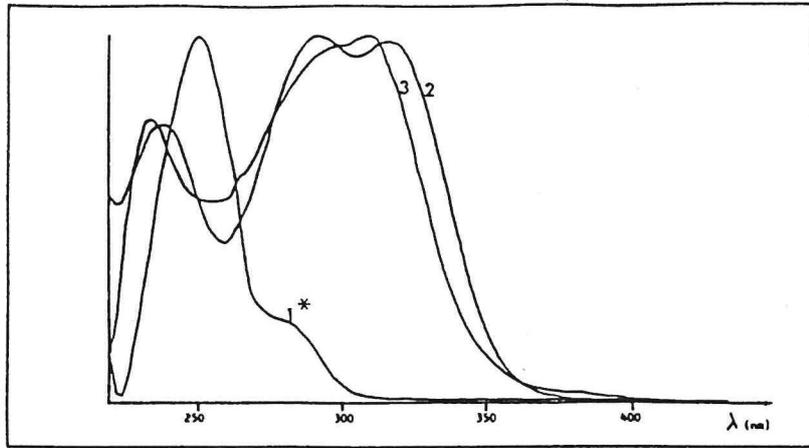


Fig. 35 b

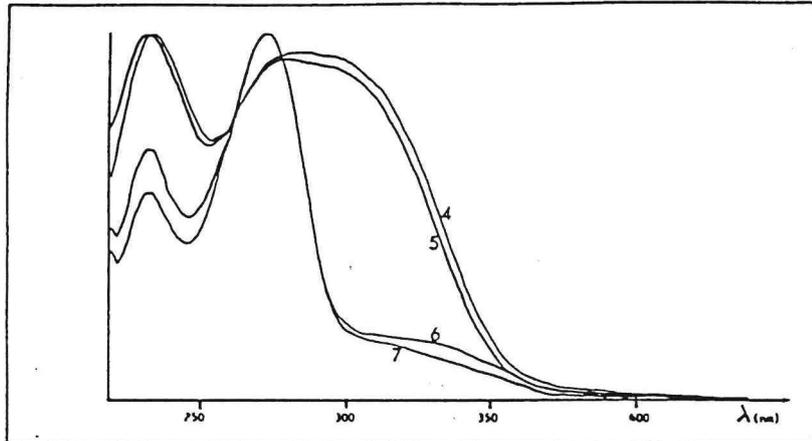


Fig. 35 c

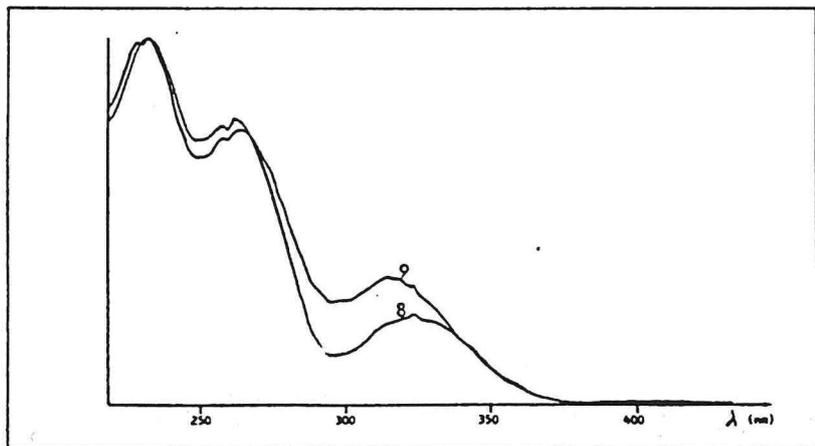
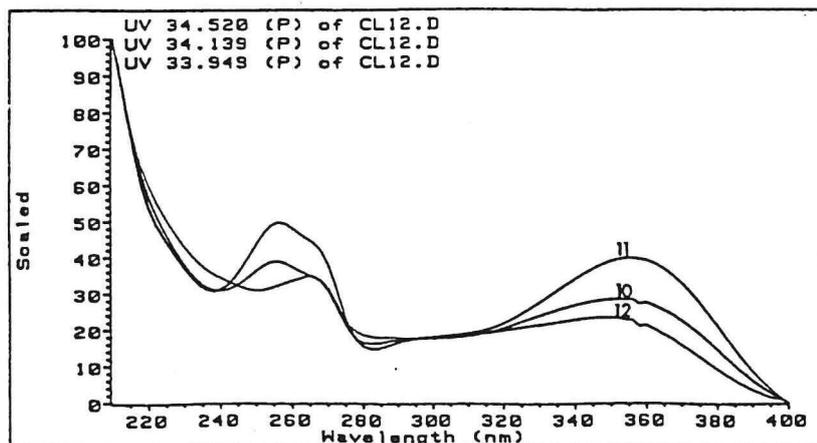


Fig. 35 d



* Les numéros des spectres correspondent à ceux indiqués sur la figure 34 a.

Fig. 35 e

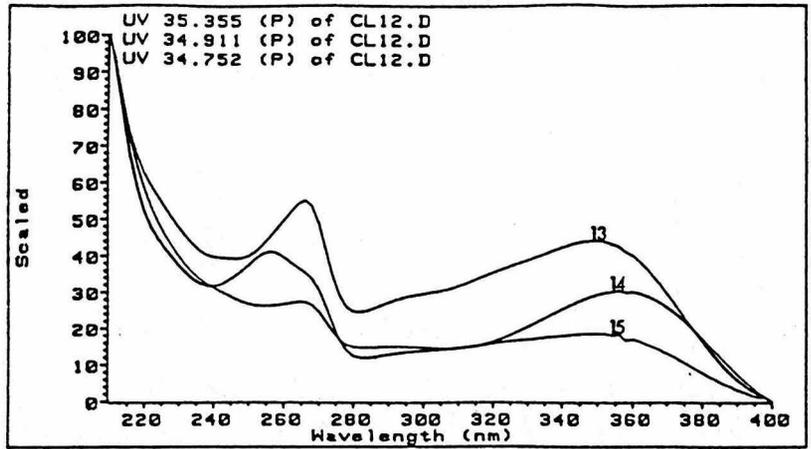


Fig. 35 f

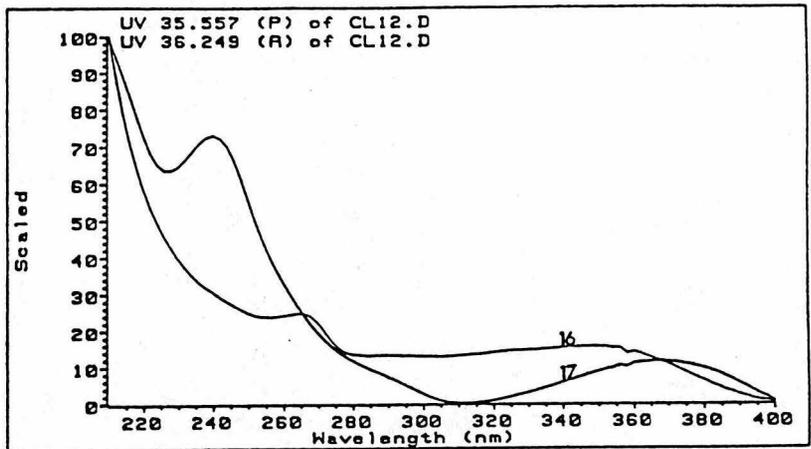


Fig. 35 g

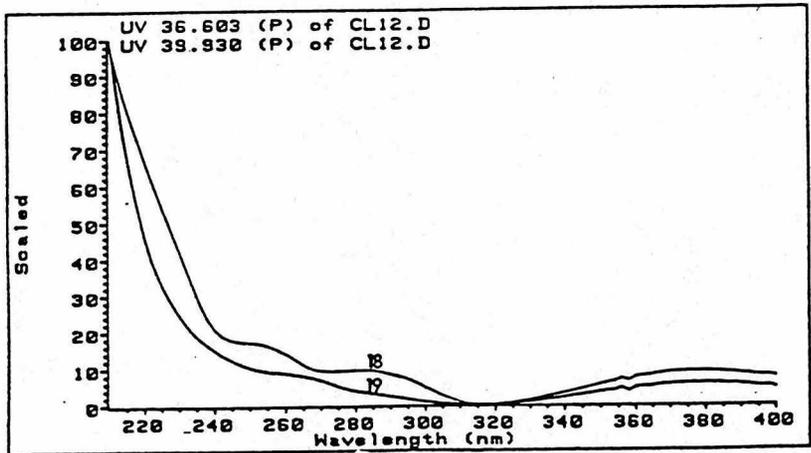


Fig. 35 a à 35 g : Spectres d'absorption des différents composés phénoliques communs aux deux types d'amandes de cotonniers, obtenus à l'aide du détecteur à barrettes de diodes. Les numéros des spectres correspondent à ceux indiqués sur les différents pics de la figure 34 a.

Tableau n° 18 : Caractérisations spectrales, correspondances CCM, et proposition d'identification de quelques composés séparés par HPLC.

Taches CCM d'après figure 33	N° pics HPLC d'après figure 34 a	Maxima d'absorption (nm)	Minima d'absorption (nm)	Identification proposée
-	1	250, (280)	-	Composé X
PC1 - PC2	2	240, 290, 320	260, 305	Dérivés hydroxycinnamiques
	3	240, 295, 315	260, 300	
	4	245, 275 à 315	255	
	5	240, 275 à 315	255	
F5	6	240, 275 (320)	-	
PC7	7	240, 275 (320)	-	
Q6	8	235, 262,5; 324,5	250, 295	
K4	9	235, 262,5; 316	250, 295	
Q ₃ Q ₄ Q ₅	10	255, 357,5	240, 280	→(Rutine)
	11	255, 357,5	240, 280	
	12	266, 357,5	250, 280	
K ₁ K ₂	13	265, 352,5	240, 282,5	Flavonoïdes
	14	255, 357,5	240, 282,5	
-	15	267,5; 355	252,5, 282,5	
-	16	267, 355	255, 280	
Q ₁ Q ₂	17	242,5; 370	230, 310	→(Quercétine)
	18	255, 287,5; 380	320	
	19	265, 380	320	

Les valeurs entre parenthèses désignent les épaulements
 PC = dérivés P-coumariques, F = dérivés féruliques
 Q = dérivés de quercétine, K = dérivés de Kaempférol

Il s'agit des dérivés d'acides phénoliques (principalement les hydroxycinnamiques) et les flavonoïdes (tableau 18). Ces résultats confirment ceux obtenus par chromatographie sur couche mince.

D'autres composés (PC3 à PC6, F1, F2, F3, F4, F6, Q7, K3, K5) (voir plus haut fig. 33) n'ont pas pu être caractérisés à cause de leurs très faibles concentrations. Ils ne sont pas détectables par H.P.L.C.. Si l'on injecte de la rutine et de la quercétine pures, on constate que leurs temps de rétention correspondent à ceux des pics 11 et 18 (fig. 34a). L'utilisation d'autres témoins ne nous a pas permis d'établir d'autres correspondances avec les dérivés hydroxycinnamiques caractérisés.

A cause des difficultés rencontrées (faibles concentrations de certains composés séparés, rareté des témoins de flavonoïdes disponibles dans le commerce) et pour respecter notre objectif principal qui est celui de la détoxification des amandes, nous n'avons pas poussé plus loin les identifications.

4 - Discussion et conclusion générale sur les structures des composés phénoliques présents dans les amandes de cotonniers.

Les amandes de cotonniers contiennent essentiellement les dérivés des acides phénoliques, les flavonoïdes et en plus le gossypol pour les variétés à glandes. Les acides phénoliques seraient des dérivés d'acides cinnamiques (C6-C3), essentiellement les acides para-coumarique et férulique. Leur structure générale est présentée par la figure 36a. Toutefois, nous n'avons noté ni par H.P.L.C., ni par CCM, la présence de dérivés d'acide caféique (MAGA et LORENTZ, 1974, DABROWSKY et SOSULSKI, 1984 b), ni celle des dérivés d'acides chlorogénique, sinapique, syringique, gentsique, vanillique, salicylique, protocatéchuique (MAGA et LORENTZ, 1974).

Les flavonoïdes (C6-C3-C6) sont représentés par les flavonols constitués essentiellement par des dérivés de quercétine et de kaempférol (fig. 36b).

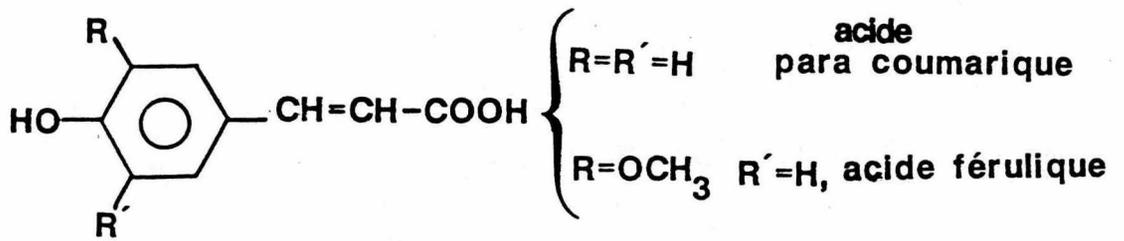


Fig. : 36 a : Formule générale des acides coumarique et férulique

<p>flavonols</p>	R ₁	R ₂	R ₃	noms
			OH	
		OCH ₃		kaempféridol
	OH	OH		quercétol
	OH	OH	OH	myricétol
	OCH ₃	OH		isorhamnétol

Fig. 36 b : Formules générales des flavonols

Fig. 36 a et 36 b : Formules générales des composés phénoliques autres que le gossypol, des amandes de cotonniers.

Par H.P.L.C., nous avons caractérisé 12 flavonoïdes majeurs dont certains seraient voisins des 7 autres déjà identifiés dans les amandes sans glande par BLOUIN et al., (1981), à savoir : l'isoquercitrine, la rutine, le robinoside 3-O quercétol, le néohespéridoside 3-O-quercétol, le néohespéridoside 3-O kaempférol, le glucoglucoside 3-O quercétol et le glucoglucoside 3-O kaempférol.

Des travaux antérieurs (PRATT et WENDER, 1959, 1961), signalent également la présence, dans les amandes de cotonniers, de la rutine, l'isoquercitrine, le rhamnoglucoside 3-O kaempférol, le glucoglucoside 3-O quercétol qui sont aussi voisins de ceux que nous avons caractérisés.

Le gossypol, dont la formule générale est présentée sur la figure 5 n'existe que dans les cotonniers à glandes.

III- Estimation de la somme des teneurs en composés phénoliques.

1 - Séparation H.P.L.C. utilisant un détecteur UV/visible simple

Les figures 37a et 37b montrent les chromatogrammes enregistrés à 280 nm pour les extraits purifiés de composés phénoliques respectivement des amandes avec et sans glande et qui nous ont servi pour les déterminations des teneurs en composés phénoliques totaux. Comparés aux figures 34a et 34b (voir plus haut), on constate que les pics 20 à 25, de moindre importance, apparaissent en surplus en dehors du groupe de composés correspondant au gossypol et ses analogues (Figure 37a). A cause des pertes en gossypol libre (72 % du total extrait) lors de la délipidation des composés phénoliques, et pour des raisons évoquées plus haut, (page 59), le gossypol libre est extrait et dosé sur des prises d'essai séparées. La figure 38 montre un chromatogramme témoin du complexe de gossypol-acétique réalisé à 280 nm.

2 - Sommes des teneurs des composés phénoliques déterminées par HPLC.

Les sommes des teneurs des composés phénoliques des amandes broyées et non délipidées des cotonniers à glandes (Pavlikéni et GIZA 75) et sans glande (BC4 et F-281), ainsi que les teneurs et les pourcentages relatifs de chacun des groupes de composés phénoliques ont été déterminés par H.P.L.C. (tableau 19).

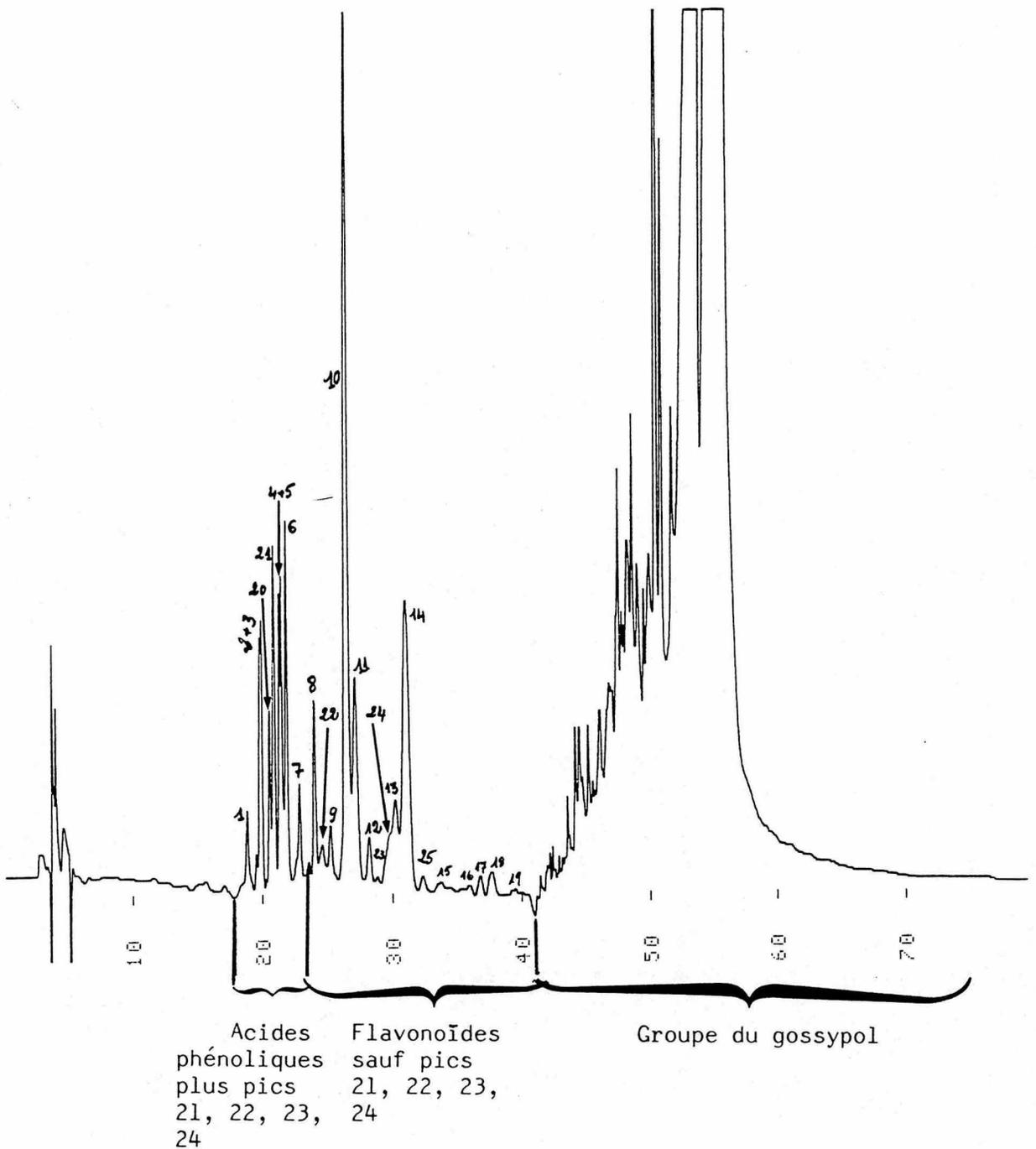


Fig. n° 37 a : Chromatogramme HPLC à 280 nm d'un extrait purifié de composés phénoliques d'amandes de la variété à glandes obtenu avec un détecteur UV/visible simple. Les numérotations sont identiques à celles de la figure 34 a.

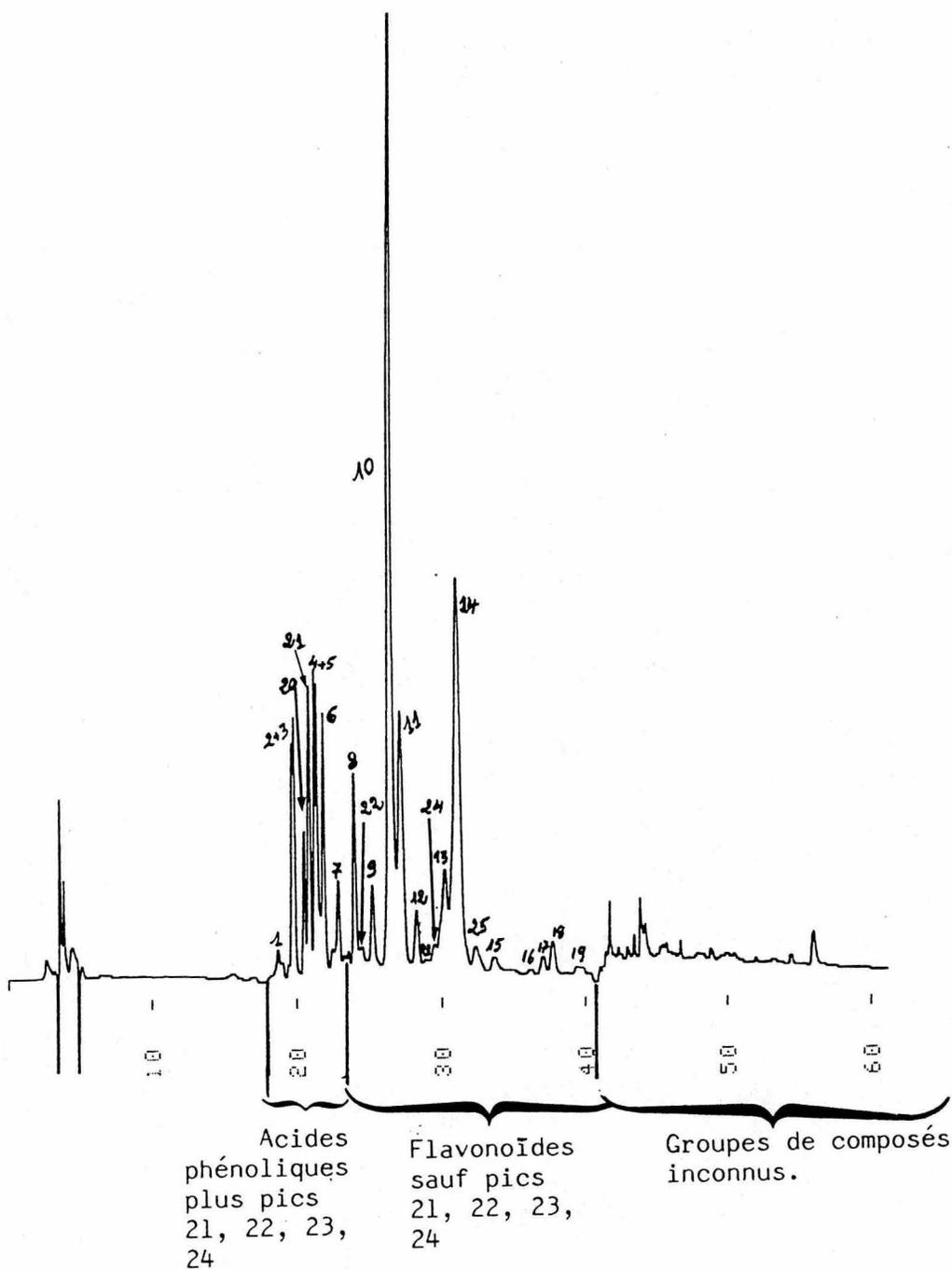


Fig. n° 37 b : Chromatogramme HPLC à 280 nm d'un extrait purifié de composés phénoliques d'amandes de la variété sans glande obtenu avec un détecteur UV/visible simple. Les numérotations sont identiques à celles de la figure 34 a.

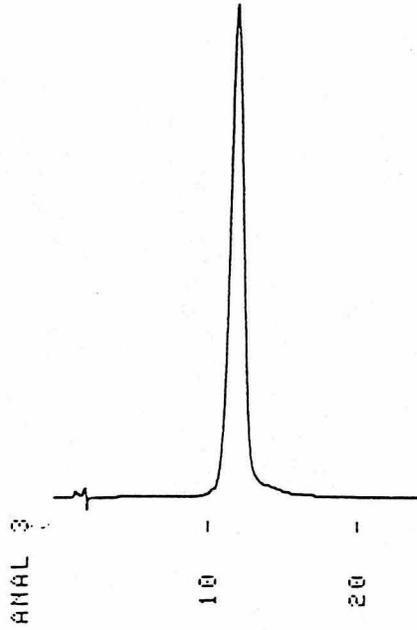


Fig. 38 : Chromatogramme d'une solution témoin de gossypol-acétique à 280 nm

Tableau n° 19 : Détermination par HPLC des sommes des composés phénoliques (mg/100g M.S.), teneurs et pourcentages relatifs de chaque groupe de composés phénoliques contenus dans les amandes de cotonniers avec et sans glandes.

COTONNIERS		Sommes des teneurs des composés phénoliques (mg/100g M.S.)	Flavonoïdes		Acides phénoliques		Gossypol libre	
			Teneurs mg/100 M.S.	% relatifs	Teneurs mg/100 g M.S.	% relatifs	Teneurs mg/100 g M.S.	% relatifs
VARIETES A GLANDES	PAVLIKENI	1127,83	66,90	5,93	62,21	5,51	998,72	88,55
	GIZA 75	1089,17	65,16	5,98	42,69	3,92	981,32	90,10
VARIETES SANS GLANDE	BC4	123,53	70,45	57,97	51,08	42,03	0	0
	F-281	70,02	42,09	60,11	27,93	39,88	0	0

Les amandes des variétés à glandes présentent des teneurs en composés phénoliques plus élevées que celles sans glande (à cause de la présence du gossypol libre) et des teneurs pratiquement identiques en flavonoïdes. On note la proportion considérable du gossypol par rapport aux autres composés phénoliques.

Dans les amandes des variétés sans glande, les flavonoïdes constituent les composés phénoliques majeurs devant les acides phénoliques. Quelle que soit la variété sans glande considérée, les proportions en flavonoïdes et en acides phénoliques sont comparables entre elles. Il apparaît donc que la biosynthèse des composés phénoliques, donc leurs concentrations est inférieure dans les amandes de cotonniers sans glandes. Sur la figure 39, nous avons résumé les différentes voies métaboliques de la formation des composés dans les amandes de cotonniers. Dans les amandes à glandes, la voie IIIA (formation du gossypol) est prépondérante devant les voies I,II,IIIB. En revanche, dans les amandes sans glande, ce sont les flavonoïdes (voie II) et les acides phénoliques (voie I) qui sont formés.

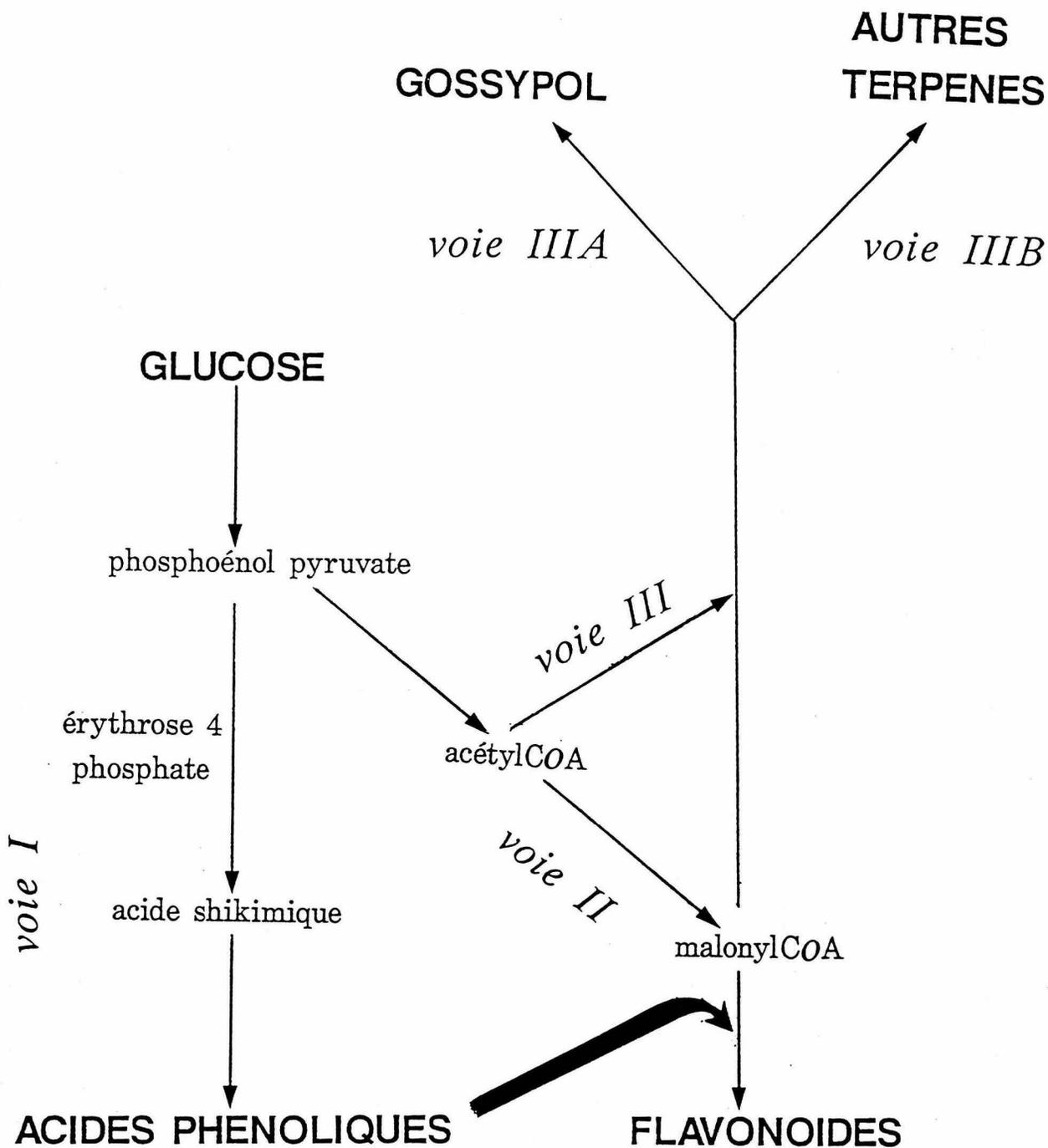


Fig. 39 : Schéma simplifié de la biosynthèse des composés phénoliques dans les amandes de cotonniers avec ou sans glandes.

3 - Comparaison des teneurs en composés phénoliques totaux déterminées par la méthode de Folin-Ciocalteu avec celles estimées par HPLC.

Les teneurs en composés phénoliques totaux des extraits bruts des amandes broyées et non délipidées des quatre types de cotonniers étudiés ont été déterminées par la méthode de Folin-Ciocalteu, puis comparées aux résultats estimés par H.P.L.C. (tableau 20). La méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu est moins spécifique que l'H.P.L.C.. Elle surévalue considérablement les résultats. La présence de substances interférentes (lipides, protéines, acides aminés, sucres etc...) non fixées par le polyvinylpyrrolidone est certaine. En effet, comme l'indiquent JOSLYN et GOLSTEIN, (1964), MARIGO, (1973), des composés comme les glucides, les protéines, les acides aminés et d'autres pigments peuvent donner naissance, dans les conditions des analyses à des complexes colorés.

Tableau 20 : Teneurs en composés phénoliques totaux des amandes non délipidées des cotonniers étudiés, déterminées par la méthode de Folin-Ciocalteu comparées aux estimations par H.P.L.C. (mg/% M.S).

VARIETES		H.P.L.C.	Colorimétrie (Folin-Ciocalteu)
A Glandes	PAVLIKENI	1127,84	4188,32
	GIZA 75	1089,15	5581,10
Sans Glande	BC4	121,53	1508,08
	F- 281	70,03	1307,83

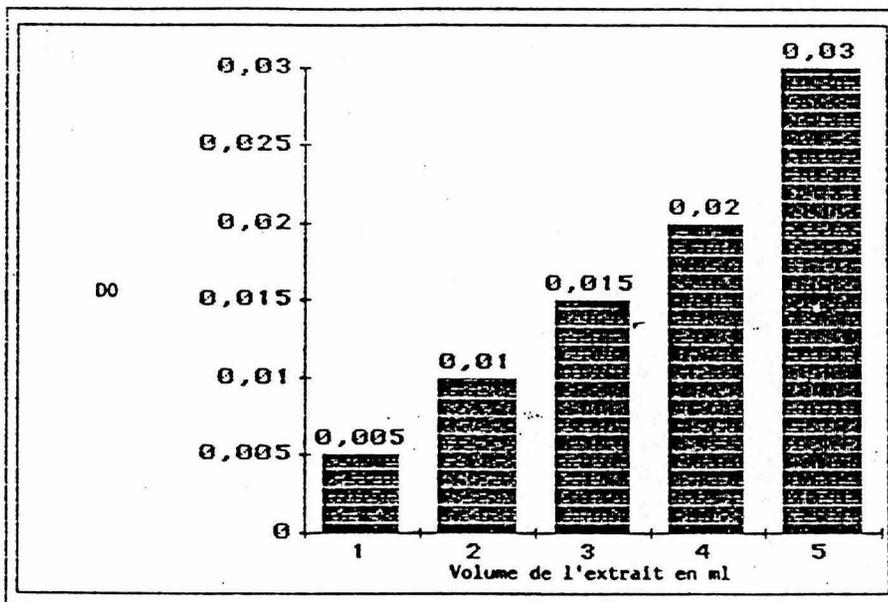
IV - Teneurs en gossypol libre

1 - Non fiabilité de la méthode de dosage AOCS

Au cours du dosage du gossypol libre par l'aniline, ce réactif réagit avec d'autres constituants des amandes pour surévaluer les résultats (STIPANOVIC et al., 1984, JOHNSON et al., 1986). Ceci est très remarquable pour les amandes contenant très peu de gossypol. C'est ce que nous montrons ici, en étudiant l'interférence de l'aniline avec des extraits hydroalcooliques contenant ou non du gossypol.

1-1 - Extrait brut de composés phénoliques plus aniline seule.

Lorsqu'on fait réagir les composés phénoliques de l'extrait brut de la variété sans gossypol avec l'aniline, dans les conditions de la méthode Ba 7-58 (AOCS, 1958), on constate que la densité optique augmente progressivement avec la quantité de composés phénoliques (déterminée par la méthode de Folin-Ciocalteu sans utilisation du polyvinylpyrrolidone) présents dans le milieu réactionnel (Fig. 40). Cette évolution des densités optiques par rapport aux témoins ne renfermant pas d'aniline, caractérise l'interférence due aux autres constituants des amandes au cours des dosages colorimétriques, entre autres, les autres composés phénoliques.



- 1 ml d'extrait brut correspond à 52,54 mg de composés ayant réagi avec le réactif de Folin-Ciocalteu.

Fig. 40 : Réaction d'un extrait brut de composés phénoliques des amandes de la variété sans glande BC4 avec l'aniline : évolution de la densité optique en fonction du volume de l'extrait brut.

1-2 Extrait brut de composés phénoliques plus
solutions témoins de complexe de
gossypol-acétique plus aniline

Nous avons suivi l'évolution des teneurs en gossypol dans des prises d'essai de 1 ml des solutions de complexe de gossypol-acétique (respectivement à 0,194mg/ml et $0,194 \cdot 10^{-2}$ mg/ml dans l'acétone à 70 % dans l'eau) en fonction de la quantité ajoutée de composés phénoliques de l'extrait brut d'amandes sans glande.

Pour la solution de complexe de gossypol-acétique à 0,194 mg/ml, les résultats des analyses (tableau 21) montrent que les teneurs en gossypol lues sur la courbe étalon de gossypol-acétique augmentent dans le même sens que les quantités de composés phénoliques ajoutées dans les prises d'essai. Lorsqu'on exprime l'erreur commise en terme de surévaluation de gossypol par rapport au témoin considéré comme égal à 100 (essai 1), elle passe de 11,34 % à 15,29 pour respectivement 52,45 mg et 209,80 mg de composés phénoliques bruts ajoutés dans le milieu réactionnel, ce qui prouve qu'il y a des interférences.

Lorsque la solution de complexe de gossypol-acétique est diluée 100 fois ($0,194 \cdot 10^{-2}$ mg/ml), on constate (tableau 22), que, pour les mêmes quantités de composés phénoliques que précédemment, on commet 150 à 400 % d'erreur sur les teneurs attendues en gossypol.

Ces phénomènes indiquent ainsi une très forte perte de sensibilité de la méthode colorimétrique de l'AACS pour des échantillons renfermant des faibles pourcentages de gossypol.

1-3 Extrait brut de composés phénoliques plus
extrait d'amandes renfermant le gossypol
plus aniline

L'évolution de la teneur en gossypol libre d'un extrait d'amandes à glandes en fonction de la quantité de composés phénoliques bruts ajoutée dans des prises d'essais de 1 ml est donnée dans le tableau 23. Les résultats sont comparés à celui de l'H.P.L.C.. La teneur en gossypol libre lue sur la courbe étalon augmente en fonction des quantités de composés phénoliques bruts ajoutées. On dose plus de gossypol libre par colorimétrie que par H.P.L.C.. L'erreur commise sur la teneur en gossypol libre (surévaluation par rapport à l'H.P.L.C.) croît dans le même sens que la quantité de composés phénoliques ajoutée.

Tableau n° 21 : Influence de la présence d'autres constituants des amandes (extrait brut de composés phénoliques) sur la teneur en gossypol attendue à partir d'une solution de complexe de gossypol acétique à 0,194 mg/ml dans l'acétone à 70 %.

Numéros d'essais	a = quantités de gossypol acétique de départ (mg)	b = quantités de composés phénoliques totaux ajoutées dans a (mg)	c = gossypol libre de la solution b, lu sur la courbe étalon (mg)	% de gossypol libre obtenu $d^* = \frac{C_n}{a_1} \times 100$	% de surévaluation par rapport à l'essai 1 = d - 100
1	0,194	0,00	0,194	100,00	0,00
2	0,194	52,450	0,216	111,34	11,34
3	0,194	104,900	0,219	112,88	12,88
4	0,194	157,350	0,221	113,91	13,91
5	0,194	209,800	0,223	115,29	15,29

*d, le pourcentage de gossypol obtenu est calculé en considérant que l'essai 1 ne contenant pas de composés phénoliques ajoutés correspond à 100 % de gossypol.

Tableau n° 22 : Influence de la présence d'autres constituants des amandes (extrait brut de composés phénoliques) sur la teneur en gossypol attendue à partir d'une solution de complexe de gossypol-acétique à $0,19410^{-2}$ mg/ml dans l'acétone à 70 %.

Numéros d'essais	a = quantités de gossypol acétique de départ (mg)	b = quantités de composés phénoliques totaux ajoutées dans a (mg)	c = gossypol libre de la solution b, lu sur la courbe étalon (mg)	% de gossypol libre obtenu $d^* = \frac{C_n}{a_1} \times 100$	% de surévaluation par rapport à l'essai 1 = d - 100
1	$0,19410^{-2}$	0,000	$0,19410^{-2}$	100,00	0,00
2	$0,19410^{-2}$	54,450	$0,485 \cdot 10^{-2}$	250,00	150,00
3	$0,19410^{-2}$	104,900	$0,646 \cdot 10^{-2}$	332,98	232,98
4	$0,19410^{-2}$	157,350	$0,808 \cdot 10^{-2}$	416,49	316,49
5	$0,19410^{-2}$	209,800	$0,970 \cdot 10^{-2}$	500,00	400,00

*d, le pourcentage de gossypol obtenu est calculé en considérant que l'essai 1 ne contenant pas de composés phénoliques ajoutés correspond à 100 % de gossypol.

Tableau n° 23 : Influence de la présence d'un extrait brut de composés phénoliques sur la teneur en gossypol libre d'un extrait d'amandes à glandes PAVLIKENI.

Numéros d'essais	Extrait d'amandes à glandes analysé (ml)	b = quantité de composés phénoliques totaux ajoutée (mg)	c = gossypol libre trouvé, lu sur la courbe étalon (g/100 g M.S.)	% de gossypol libre trouvé sur valeur HPLC $d^* = \frac{C_n}{0,98} \times 100$	% de surévaluation du gossypol par rapport à l'HPLC = d - 100
1	1	0	1,26	128,57	28,57
2	1	52,45	1,33	135,71	35,71
3	1	104,90	1,37	139,80	38,80
4	1	157,35	1,41	143,87	43,87
5	1	209,80	1,41	147,95	47,95

*d est calculé par rapport à la teneur en gossypol libre (0,98 g pour 100 g M.S.) obtenue par HPLC. On considère que 0,98 % correspond à 100 % de gossypol estimé.

1-4 Discussion et conclusion.

La réaction de l'aniline a lieu au niveau des deux groupements aldéhydes de la molécule du gossypol. Ces groupements sont aussi présents dans certains terpénoïdes (Fig. 41) identifiés dans les glandes de cotonniers par BELL et al., (1974), BELL et STIPANOVIC, (1977), CHAN et al., (1983), MAHONEY et CHAN, (1985).

Les extraits bruts de composés phénoliques des amandes contiennent de nombreux autres constituants, les flavonoïdes, les acides phénoliques, pouvant interférer avec l'aniline et, par conséquent on note une surévaluation des teneurs en gossypol libre.

Les dérivés du gossypol et les produits de dégradation des acides gras insaturés (les aldéhydes) peuvent aussi donner des composés réagissant avec l'aniline (STIPANOVIC et al., 1984) pour surévaluer encore les teneurs en gossypol. Un tel dosage colorimétrique, ne traduit que la résultante des réactions de divers constituants des amandes avec l'aniline. Moins il y a de gossypol dans un échantillon, plus l'erreur de dosage est grande.

2 - Analyse statistique des teneurs en gossypol libre
déterminées par les méthodes AOCS et H.P.L.C.

Les teneurs en gossypol libre de 10 sélections génétiques de cotonniers à glandes ont été déterminées par les méthodes AOCS et H.P.L.C. (tableau 24), puis comparées.

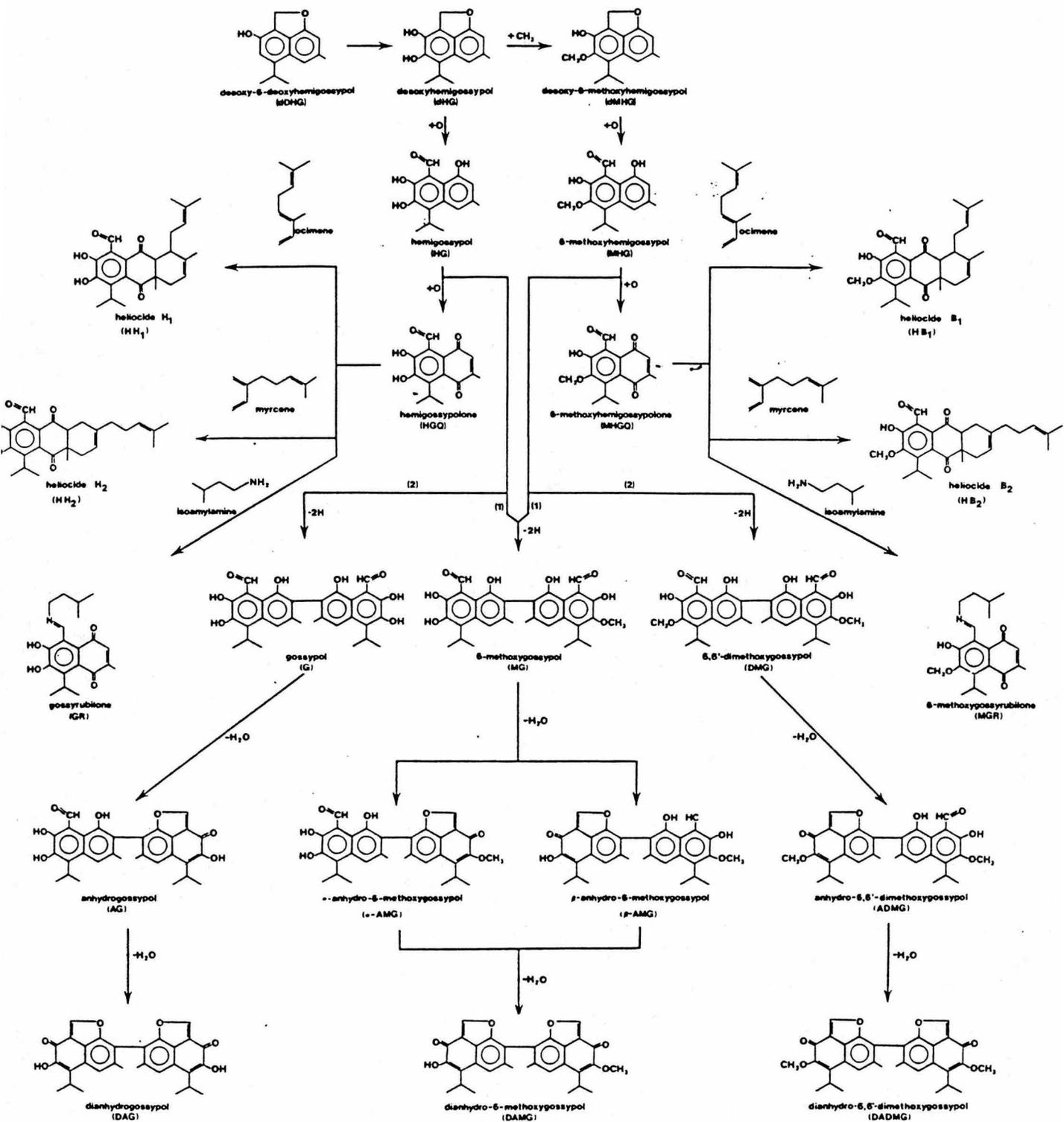


Fig. n° 41 : Structures et relations biochimiques des terpénoïdes des glandes à pigments du cotonnier (BELL et STIPANOVIC, 1977)

Tableau n° 24 : Teneurs en gossypol libre (g/100 g M.S.) de 10 sélections génétiques de cotonniers à glandes déterminées par les méthodes AOCS et HPLC.

N°	Sélections	Méthode officielle de l'AOCS			Méthode HPLC		
		1 ère répétition R ₁	2 ème répétition R ₂	Moyenne M ₁	1 ère répétition	2 ème Répétition	Moyenne M ₁
1	101-102 B	1,313	1,327	1,320	1,178	1,200	1,189
2	CHIRPAN-26	1,079	1,084	1,081	0,748	0,760	0,754
3	KANDUA-2	1,200	1,179	1,189	0,951	1,000	0,975
4	SP-21-5	1,308	1,319	1,313	1,141	1,185	1,163
5	KO-417	0,759	0,790	0,774	0,620	0,615	0,617
6	STAM-82	1,076	1,100	1,088	0,875	0,891	0,883
7	DP-NSL	1,529	1,493	1,511	1,379	1,381	1,380
8	ZIAO-MIAN 4	1,183	1,200	1,191	1,080	0,960	1,020
9	CHIRPAN-3996	0,580	0,530	0,550	0,455	0,500	0,477
10	TX-H6-8H-76	1,213	1,236	1,224	1,084	1,070	1,077
Total				11,241			9,532
PPds*				0,020			0,035

*PPds = Plus Petite différence significative

2-1 Méthode AOCS

Le tableau 25 présente les analyses de variances pour la méthode AOCS. Pour la variance de répétition (r), ce tableau donne F calculé égal à 0,005. F table est égal à 5,12 et 10,56 respectivement pour 5 et 1 % d'erreur. Ces valeurs étant supérieures à celle de F calculé, on peut en conclure qu'il n'existe pas de différence significative entre les résultats.

Quant à la variance introduite par les variétés (v) correspondant aux 10 sélections de cotonniers, F calculé (401,54) est largement supérieur à 5,38 et 3,18 qui sont les valeurs de F table respectivement pour 1 et 5 % d'erreur. On en conclut qu'il y a des différences hautement significatives entre les valeurs introduites par les variétés ou sélections de cotonniers. Toutes les sélections sont différentes, et les analyses sont reproductibles. La PPDs (plus petite différence significative) à 5 % est de 0,020. Si la différence entre les teneurs en gossypol libre de deux sélections est inférieure ou égale à 0,020, on peut dire qu'elles sont identiques.

Tableau 25 : Analyse des variances des teneurs en gossypol libre de 10 sélections de cotonniers à glandes déterminées par la méthode AOCS.

Source de variations	Degré de liberté (d.l.)	Somme des carrés (S.C.)	Somme des carrés moyens S.C.M. (variance)	Test F
Répétition (r)	r-1 = 1	0,00002	0,00002	0,005
Variétés (v)	V-1 = 9	1,384095	0,153788	401,54**
Erreur	(r-1) (V-1) = 9	0,003447	0,000383	
Total	19	1,387562		

2-2 H.P.L.C.

Le tableau 26 présente les analyses de variances pour la méthode H.P.L.C.. Pour la variance de répétition (r), F calculé (0,144) est inférieur à 10,56 et 5,12 qui sont les valeurs de F table respectivement à 1 et 5 % d'erreur. On peut en conclure qu'il n'existe pas de différence significative entre les répétitions (r) des analyses. Toutes les injections sont identiques et reproductibles. Quant à la variance introduite par les variétés (v) correspondant aux 10 sélections de cotonniers, F calculé est égal à 126,229, valeur qui est très supérieure à celles de F table qui sont de 5,35 et 3,81 respectivement pour 1 % et 5 % d'erreur. Il existe donc une différence significative entre les 10 sélections de cotonniers.

Tableau n° 26 : Analyses des variances des teneurs en gossypol libre de 10 sélections de cotonniers à glandes déterminées par HPLC

Source de variance	Degré de liberté (d.l.)	Somme des carrés (S.C.)	Somme des carrés moyens S.C.M. (variance)	Test F
Répétition (r)	r-1 = 1	0,0001743	0,0001743	0,144
Variétés (v)	v-1 = 9	1,3745305	0,1527256	126,229**
Erreur	(r-1)(v-1) = 9	0,0108892	0,00120991	
Total	19	1,385594		

2-3 Comparaison des résultats des deux méthodes.

Les différents paramètres statistiques pour les deux méthodes de dosage sont rassemblés dans le tableau 27. "t" calculé est supérieur aux t fournis par la table pour les seuils de signification de 1 et 5 %.

On peut donc en conclure que la différence des résultats entre les deux méthodes ($X_1 - X_2 \pm t_{5\%} = 0,3408$) est hautement significative. Ces résultats indiquent que la méthode colorimétrique AOCS dose plus de gossypol libre que l'H.P.L.C.. Comme nous l'avons indiqué précédemment, l'aniline utilisée comme réactif réagit en effet avec d'autres constituants des amandes. La méthode H.P.L.C., précise, sensible et sélective donne de meilleurs résultats.

Tableau 27 : Comparaison statistique des méthodes de dosages du gossypol libre par AOCS et H.P.L.C.

Constituants	Méthode AOCS	Méthode H.P.L.C.
Total X	11,241	9,532
Variétés n =	10	10
Moyenne \bar{X}	1,1241	0,9532
SCM	13,3337	9,7781
SCT	12,6360	9,0859
Variance	0,0154	
Test t calculé	11,0974	
Test t table	t à 1 % = 2,878 , t à 5 % = 2,101	
Différence entre les deux méthodes	0,3408	
$X_1 - X_2 \pm t_{5\%}$		

V - Teneurs en gossypol total

1 - Séparation H.P.L.C.

Lorsque le gossypol combiné est hydrolysé par l'acide oxalique, le chromatogramme de l'extrait de gossypol total à 280 nm est identique à celui du gossypol libre ou du complexe de gossypol-acétique (voir plus haut, Fig. 38).

Quand on hydrolyse le gossypol combiné par l'acide acétique avec complexation du gossypol total par l' amino-3-propanol 1, le chromatogramme à 280 nm est équivalent à celui du complexe de gossypol-acétique traité de la même façon (Fig 42).

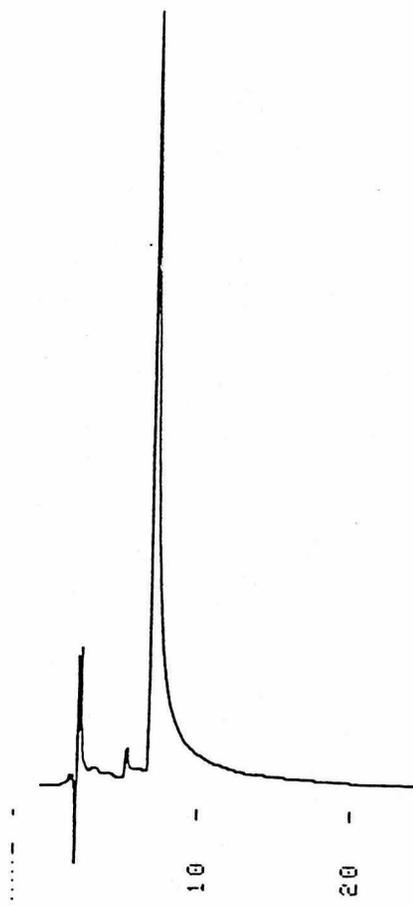


Fig. 42 : Chromatogramme témoin à 280 nm du gossypol-acétique complexé par l' amino-3-propanol-1

2 - Détermination du temps optimum d'hydrolyse
du gossypol combiné par l'acide oxalique

La méthode officielle de l'AACS préconise l'hydrolyse du gossypol combiné pendant 6 à 7 heures, voire même 16 heures ou toute une nuit. Nous avons voulu vérifier le temps optimum d'hydrolyse du gossypol combiné qui fournit le taux maximum de gossypol total. Nos résultats montrent que, pour les deux variétés étudiées de cotonniers à glandes, le maximum de gossypol total est obtenu, par les méthodes AACS et H.P.L.C., après 3 heures d'hydrolyse (Fig. 43 a et 43 b). Les teneurs en gossypol total diminuent ensuite légèrement jusqu'à 6 heures, ceci quelle que soit la méthode de dosage.

3 - Comparaison des différentes méthodes de dosage
du gossypol total

Les résultats de dosage du gossypol total par colorimétrie et par H.P.L.C. après hydrolyse du gossypol combiné par l'acide oxalique ou par l'acide acétique sont présentés dans le tableau 28. L'H.P.L.C. fournit des résultats inférieurs aux méthodes colorimétriques, du fait que d'autres constituants des amandes interfèrent avec l'aniline. Appliquée à l'H.P.L.C., l'hydrolyse par l'acide acétique permet de doser un peu plus de gossypol total que l'hydrolyse par l'acide oxalique.

Tableau 28 : Comparaison des teneurs en gossypol total des amandes de deux variétés à glandes (PAVLIKENI et GIZA 75) déterminées par les méthodes colorimétriques et par H.P.L.C. en fonction des modes d'hydrolyse du gossypol combiné. (g/% M.S.)

VARIETES	Modes d' hydrolyse			
	acide acétique		acide oxalique	
	Colorimétrie PONS et al., 1958	H.P.L.C.	Colorimétrie AACS, 1958	H.P.L.C.
PAVLIKENI	1,51	1,33	1,45	1,24
GIZA 75	1,53	1,32	1,49	1,23

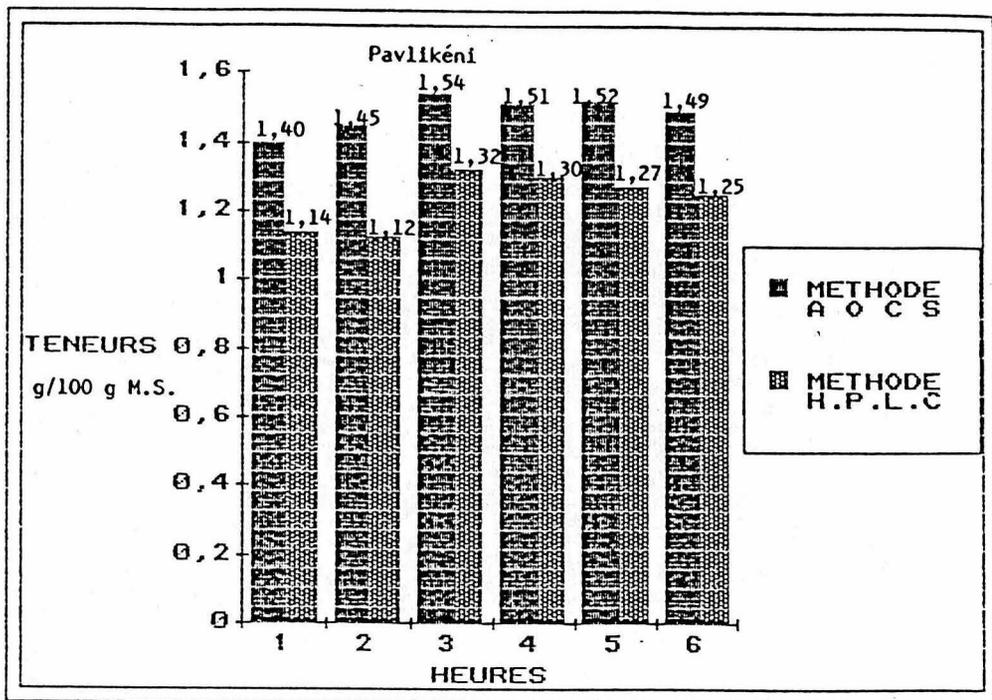


Fig. 43 a : Détermination du temps optimum d'hydrolyse par l'acide oxalique du gossypol combiné : cas de la variété Pavlikéni.

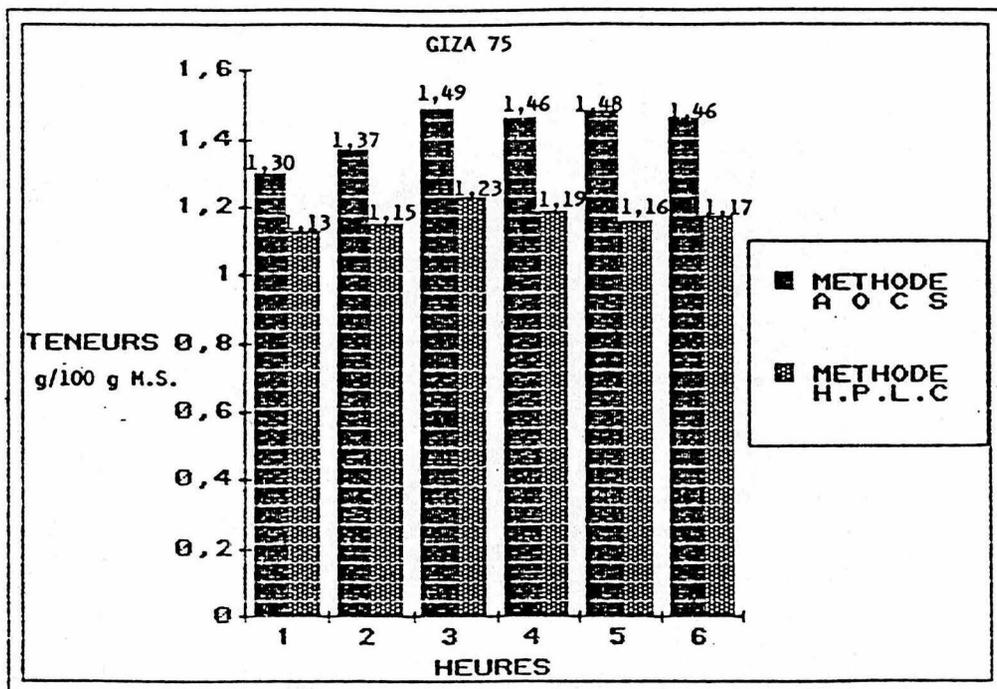


Fig. 43 b : Détermination du temps optimum d'hydrolyse par l'acide oxalique du gossypol combiné : cas de la variété GIZA 75.

CHAPITRE II : COMBINAISON DU GOSSYPOL AVEC D'AUTRES CONSTITUANTS
DES AMANDES OU DES FARINES.

I - Introduction

Au cours des traitements technologiques des amandes de cotonniers, l'élévation de l'humidité et de la température provoque des combinaisons irréversibles des résidus aminés libres, en particulier ceux de la lysine, avec le gossypol libre (BALIGA et LYMAN, 1957, KING et al., 1957, CONKERTON et FRAMPTON, 1959, LYMAN et al., 1959) et d'autres constituants (MARTINEZ et al., 1961, 1967).

Ces réactions entraînent une réduction de la toxicité du gossypol et une diminution de la valeur nutritionnelle des protéines (KUIKEN, 1952, BALIGA et LYMAN, 1957, SMITH et al., 1959, CARTER et LYMAN, 1969, 1970, CRAIG et BRODERICK, 1981).

Nous nous proposons dans ce chapitre d'étudier l'évolution des teneurs en lysine disponible et en sucres solubles lorsque le gossypol ou son complexe avec l'acide acétique réagit à froid ou à chaud avec les constituants des farines de coton avec ou sans gossypol, en comparaison avec la farine de soja.

Nous effectuerons la même étude après hydrolyse par l'acide acétique des différentes liaisons du gossypol ainsi combiné.

II - Evolution des teneurs en gossypol, lysine disponible
et sucres solubles totaux en fonction des traitements
subis par les farines.

Nous avons traité, à froid ou à chaud, selon le protocole qui a été défini plus haut (Fig 23 et 25), des amandes broyées de la variété à glandes Pavlikéni, deux farines témoins délipidées, une farine de coton sans gossypol et une farine de soja (Fig 24 et 26), avec le complexe de gossypol-acétique pur. Les résultats sont présentés dans le tableau 29.

Quels que soient le traitement et la farine considérés, une diminution de la teneur en lysine disponible se traduit par un taux de gossypol combiné important. Dans la farine de coton sans gossypol, la teneur en lysine disponible passe de 2,03 % pour la farine non traitée à 1,73 % pour 0,34 % de gossypol combiné à chaud et à 1,68 % pour 0,39 % de gossypol combiné à froid.

Tableau n° 29 : Evolution des teneurs en lysine disponible et en sucres solubles totaux au cours des combinaisons à chaud et à froid du gossypol libre ou du gossypol-acétique avec les autres constituants des amandes ou des farines.

MATIERES	TRAITEMENTS	Gossypol dosé par HPLC g pour 100 g M.S.			Lysine disponible g/100 g M.S.	Sucres solubles totaux g/100 g M.S.
		libre	total	combiné		
Amandes broyées à glandes (Pavlikéni)	à chaud	0,08	1,22	1,13	1,20	9,67
	à froid	0,20	1,10	0,90	1,23	10,77
Farine de coton sans gossypol délipidée	Pas de traitement 0	0	0	0	2,03	11,07
	à chaud en pré- sence du gossypol- acétique	0,05	0,39	0,34	1,73	9,90
	à froid en pré- sence du gossypol- acétique	0,19	0,58	0,39	1,68	9,17
Farine de soja délipidée	Pas de traitement 0	0	0	0	2,16	12,13
	à chaud en pré- sence du gossypol- acétique	0,07	0,33	0,26	1,93	12,09
	à froid en pré- sence de gossypol- acétique	0,09	0,44	0,35	1,90	11,93

Si l'on considère que 2,03 g de lysine disponible correspondent à 100 % de lysine disponible dans cette farine, on constate que pour les deux traitements la lysine disponible diminue respectivement de 14,78 et 17,25 %.

La farine de coton à glandes présente pratiquement la même teneur en lysine disponible pour les deux traitements et pour des quantités différentes de gossypol combiné. Ces résultats nous emmènent à penser que le gossypol pourrait se fixer à d'autres constituants des amandes tels que les phospholipides (POMINSKI et PACK, 1957, MARTINEZ et al., 1967, MARKMAN et RZHEKHIN, 1969). En effet, cette farine contient 9,90 % et 14,20 % de matière grasse résiduelle, respectivement pour les traitements à chaud et à froid. C'est dire de l'importance relative qu'il faut accorder à chaque constituant cellulaire des amandes et aux modes de traitements. Les mêmes comportements sont observés pour la farine de soja délipidée, dans laquelle on trouve 1,93 % et 1,90 % de lysine disponible pour 0,26 et 0,35 % de gossypol combiné respectivement pour les traitements à chaud et à froid. Les variations des différents résultats obtenus peuvent s'expliquer de plusieurs façons :

- pour un traitement à froid par exemple, la durée d'imbibition ou de contact du gossypol avec les constituants de la farine est plus longue, donc le gossypol aura le temps de se combiner en plus grande quantité.

- toutes les farines ne présentent pas la même granulométrie. Malgré le broyage au moulin, la farine de soja délipidée est moins fine que les autres.

- le gossypol apporté aux farines témoins (farine de coton sans gossypol et farine de soja) sous sa forme complexée avec l'acide acétique peut être moins réactif qu'à l'état naturel dans les amandes. En effet, les liaisons hydrogènes formées entre l'acide acétique et les groupements hydroxyls du gossypol au cours de la préparation de ce dernier peuvent diminuer l'intensité des réactions observées.

- les teneurs en sucres solubles totaux varient légèrement d'un traitement à l'autre, mais rien ne prouve qu'il y ait formation de complexes avec le gossypol, dans les conditions des manipulations.

- le gossypol ne serait pas le seul composé phénolique impliqué dans le blocage de la lysine. Il y aurait, entre autres, les acides phénoliques et les flavonoïdes. Les groupements aldéhydes de la molécule du gossypol sont autant oxydables que les groupements hydroxyls. Ces aldéhydes forment des bases de SCHIFF avec les groupements NH_2 des acides aminés (WITKOP et BEILER, 1954). Les groupements OH peuvent aussi s'oxyder

en présence d'oxygène (SCHEIFFELE et SHIRLEY, 1964) et former des quinonimines avec les acides aminés.

- d'autres constituants des amandes tels que les produits d'oxydation de lipides (MARTINEZ et al., 1961 et 1967, POKORNY et al., 1987, et 1988) et les phytates (de RHAM et JOST, 1979, CHOI et al., 1982) peuvent avoir une influence sur les teneurs en lysine disponible.

Toutes ces hypothèses rendent difficile l'interprétation des résultats qui traduisent l'intervention de ces différentes réactions possibles.

III - Evolution des teneurs en lysine disponible et en sucres solubles totaux après hydrolyse du gossypol combiné.

Une partie des farines obtenues après combinaison du gossypol libre ou du gossypol-acétique à chaud ou à froid a été hydrolysée par l'acide acétique en vue de libérer la lysine ainsi que le gossypol bloqué dans les différentes réactions avec les autres constituants des amandes ou des farines. Nous avons donc suivi l'évolution des teneurs en lysine disponible et en sucres solubles totaux avant et après hydrolyse du gossypol combiné.

La figure 44 montre un chromatogramme type des extraits des sucres solubles totaux. L'ensemble de nos résultats est présenté dans le tableau 30a, 30b et 30c.

Quelle que soit la matière considérée, on note une augmentation considérable des teneurs en lysine disponible après hydrolyse du gossypol combiné. L'hydrolyse provoque donc la libération du gossypol et de certains des constituants des farines (autres composés phénoliques, sucres solubles, lipides résiduels) qui se retrouvent en solution. Il se produit un démasquage des différentes fonctions ϵ -amines des résidus de lysine préalablement bloqués. Les farines précédemment brunes acquièrent des teintes plus claires et contiennent peu de sucres solubles (moins de 2,5 % de sucres solubles totaux quel que soit le traitement). Nous avons vérifié par chromatographie sur couche mince que la grande partie des oligosaccharides solubles se trouve en solution avec le gossypol complexé par l'amino-3-propanol-1.

Ces résultats nous permettent de confirmer l'hypothèse de BALIGA et LYMAN, (1957), CONKERTON et FRAMPTON, (1959), LYMAN et al., (1959), MARKMAN et RZHEKHIN, (1969), DAMATY et HUDSON, (1975 b), REDDY et NARASINGA RAO, (1988 c) selon laquelle le gossypol forme des bases de SCHIFF par

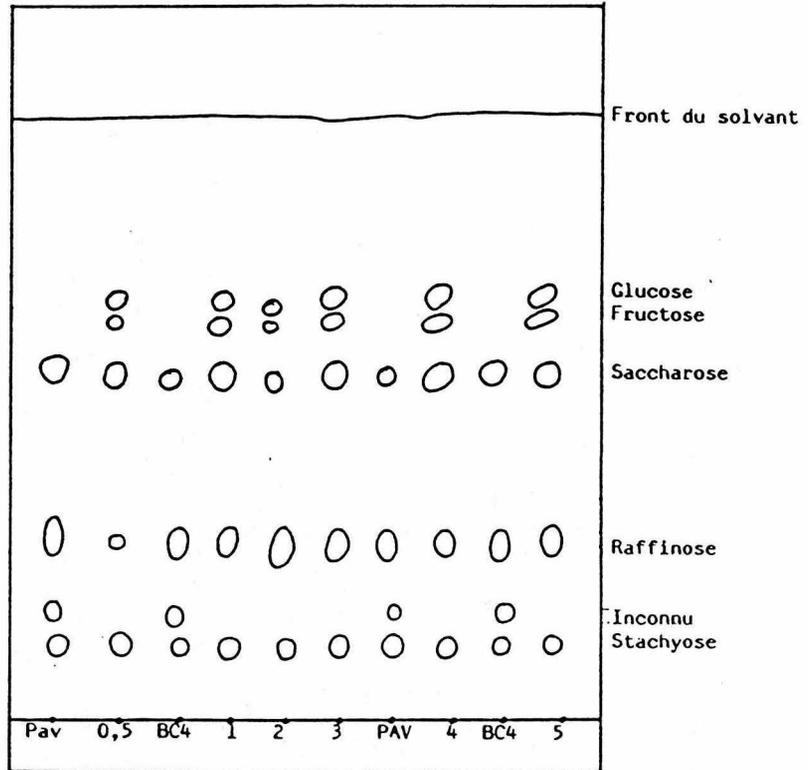


Fig. 44 : Chromatogramme des extraits de sucres d'amandes de cotonniers et d'un mélange de sucres témoins.

PAV = Variété à glandes Pavlikéni

BC4 = Variété sans glande

0,5 ; 1 ; 2 ; 3 ; 4 ; 5 = mélanges de sucres témoins à différentes concentrations (0,5 à 5 g/litre).

Tableau n° 30 a: Teneurs en lysine disponible et en sucres solubles totaux de farine de coton sans gossypol et de farine de soja délipidée (g/100 g M.S.)

Matières telles quelles	Lysine disponible	Sucres solubles totaux
Farine de coton sans gossypol délipidée	2,03	11,07
Farine de soja délipidée	2,16	12,13

Tableau n° 30 b: Evolution des teneurs en lysine disponible et en sucres solubles totaux après combinaison du gossypol à froid, puis hydrolyse du gossypol ainsi lié (g/100 g M.S.)

Constituants analysés Traitements Matières	Lysine disponible		Sucres solubles totaux	
	Après combinaison avec le gossypol à froid	Après hydrolyse	Après combinaison avec le gossypol à froid	Après hydrolyse
Amandes à glandes* broyées non délipidées	1,23	1,83	10,77	1,80
Farine de coton sans gossypol délipidée	1,68	2,61	9,17	1,87
Farine de soja délipidée	1,90	2,74	11,93	1,95

* Il a été impossible de déterminer la teneur en lysine disponible dans les amandes broyées, non traitées à froid ou à chaud, à cause de la présence d'un excès de lipides.

Tableau n° 30c: Evolution des teneurs en lysine disponible et en sucres solubles totaux après combinaison du gossypol à chaud, puis hydrolyse du gossypol ainsi lié (g/100 g M.S.)

Constituants analysés Traitements Matières	Lysine disponible		Sucres solubles totaux	
	Après combinaison avec le gossypol à chaud	Après hydrolyse	Après combinaison avec le gossypol à chaud	Après hydrolyse
Amandes à glandes broyées non délipidées	1,20	1,84	9,67	2,00
Farine de coton sans gossypol délipidée	1,73	2,67	9,90	1,70
Farine de soja délipidée	1,93	2,80	12,09	2,20

condensation des groupements aldéhydes (-CHO) du gossypol avec les terminaisons ϵ -amines des résidus de la lysine.

Cependant nos résultats sont incomplets pour justifier, d'une part les réactions de la lysine avec les autres constituants des amandes ou des farines et, d'autre part, du gossypol avec les autres acides aminés indispensables et très réactifs comme le tryptophane, la méthionine et la cystéine.

IV - Récapitulatif des différentes interactions des composés phénoliques avec les autres constituants des amandes ou des farines

La figure 45 récapitule l'ensemble des interactions qui ont lieu entre les composés phénoliques, en particulier le gossypol et les autres constituants des amandes ou des farines au cours des traitements technologiques.

A côté de la destruction de certaines vitamines, les protéines et les acides aminés sont les composants généralement les plus affectés par les substances phénoliques. Les phospholipides, les lipides et leurs produits d'oxydation et les oligosaccharides peuvent également réagir avec les protéines et les acides aminés. Le blocage des résidus de la lysine entraîne une perte importante de la valeur nutritive des farines (MARTINEZ et al., 1961, 1967, CARTER et LYMAN, 1970, ARZÚ et al., 1972, SMITH, 1970, CRAIG et BRODERICK, 1981). La figure 46 montre quelques réactions possibles du blocage des résidus lysyls par le gossypol au cours des traitements à froid ou à chaud des amandes et des farines.

Les groupements aldéhydes du gossypol et les fonctions ϵ -amines des résidus lysyls peuvent, dans un premier cas, donner des bases de SCHIFF stabilisées dans certaines conditions par les groupements - OH (WITKOP et BEILER, 1954). Ces derniers peuvent s'oxyder, fixer les ϵ -amines et il se forme alors des binaphtoquinonimines ou binaphtoquinonamines (Fig. 46, voie I).

La deuxième possibilité est la formation d'un binaphtoquinonimine alhéhyde pouvant soit fixer les résidus de lysyls, soit se polymériser, réagir avec les fonctions ϵ -amines et engendrer des polymères bruns de hauts poids moléculaires (Fig. 46, voie II).

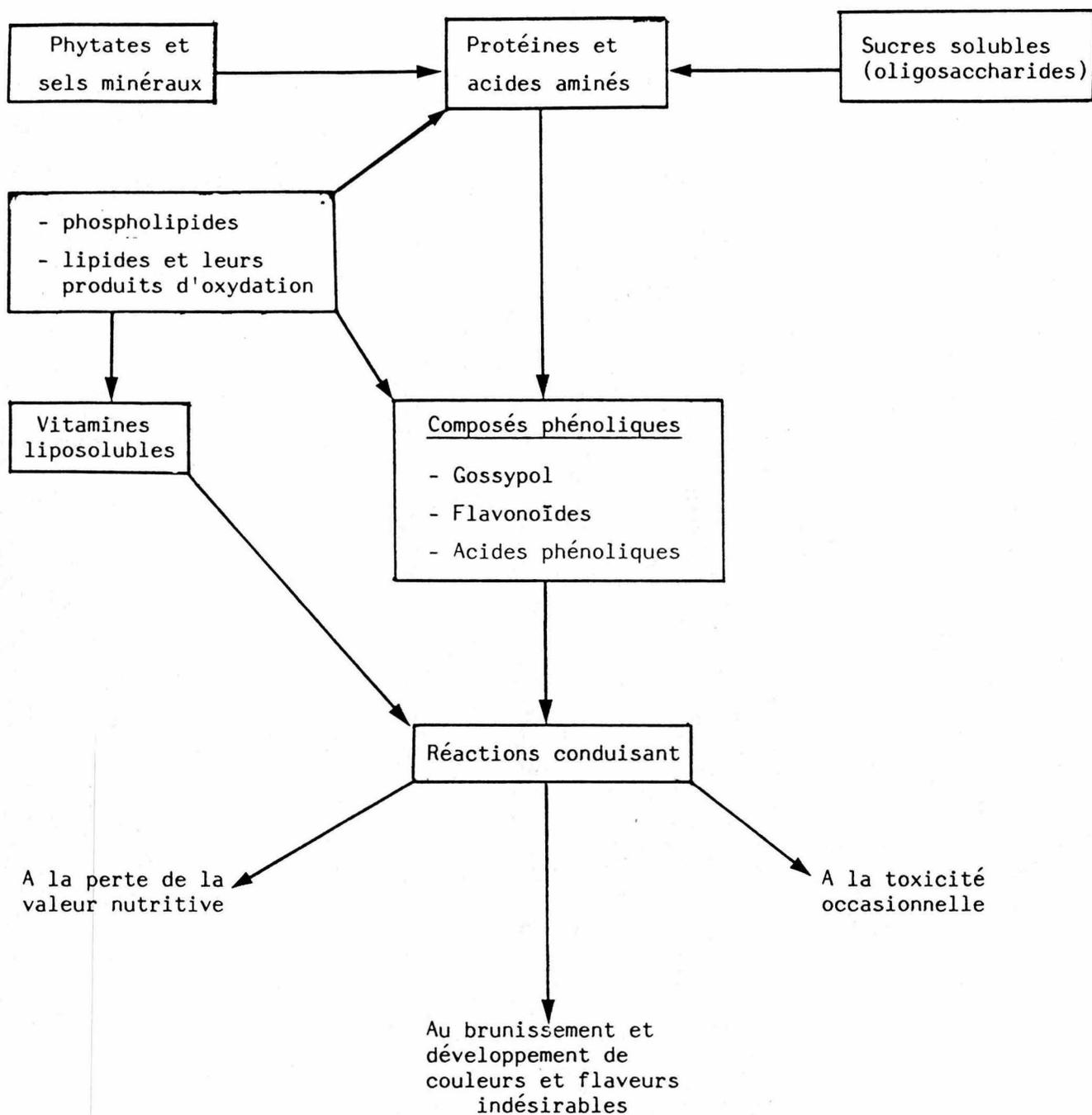


Fig. 45 : Schéma récapitulatif de quelques interactions possibles entre les constituants des amandes ou des farines.

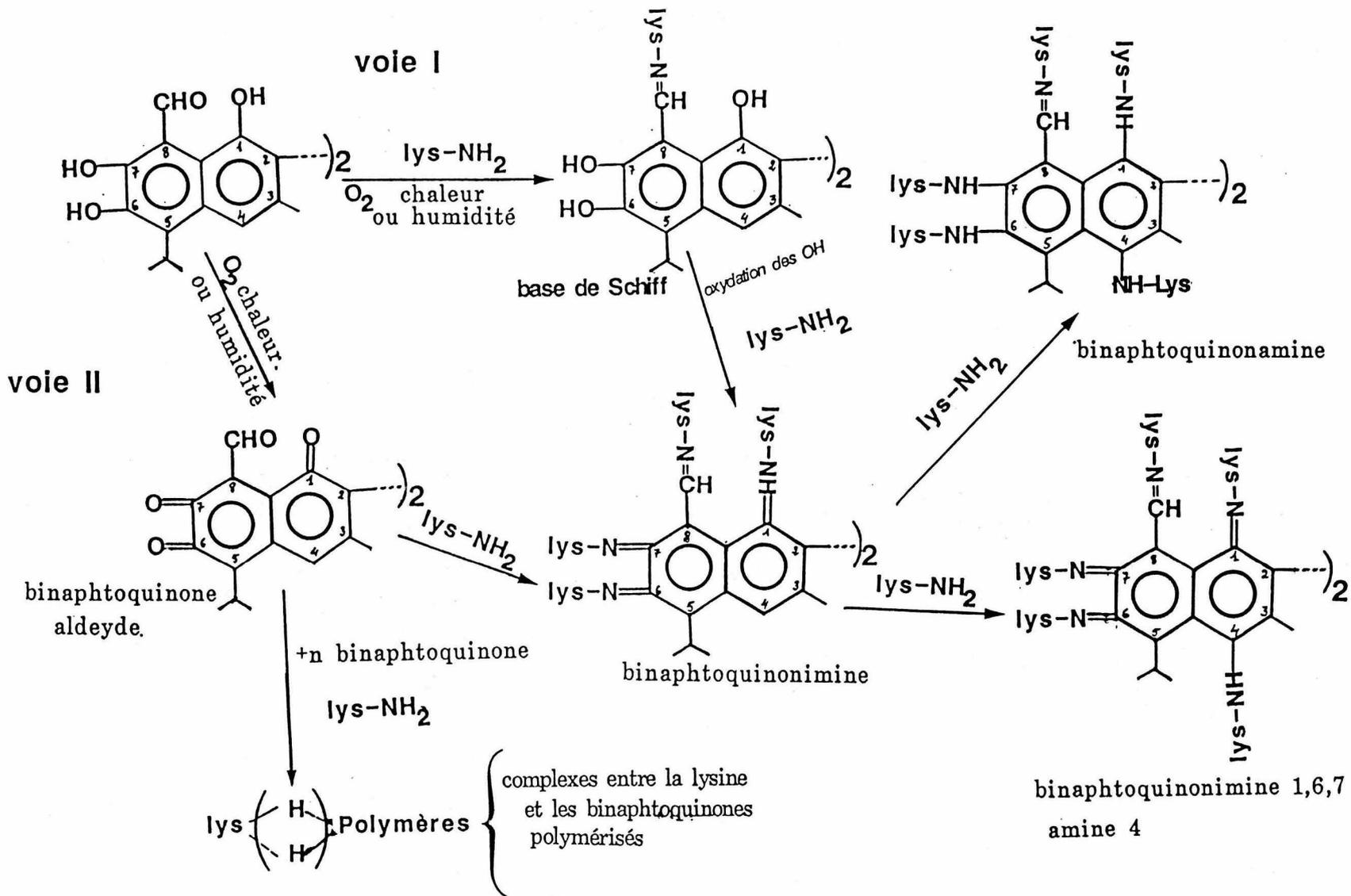


Fig 46 Quelques réactions possibles d'un résidu de lysyls avec le gossypol

La molécule du gossypol (Fig. 46) peut donc offrir plusieurs types de liaisons:

- aldéhydes-amines en positions 8 et 8'
- quinones-amines en positions 1, 1', 6, 6', 7, 7'
- covalentes en positions 4 et 4'.

En général, après le blocage de la lysine dans les bases de SCHIFF, l'étape principale, comme pour tous les autres composés phénoliques, serait la formation d'intermédiaires hydroxyquinoniques et aminoquinoniques (SYNGE, 1978). Ces intermédiaires réagiraient entre eux, au niveau des positions non substituées de leurs cycles, pour donner des polymères stables dont les unités seraient reliées entre elles, non seulement par des liaisons C-C, mais aussi par des ponts C-O-C et C-N-C (NICOLAUS, 1968). La présence des substituants azotés favorise la polymérisation par rapport aux ouvertures des cycles (ANDREUX et al., 1979).

V - Conclusion

Pendant les traitements technologiques, des phénomènes chimiques entre les composés phénoliques et les constituants des amandes influencent la qualité des protéines, réduisent la disponibilité de la lysine en diminuant parallèlement la toxicité du gossypol.

Dans la réalité, les réactions chimiques qui se produisent sont diverses et compliquées.

La température à laquelle nous avons soumis nos matières premières (75° C.) est souvent dépassée dans l'industrie, les amandes subissant des cuissons sous vapeur, à des très hautes températures et à des pressions très élevées. Des réactions de brunissement peuvent se produire même à froid.

Pour améliorer la couleur et la qualité nutritionnelle des farines produites lors de la trituration des amandes de cotonniers, il faudrait trouver un moyen technologique qui permette de réaliser simultanément la délipidation et l'élimination des glandes intactes contenant le gossypol et ses dérivés : c'est ce que nous tenterons de faire dans le chapitre suivant.

CHAPITRE III : DETOXIFICATION DES AMANDES

I - Introduction

La meilleure méthode de détoxification des amandes de cotonniers consiste à empêcher l'éclatement des glandes dont le contenu toxique, le gossypol, ainsi libéré, se fixerait sur la lysine disponible et colorerait ainsi la farine. Pour cela, nous avons utilisé des solvants capables non seulement de délipider les amandes, mais aussi d'extraire les glandes intactes.

Nous avons développé une technique gravimétrique permettant d'obtenir des farines et des huiles de bonne qualité alimentaire.

II - Classification des constituants des amandes dans les solvants utilisés pour la détoxification.

Le broyage à 12.000 trs/mn pendant 2 minutes, des amandes conditionnées, dans les solvants de détoxification (mélange hexane-fréon, dichlorométhane) permet aux glandes de se détacher des autres tissus des amandes et de monter en surface (Fig. 47). L'huile extraite au cours de ces opérations est dissoute dans les solvants. Les broyats sont donc constitués du miscella (solvants plus huile), de la farine, et des glandes à pigments. Une centrifugation à 6.000 trs/mn pendant deux minutes permet d'obtenir 3 phases :

- à la surface, les glandes,
- au milieu, l'huile dissoute dans le solvant utilisé,
- au fond, la farine.

Le rendement moyen en farine sèche détoxifiée est environ de 52% quel que soit le solvant utilisé. La figure 48 montre l'aspect des farines détoxifiées, comparé à celui des farines avec ou sans glande délipidées à l'hexane à chaud au soxhlet.

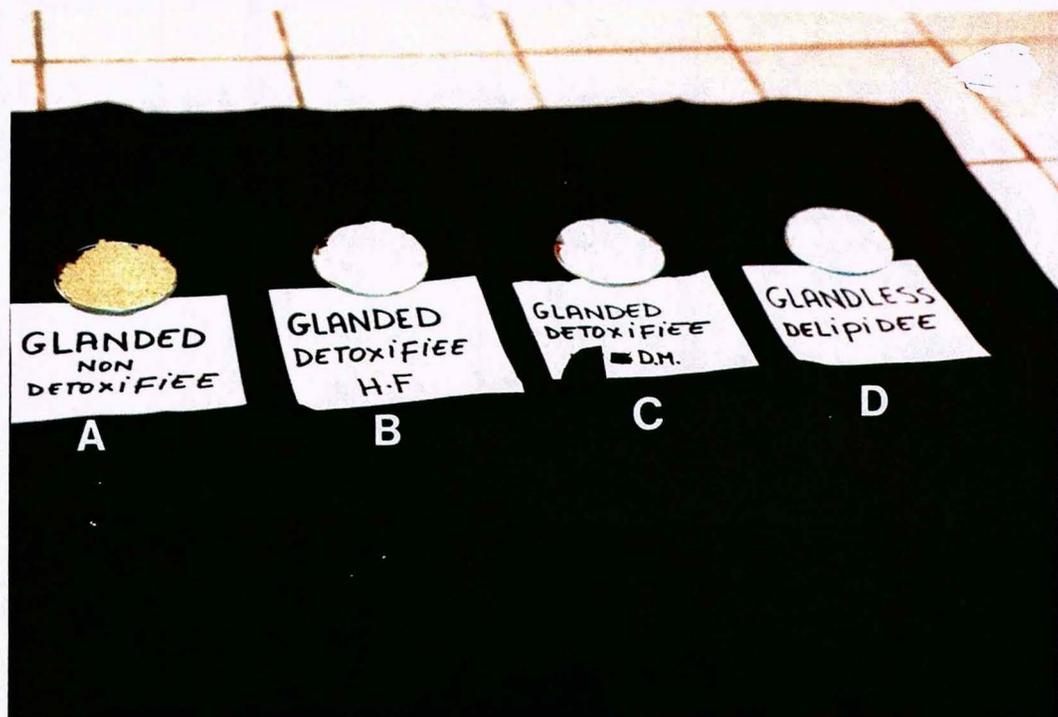
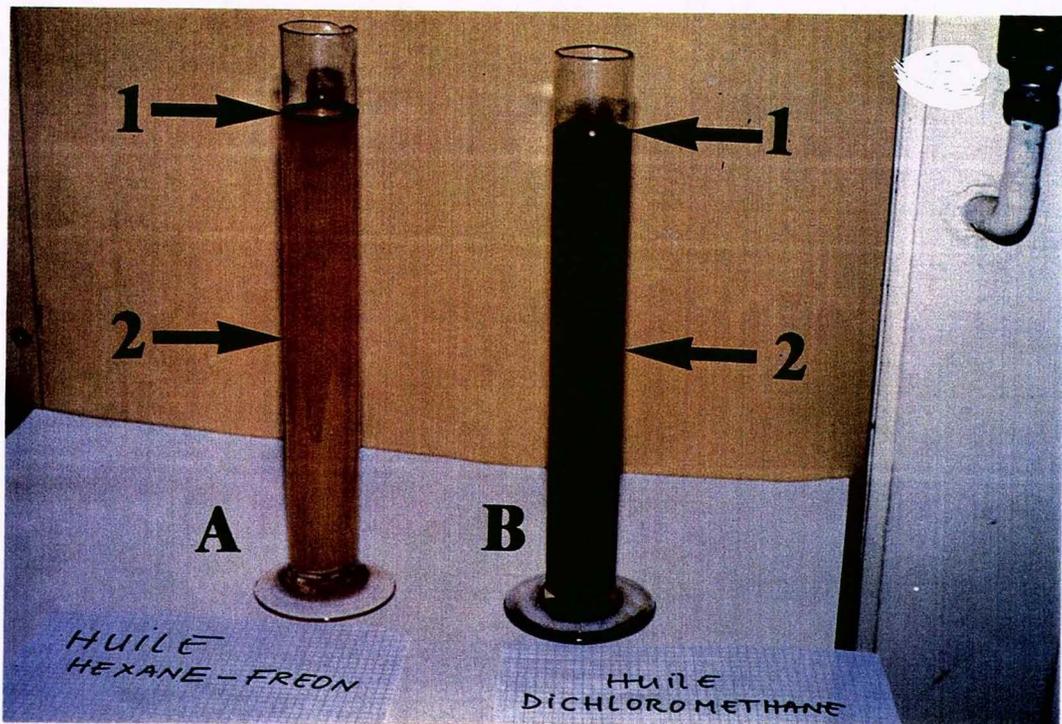


Fig. 47 : Classification glandes et huile au cours de la détoxification

- A - Extraction par le mélange hexane-fréon
- B - Extraction par le dichlorométhane
 - 1 - anneau noir constitué de glandes
 - 2 - miscella (huile + solvant)

Fig. 48 : Farines obtenues par différents traitements

- A - Délipidation à l'hexane d'amandes de cotonniers à glandes
- B - Détoxification par le mélange hexane-fréon, d'amandes de cotonniers à glandes
- C - Détoxification par le dichlorométhane, d'amandes de cotonniers à glandes
- D - Délipidation à l'hexane d'amandes de cotonniers sans glande .

III - Conditions de détoxification : évolution des teneurs en gossypol.

Pour déterminer les conditions optimales de détoxification, nous avons suivi l'évolution des teneurs en gossypols libre et total en fonction du nombre de lavages des farines par les solvants après broyage des amandes conditionnées. Cette étude ne concerne que les deux solvants utilisés pour le broyage, à savoir le mélange hexane-fréon et le dichlorométhane et non ceux employés pour parachever la détoxification (mélanges d'éthanol et de dichlorométhane). Les dosages sont effectués par les méthodes colorimétriques AOCS et par H.P.L.C.

1 - Utilisation du mélange hexane-fréon.

Les figures 49 et 50 montrent respectivement comment évoluent les teneurs en gossypol libre et en gossypol total, à partir des amandes broyées (traitement 1) et lavées jusqu'à 6 fois avec le mélange hexane-fréon.

Les taux de gossypol libre et de gossypol total diminuent progressivement en fonction du nombre de lavages : 5 lavages successifs au mélange hexane-fréon après 1 broyage de deux minutes dans ce même solvant suffisent pour réduire les teneurs en gossypol libre de 0,98 à 0,028 % (Fig. 49) et en gossypol total de 1,23 à 0,052 % (Fig. 50) et pour extraire l'huile en totalité.

2 - Utilisation du dichlorométhane.

Comme précédemment, l'évolution des teneurs en gossypol libre et en gossypol total, (respectivement figures 51 et 52) est déterminée

en fonction du nombre de lavages des amandes broyées (traitement -1). Cinq lavages au dichlorométhane sont nécessaires pour délipider complètement la farine et abaisser les taux de gossypol libre de 0,98 à 0,098 % (Fig. 51) et de gossypol total de 1,23 à 0,155 % (Fig. 52).

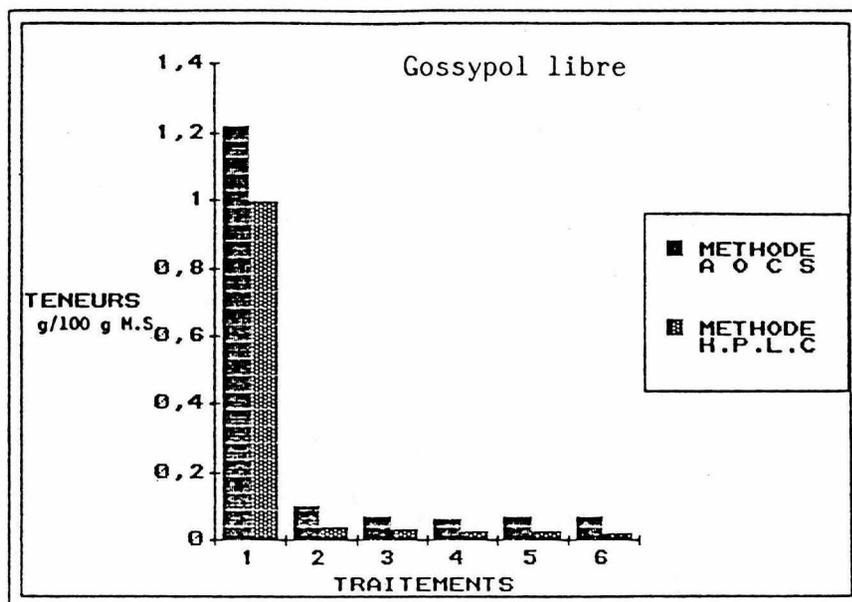


Fig. 49 : Evolution des teneurs en gossypol libre (g/100 g M.S.) déterminées par les méthodes A O C S et HPLC au cours de la détoxification par le mélange hexane-fréon.

Traitement 1 = amandes broyées n'ayant subi aucun lavage au solvant.

Traitements 2 à 6 = nombres de lavages successifs au mélange hexane-fréon après le broyage.

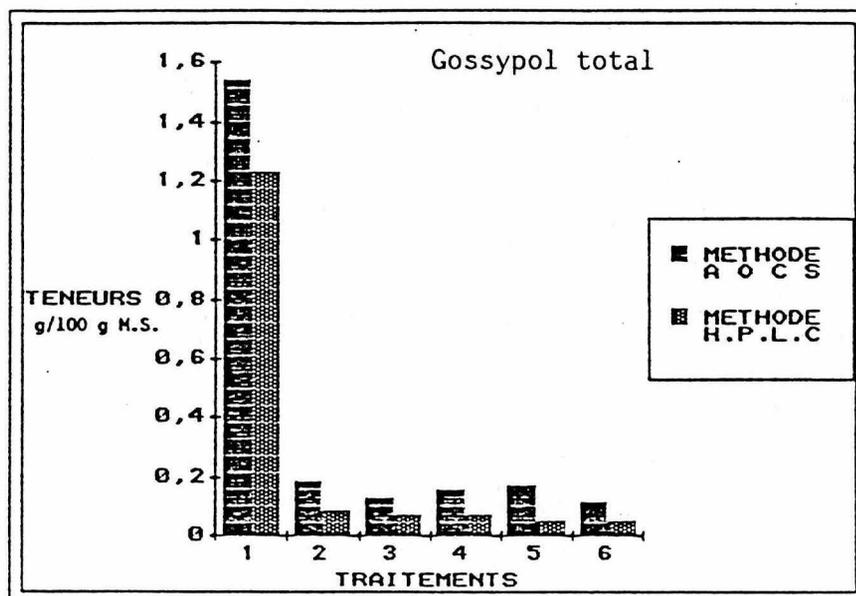
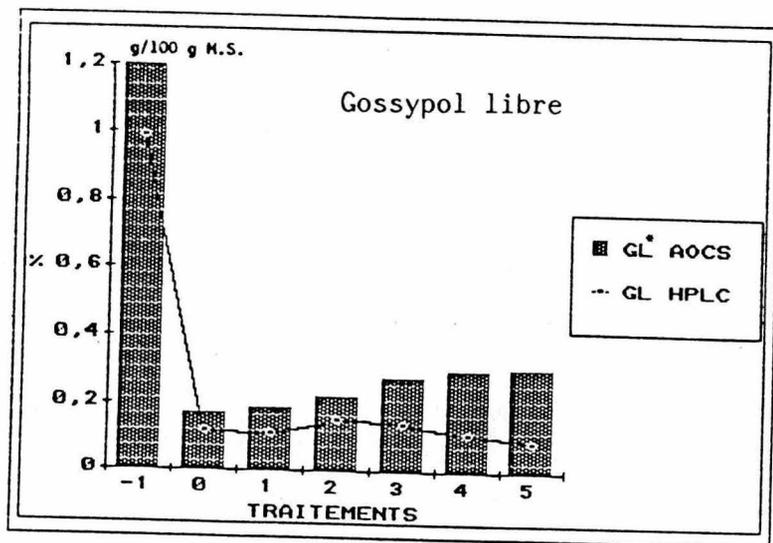


Fig. 50 : Evolution des teneurs en gossypol total (g/100 g M.S.) déterminées par les méthodes A O C S et HPLC au cours de la détoxification par le mélange hexane-fréon.

Traitement 1 = amandes broyées n'ayant subi aucun lavage au solvant.

Traitements 2 à 6 = nombres de lavages successifs au mélange hexane-fréon après le broyage.



* GL = Gossypol libre

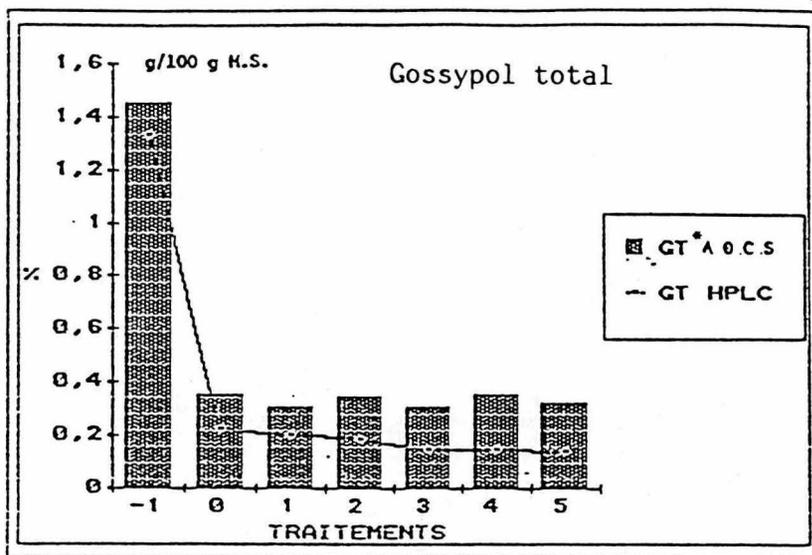
Fig. 51 : Evolution des teneurs en gossypol libre (g/100 g M.S.) déterminées par les méthodes A O C S et HPLC au cours de la détoxification par le dichlorométhane.

Traitement - 1 = amandes broyées au mortier

Traitement 0 = broyage dans le solvant

Traitements 1 à 5 = lavages successifs au solvant après le broyage.

Au-delà du deuxième lavage, on note une augmentation de la teneur en gossypol libre avec la méthode AOCS qui pourrait être due à la dissolution et interaction des autres constituants de la farine avec l'aniline.



* GT = Gossypol total

Fig. 52 : Evolution des teneurs en gossypol total (g/100 g M.S.) par HPLC et par la méthode colorimétrique A O C S au cours de la détoxification par le dichlorométhane

Traitement - 1 = amandes broyées au mortier

Traitement 0 = broyage dans le solvant

Traitements 1 à 5 = lavages successifs au solvant après le broyage

IV - Composés phénoliques, protéines
et acides aminés.

Tous les traitements subis par les amandes avec ou sans glandes sont récapitulés dans le tableau 31. Ils sont désignés par des lettres qui représentent également les farines obtenues. Nous les utiliserons régulièrement dans la suite de notre travail.

Tableau n° 31 : Récapitulatif des types de traitements subis par les amandes de cotonniers avec ou sans glande.

Types de cotonniers	TRAITEMENTS DES AMANDES		Lettres désignant les traitements ou farines obtenues
Amandes à glandes (PAVLIKENI)	Broyage dans le mélange hexane-fréon suivi par :	5 lavages au mélange hexane-fréon	a
		3 lavages à l'hexane-fréon + 2 lavages au dichlorométhane	b
	Broyage dans le dichlorométhane suivi par :	5 lavages au dichlorométhane	c
		2 lavages au dichlorométhane + 5 lavages au mélange dichlorométhane-EtOH 75/25 (vol/vol)	d
		2 lavages au dichlorométhane + 5 lavages au mélange dichlorométhane-EtOH 50/50 (vol/vol)	e
	Délipidation au soxhlet par l'hexane à chaud	-	f
Amandes sans glande (BC4)		-	g

1 - Les composés phénoliques

1-1 Comparaison des teneurs en composés phénoliques totaux déterminés par la méthode de Folin - Ciocalteu avec celles estimées par HPLC.

Nous avons estimé par H.P.L.C. les sommes des teneurs des composés phénoliques des différentes farines et nous avons comparé les résultats avec ceux obtenus par la méthode de Folin-Ciocalteu (tableau 32).

Tableau n° 32 : Teneurs en composés phénoliques totaux (mg/100 g M.S.) déterminées par la méthode colorimétrique comparées aux estimations par H.P.L.C.

Méthodes d'analyses Traitements ou farines	HPLC	Colorimétrie (Folin-Ciocalteu)
a*	337,72	1023,24
b	390,90	2789,61
c	794,29	2627,72
d	168,01	3008,34
e	104,70	1500,33
f	1570,64	7464,39
g	434,02	2329,50

* Les désignations des lettres sont présentées dans le tableau 31

La farine (f), délipidée à l'hexane, présente les plus forts pourcentages de composés phénoliques totaux. La farine (e) en renferme les plus faibles quantités. La farine (g) sans glande en possède un taux intermédiaire.

Comme on devait s'y attendre, la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu surévalue considérablement les teneurs en composés phénoliques totaux par rapport à l'H.P.L.C.. Elle est moins spécifique car elle ne traduit que la résultante des réactions diverses entre le réactif et les autres constituants des farines.

1-2. Evolution des sommes des teneurs en composés phénoliques, teneurs et pourcentages relatifs de chaque famille de composés phénoliques au cours de la détoxification.

Le tableau 33 présente les sommes des teneurs des composés phénoliques ainsi que les teneurs et les pourcentages relatifs de chaque famille de substances phénoliques, déterminés par dosages H.P.L.C.

La farine (f) à glandes, délipidée à l'hexane, renferme les taux les plus élevés de composés phénoliques. De toutes les farines détoxifiées (a à e), (c) en contient la plus grande quantité. L'adjonction d'éthanol dans le dichlorométhane permet, en fonction des proportions, de diminuer les taux de composés phénoliques (farines d et e). Les farines (a) et (b) détoxifiées au mélange hexane-fréon ont des teneurs inférieures à la farine (g) sans glande délipidée à l'hexane à chaud.

Les sommes des composés phénoliques diminuent au cours de la détoxification. Ainsi, les farines détoxifiées (a à e) possèdent moins de substances phénoliques que la farine (f) à glandes délipidée à l'hexane à chaud qui présente le résultat le plus élevé.

En ce qui concerne le gossypol libre, les farines (a) et (b), détoxifiées au mélange hexane-fréon, fournissent les plus faibles valeurs du fait de la moindre polarité de ce mélange de solvants qui exerce par conséquent peu d'action sur les parois des glandes à gossypol et permet leur élimination presque complète. En revanche le dichlorométhane, qui est légèrement polaire, provoque l'éclatement d'une petite partie des glandes, d'où des taux supérieurs de gossypol dans les farines (c), (d), (e). L'utilisation des mélanges de dichlorométhane et d'éthanol réduit les taux de gossypol libre.

Tableau n° 33 : Teneurs en composés phénoliques, teneurs et pourcentages relatifs de chaque famille de composés phénoliques dans les différentes farines.

Analyses effectuées Traitements ou farines	Sommes des teneurs des composés phénoliques (HPLC) (mg/100 g M.S.)	Acides phénoliques		Flavonoïdes		Gossypol libre	
		Teneurs mg/100g M.S.	%*	Teneurs mg/100g M.S.	%*	Teneurs mg/100g M.S.	%*
a**	337,72	103,54	30,65	205,98	61,00	28,20	8,35
b	390,90	152,94	39,13	215,96	55,25	11,00	5,62
c	794,29	313,26	39,43	383,03	48,23	98,00	12,34
d	168,01	55,97	33,32	44,04	26,21	68,00	40,47
e	104,70	13,82	13,20	39,88	38,09	51,00	48,71
f	1570,64	149,64	9,52	202,00	12,87	1219,00	77,61
g	434,02	201,92	46,52	232,10	53,48	0,00	0,00

* Pourcentages relatifs par rapport aux sommes des composés phénoliques.

** Les désignations des lettres indiquant les traitements ou les farines sont portées dans le tableau 31

On passe par exemple de 98 mg % de gossypol libre dans la farine traitée uniquement au dichlorométhane (c) à 68 mg et 51 mg % pour respectivement 25 et 50 % d'éthanol dans le dichlorométhane (farines d et e).

La farine (c) traitée au dichlorométhane contient le plus d'acides phénoliques, la plus faible valeur étant observée pour la farine (e). Les farines (a) et (b) ont à peu près les mêmes teneurs en flavonoïdes. La plus forte quantité étant observée pour la farine (c) détoxifiée uniquement au dichlorométhane. Le mélange de ce solvant avec l'éthanol diminue encore les taux de flavanoïdes (farines d et e).

En conclusion, par rapport à la farine à glandes délipidée (f), la détoxification conduit à une amélioration de la qualité des farines par une baisse importante du taux de gossypol et, dans certaines conditions, des acides phénoliques et des flavonoïdes et par là même des teneurs en composés phénoliques. Ces résultats ne sont obtenus que par l'extraction des glandes à pigments intacts avec ou sans une détoxification complémentaire à l'aide de solvants polaires appropriés (mélanges de dichlorométhane et d'éthanol).

2 - Gossypol et protéines

2-1 Teneurs en gossypol et en protéines

Les teneurs en gossypol, en protéines totales et en protéines solubles des farines provenant des différents traitements (voir plus haut tableau 31), ainsi que les normes autorisées par la PAG* (1970) sont rassemblées dans le tableau 34.

Les farines (a) et (b) contiennent des taux de gossypol libre et de gossypol total (déterminés par H.P.L.C.) inférieurs aux normes maximales admises par le PAG (1970) et qui sont respectivement de 0,045 et 1,200 %

Les traitements (c), (d) et (e) donnent des farines contenant plus de gossypol libre et moins de gossypol total (déterminés par H.P.L.C.) que les normes PAG (1970).

Le tableau 34 présente également les teneurs en protéines totales et en protéines solubles des différentes farines. Ces valeurs sont supérieures aux minima autorisés par la PAG (1970).

* PAG : Protein Advisory Group of the U.S.A.

Tableau n° 34 : Evolution des teneurs en gossypol, protéines totales et protéines solubles en fonction des modes de traitements des amandes de cotonniers.

Traitements des amandes	Gossypol libre g/100 g M.S.		Gossypol total g/100 g M.S.		Protéines totales N x 6,25 g/100 g M.S.	Protéines solubles N x 6,25 g/100 g M.S.	Protéines solubles Protéines totales (%)
	HPLC	AOCS	HPLC	Pons et al., (1958)			
a	0,028	0,071	0,052	0,121	62,66	60,28	96,20
b	0,011	0,060	0,032	0,145	60,90	56,47	92,72
c	0,098	0,310	0,137	0,335	58,40	51,86	88,80
d	0,068	0,120	0,133	0,240	64,54	53,98	83,63
e	0,051	0,090	0,121	0,220	63,53	52,47	82,60
f	1,219	1,660	1,550	1,870	56,60	48,78	86,20
g	0	-	0	-	66,93	65,36	97,65
Normes PAG (1970)	0,045		1,200		50,00	32,50	65,00

Les désignations des lettres relatives aux traitements sont données dans le tableau 31

La délipidation par l'hexane des amandes sans glande (g) donne une farine contenant plus de protéines totales (66,93 %) que celle à glandes (f) qui n'en renferme que 56,60 %. En revanche, la détoxification augmente le taux de protéines totales (traitements a à e). On atteint même plus de 64 % de protéines totales pour le traitement (d).

Les pourcentages en protéines solubles, quel que soit le traitement, dépassent la norme minimale de 65 % préconisée par la PAG. La farine (a) contient plus de 96 % de protéines solubles. La farine (g) sans glande délipidée par l'hexane possède un taux de protéines solubles plus élevée (97,65 %) que (f) à glandes (86,20 %). Une baisse de solubilité est observée pour les farines (c) à (e) traitées au dichlorométhane, par rapport à (a) et (b) obtenues après broyage dans le mélange hexane-fréon. La diminution de la solubilité serait due :

- à la formation de liaisons irréversibles covalentes entre les o-quinones et les résidus d'acides aminés (GUILLEUX, 1975),

- à des condensations in-situ entre les o-quinones, dérivés des o-diphénols et des résidus d'acides aminés (lysine, méthionine, et cystéine) (fig. 53) (BRUNET, 1967, PIERPOINT, 1969 a et b, VITHAYATHIL et MURTHY, 1972),

- à la formation de très fortes liaisons hydrogène entre les peptides et les composés phénoliques (LOOMIS et BATAILLE, 1966, GHEYASUDDIN et al., 1970, WOLF, 1972). L'ensemble de ces réactions modifie aussi la couleur des farines par des brunissements.

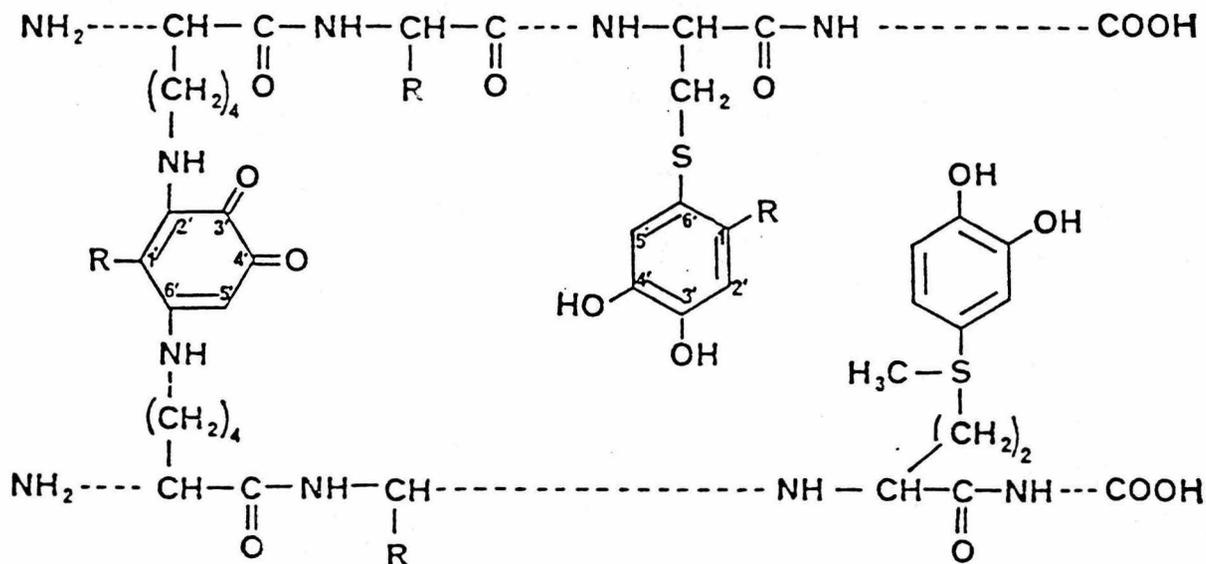


Fig. 53 : Condensations in-situ entre o-quinones dérivés des o-diphénols et résidus d'acides aminés. (lysine, méthionine, cystéine) d'après Brunet (1967).

2-2 Evaluation chimique de la valeur nutritionnelle des protéines des farines détoxifiées

Afin d'évaluer la qualité nutritive des protéines contenues dans les farines détoxifiées (a à e) et les farines (f) à glandes et (g) sans glande délipidées à l'hexane, nous avons déterminé leur composition en acides aminés. La figure 54 présente un chromatogramme type et les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau 35.

Les sommes des acides aminés varient selon les traitements. La farine sans glande (g) est plus riche en acides aminés que la farine (f) à glandes et que les farines détoxifiées (a à e). Les farines (a) et (b) traitées au mélange hexane-fréon donnent des sommes d'acides aminés plus élevées que celles des farines (c, d, e) obtenues après broyage dans le dichlorométhane. Ce dernier, mélangé à l'alcool, extrait une petite fraction de protéines, ce qui explique les variations des teneurs en différents acides aminés observées dans les farines (c), (d) et (e).

Les compositions en acides aminés indispensables exprimés en g/16 g d'azote ont été comparées à celle du modèle protéique introduit par la FAO en 1973 (tableau 36). L'indice chimique de chaque acide aminé est défini en pourcentage par rapport au même acide aminé indispensable contenu dans la protéine de référence de la FAO (1973). Quelle que soit la farine considérée, la lysine et les acides aminés soufrés sont les plus limitants et dans une moindre mesure l'isoleucine, la thréonine et la leucine (ANDERSON et WARNICK, 1966).

Les rapports (exprimés en %) des sommes des acides aminés indispensables sur celles des acides aminés totaux (AAI/AAT) sont présentés dans la figure 55. Quel que soit le traitement subi par les amandes, les sommes des acides aminés indispensables (AAI) se situent autour de 20 % des sommes des acides aminés totaux (AAT). Les rapports AAI/AAT sont légèrement supérieurs à 40 % quelle que soit la farine considérée, ce qui peut traduire l'efficacité nutritionnelle des protéines. Ces rapports se rapprochent de celui de l'ensemble des protéines corporelles de l'homme qui est de 45 % (CHEFTEL et al., 1985), mais restent aussi supérieurs à 33,33 % qui est celui d'une protéine alimentaire équilibrée (BLANKENSHIP et ALFORD, 1983).

On peut donc en conclure qu'il existe un équilibre chimique satisfaisant entre les acides aminés des farines de coton. Ces résultats sont confirmés par les essais biologiques réalisés par BESANÇON et al., (1985).

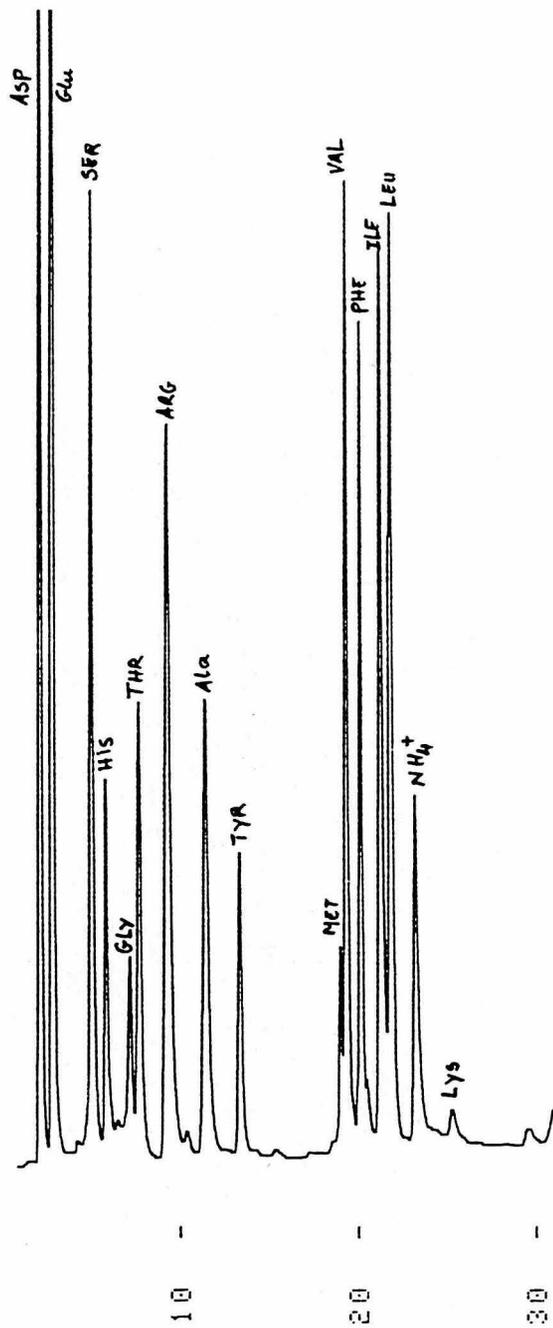


Fig. 54 : Chromatogramme type d'acides aminés d'hydrolysats d'une farine de coton.

Tableau n° 35 : Composition en acides aminés des différentes farines traitées (g/100 g M.S.)

Farines	Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Cys	Val	Met	Ileu	Leu	Tyr	Phe	His	Lys*	Arg	Try**	ΣAA***
a****	4,98	1,85	2,58	11,00	ND	2,28	2,24	1,10	2,41	0,85	1,66	3,27	1,65	3,13	1,95	1,93	7,62	0,56	51,06
b	5,02	1,81	2,55	11,08	"	2,24	2,23	1,16	2,44	0,86	1,66	3,26	1,67	3,19	1,94	2,00	7,65	0,58	51,34
c	4,75	1,78	2,43	10,39	"	2,22	2,14	1,10	2,29	0,85	1,63	3,12	1,59	3,01	1,81	1,98	7,21	0,61	48,91
d	4,89	1,82	2,49	10,87	"	2,17	2,22	1,08	2,43	0,85	1,70	3,16	1,66	3,01	1,84	1,89	7,15	0,61	49,84
e	4,71	1,80	2,38	10,46	"	2,14	2,18	1,09	2,40	0,84	1,60	3,01	1,62	2,80	1,72	1,83	6,84	0,61	48,03
f	4,69	1,76	2,41	10,21	"	2,22	2,15	1,20	2,22	0,85	1,59	3,11	1,58	3,03	1,83	2,11	6,99	0,52	48,47
g	5,53	1,99	2,80	11,96	"	2,46	2,41	1,25	2,63	0,99	1,77	3,51	1,84	3,51	2,10	2,26	8,46	0,63	56,10

* Lysine totale

** Le tryptophane est déterminé par colorimétrie

*** Sommes des acides aminés

**** Les significations des lettres (a) à (g) désignant les farines sont présentées dans le tableau 31

Tableau n° 36 : Composition en acides aminés indispensables (g/16 gN) et indices chimiques des différentes farines.

Farines	Lys disponible		Thr		Val		Met + Cys		Ile		Leu		Tyr + Phe		Trp	
	g/16 gN	I.C*	g/16 gN	I.C.	g/16 g N	I.C	g/16 gN	I.C	g/16 gN	I.C.	g/16 gN	I.C	g/16 gN	I.C	g/16 g N	I.C.
a **	3,78	68,72	3,62	90,50	4,72	134,85	3,82	76,40	3,25	81,25	6,40	91,42	9,36	156,00	1,10	110,00
b	3,89	70,72	3,52	88,00	4,75	135,71	3,93	78,60	3,23	80,75	6,35	90,71	9,46	157,66	1,13	113,00
c	4,04	73,45	3,64	91,00	4,68	133,71	3,98	79,60	3,33	83,25	6,38	91,14	9,40	156,66	1,24	124,00
d	3,79	68,90	3,65	91,25	4,87	139,14	3,87	77,40	3,41	85,25	6,34	90,57	9,37	156,16	1,22	122,00
e	3,81	69,27	3,74	93,50	5,00	142,85	4,01	80,20	3,33	83,25	6,26	89,42	9,20	153,33	1,27	127,00
f	4,35	79,10	3,63	90,75	4,58	130,85	4,23	84,60	3,28	82,00	6,41	91,57	9,51	158,50	1,07	107,00
g	4,03	73,27	3,54	88,50	4,68	133,71	4,00	80,00	3,15	78,75	6,25	89,28	9,53	158,83	1,12	112,00
Modèle protéique de la FAO (1973)	5,50	100,00	4,00	100,00	3,50	100,00	5,00	100,00	4,00	100,00	7,00	100,00	6,00	100,00	1,00	100,00

* I.C = Indice chimique : Rapport g de chaque acide aminé sur les g du même acide dans le modèle FAO x 100

** Les significations des lettres (a) à (g) désignant les farines sont présentées dans le tableau 31

*** AAI = Acides Aminés Indispensables

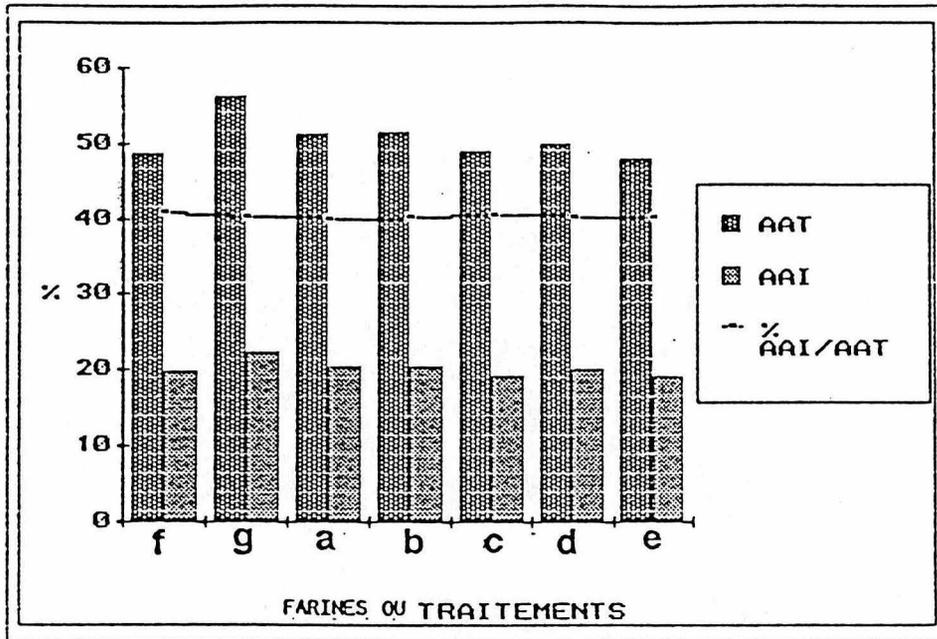


Fig. 55 : Pourcentages des acides aminés totaux (AAT), des acides aminés indispensables (AAI) et rapports AAI/AAT en fonction des traitements des amandes. Les traitements relatifs aux lettres (a) à (g) sont explicités dans le tableau 31.

3 - Détoxification, lysine disponible et tryptophane

3-1 Influence de la détoxification sur les teneurs en lysine.

Les teneurs en lysine disponible, lysine totale ainsi que leurs rapports, pour les différentes farines sont rassemblées dans le tableau 37.

La farine (g) sans glande délipidée à l'hexane présente plus de lysine disponible que les farines (a) à (e) détoxifiées. Le plus faible pourcentage (76,30 %) étant obtenu pour la farine à glandes (f) délipidée à l'hexane ; ce qui serait dû à des liaisons entre la lysine, le gossypol et les autres composés phénoliques comme nous l'avons montré plus haut (chapitre II). En revanche, les farines détoxifiées (a à e) ont des rapports de lysine disponible sur lysine total supérieurs à 90 %. Par conséquent, les processus de détoxification améliorent les pourcentages en lysine disponible et n'affectent pas la qualité des protéines.

Tableau 37 : Teneurs en lysine disponible, lysine totale et rapports lysine disponible sur lysine totale dans les différentes farines. (en g/% MS)

Traitements ou Farines	Lysine totale*	Lysine disponible**	$\frac{\text{Lysine disponible} \times 100}{\text{Lysine totale}}$
a ***	1,93	1,82	94,30
b	2,00	1,80	90,00
c	1,98	1,83	92,42
d	1,89	1,72	91,00
e	1,83	1,68	91,80
f	2,11	1,61	76,30
g	2,26	2,22	98,23

* La lysine totale est déterminée par H.P.L.C. sur des hydrolysats de protéines

** La lysine disponible est déterminée par colorimétrie

*** Les farines (a) à (g) sont définies dans le tableau n° 31.

3-2 Influence de la détoxification sur les teneurs en tryptophane

Le tryptophane est un acide aminé indispensable, mais très instable. La réactivité de son noyau indolique le rend très facilement oxydable. Nous avons vérifié l'influence des traitements de détoxification sur sa teneur dans les farines (fig. 56). Toutes les farines en contiennent des taux du même ordre. Néanmoins, lorsque l'on compare tous les résultats à celui de la farine (f) à glandes délipidée à l'hexane qui avec 0,52 % renferme le moins de tryptophane, on constate que la farine (g) sans glande en possède la teneur maximale. En outre, la détoxification a comme effet une augmentation des quantités de tryptophane des farines (farines a à e).

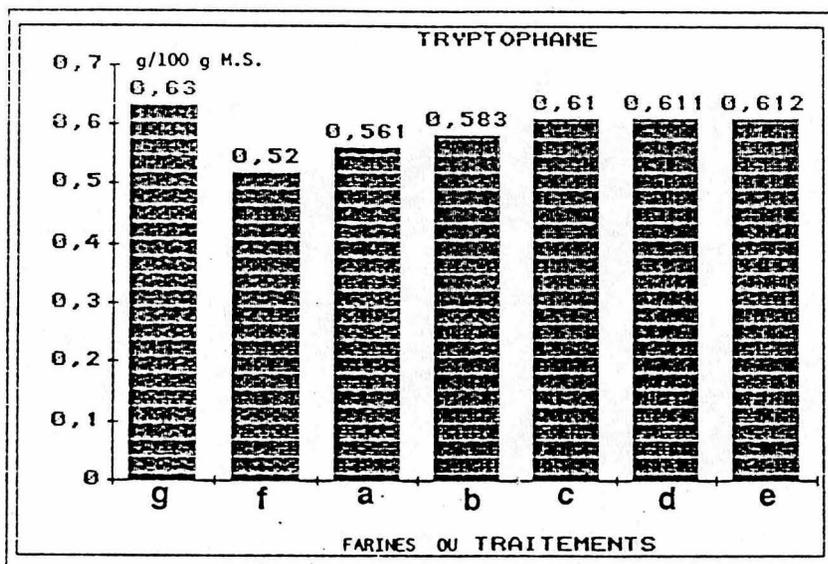


Fig. 56 : Teneurs en tryptophane (g/100 g M.S.) dans les différentes farines. Les désignations des lettres (a) à (g) sont dans le tableau n° 31.

V - Les sucres solubles totaux

Les teneurs en oligosaccharides totaux (saccharose, raffinose et stachyose) sont présentées dans la figure 57. Les farines (f) et (g), respectivement avec et sans glande, délipidées à l'hexane, en contiennent autant, mais plus que les farines détoxifiées (a à e). Les teneurs en sucres solubles totaux, donc les facteurs de flatulence, diminuent au cours de la détoxification.

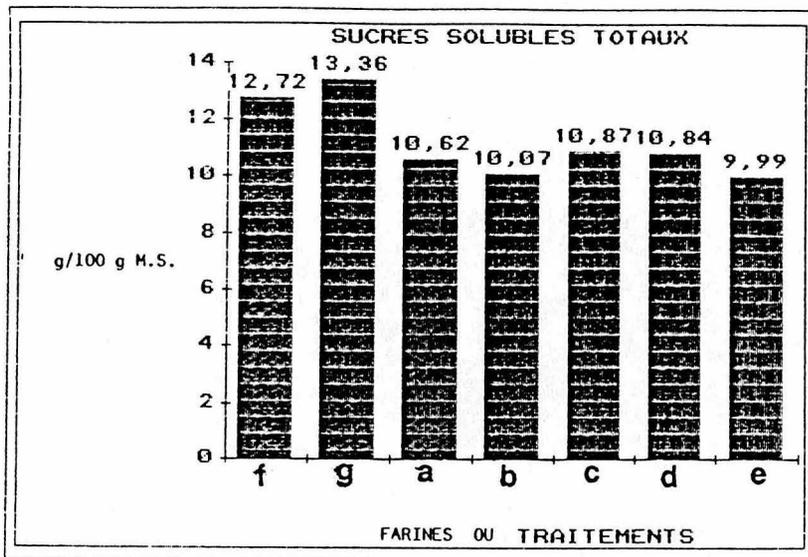


Fig. 57 : Teneurs en sucres solubles totaux (g/100 g M.S.) dans les farines. Les désignations des lettres (a) à (g) sont dans le tableau n° 31.

VI - Huile

1 - Teneurs en huile résiduelle des farines détoxifiées

Pour mieux apprécier la qualité des farines détoxifiées, nous avons déterminé les teneurs en huiles résiduelles. Les résultats, (fig. 58), sont comparés à la teneur maximale de 6 %, autorisée par la PAG (1970) dans les farines de coton destinées à l'alimentation humaine. Toutes les farines détoxifiées contiennent moins de 1,5 % d'huile résiduelle, ce qui montre que tous les solvants que nous avons utilisés à froid permettent de délipider convenablement les amandes. Nos observations sont en accord avec celles de KAUFMANN et VOM ORDE, (1955), GUILLAUMIN, (1974), TEMPLE, (1976), sur le fréon et de VALLE-RIESTRA, (1974), CASTOR-NORMANDIN et al., (1984), JOHNSON et al., (1986) sur le dichlorométhane, qui montrent que ces solvants extraient à froid les lipides des oléagineux (soja, arachide, coton) au même titre que l'hexane à chaud.

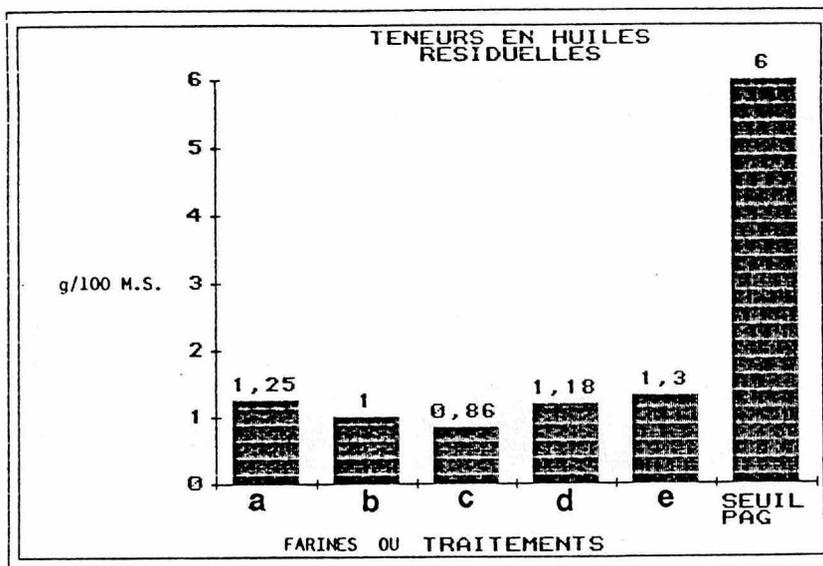


Fig. 58 : Comparaison avec le seuil PAG des teneurs en huiles résiduelles (g/100 g M.S.) dans les farines détoxifiées. Les désignations des lettres (a) à (g) sont rassemblées dans le tableau n° 31.

2 - Pourcentages des glycérides des huiles extraites au cours de la détoxification.

Pour montrer que les solvants utilisés pour la détoxification n'affectent pas la qualité des huiles, et pour justifier leur qualité alimentaire (donc leur récupération), nous avons déterminé leurs pourcentages en glycérides. Les figures 59 et 60 présentent respectivement la chromatoplaque et le photodensitogramme d'une huile de coton. Les résultats des analyses (tableau 38) montrent que toutes les huiles obtenues après la détoxification (a à e) ainsi que celles extraites par l'hexane à chaud (f et g) ont au minimum 89 % de triglycérides. Ces résultats prouvent que les solvants utilisés n'affectent pas les triglycérides qui constituent l'essentiel de l'huile de coton (TOUMA-TOUCHAN, 1977, OUEDRAOGO et BEZARD, 1982).

Nos procédés de détoxification peuvent donc permettre de récupérer les farines ainsi que les huiles.

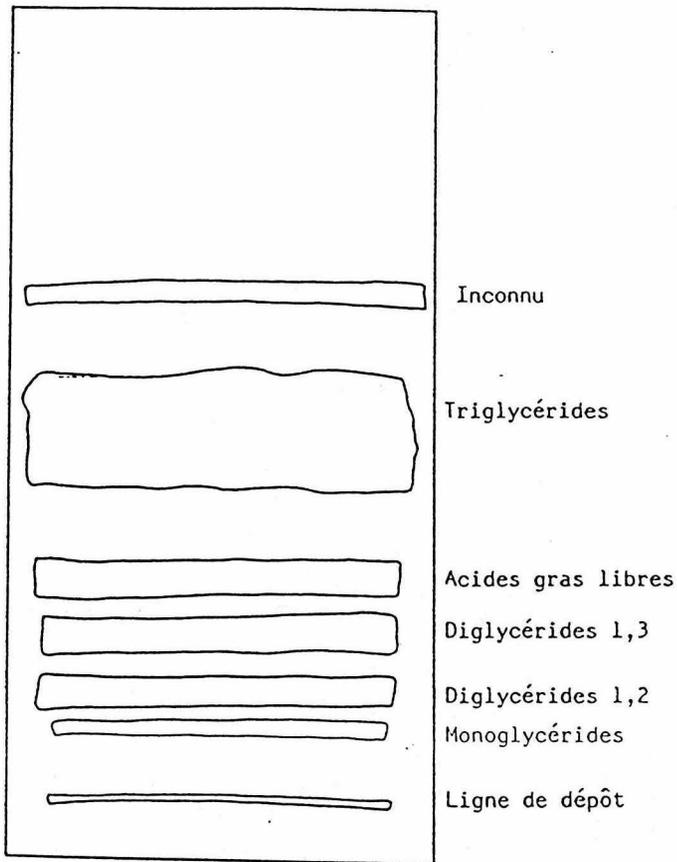


Fig. 59 : CCM préparative des lipides totaux d'une huile brute de coton.
Solvant de migration : hexane distillé/diéthyléther/acide acétique
glacial 75/25/1 (vol/vol/vol)

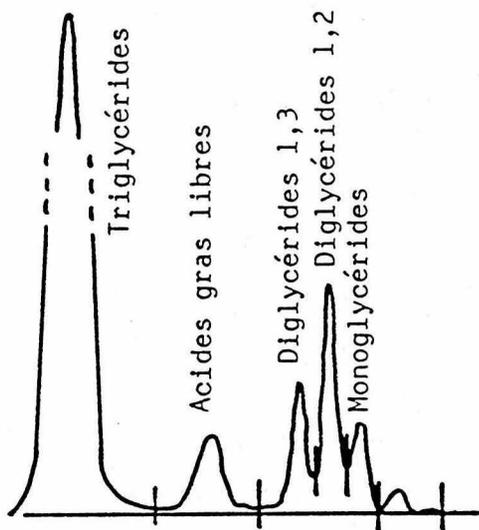


Fig. 60 : Photodensitogramme d'une huile brute
d'amandes de coton.

Tableau n° 38 : Comparaisons des pourcentages relatifs des glycérides des huiles obtenues par divers traitements.

Huiles ou traitements	Triglycérides	Diglycérides	Monoglycérides	Acides gras libres
a *	89,22	4,90	1,96	3,92
b	-	-	-	-
c	90,11	5,10	1,70	3,09
d	89,90	4,85	1,85	3,40
e	90,10	5,05	1,85	3,00
f	89,04	5,30	2,12	3,50
g	89,06	6,25	1,56	3,13

* Les désignations des lettres représentant les traitements ou les huiles sont dans le tableau 31

VII - Couleurs des farines

1 - Interprétation des résultats

Les paramètres trichromatiques des couleurs des différentes farines sont rassemblés dans le tableau 39. Les farines de coton détoxifiées (a à e) ou non (h) donnent des brillances (L) plus faibles que celle du blé témoin (i), ce qui montre qu'elles sont plus colorées. L est proportionnelle à la quantité d'énergie réfléchie par la surface de l'échantillon. Plus elle est forte, plus claire est la farine. Avec L = 59,90 %, la farine (h) lavée à l'acétone aqueuse à 70 % est la plus colorée. Cet exemple montre que l'utilisation des solvants très polaires pour extraire le gossypol et les autres pigments conduit à intensifier le brunissement de la farine (KIM et al., 1971, KADAN et al., 1978, WAN et al., 1979). En effet, en présence des protéines à groupements NH₂ libres, des produits d'addition très réactifs peuvent être formés, participant à la polymérisation et contribuant à accroître la couleur brune (ANDREUX et al., 1979).

Tableau n° 39 : Paramètres trichromatiques des couleurs des différentes farines.

Valeurs tristimuliques Farines ou traitements	Brillances (L) en %	a	b	Hue tg-1 (a) (b)	ΔE	Saturation (C)	
						C	Teintes dominantes de la couleur*
a**	88,40	- 1,00	11,50	- 5,00	4,10	11,50	Gris
b	89,30	- 2,50	11,30	- 12,50	3,90	11,57	
c	89,00	- 1,15	12,25	- 5,36	4,57	12,30	
d	87,23	- 1,23	14,45	- 4,86	7,28	14,50	Gris-clair
e	86,75	- 0,85	15,65	- 3,10	8,56	15,67	
f	81,30	- 1,50	19,30	- 4,40	14,60	19,35	Jaune-gris
g	87,10	- 0,60	6,40	- 5,30	3,60	6,52	Gris-foncé
h Farine à glandes délipidée et lavée 7 x 15 mn par l'acétone à 70 %	59,90	- 3,10	9,00	19,00	30,80	9,51	
i Farine de blé (témoin)	90,40	-0,90	7,90	- 6,50	0,00	7,95	Gris

* Les teintes dominantes sont déterminées en se reportant dans l'espace couleur de la C.I.E. (Commission Internationale de l'Eclairage) (fig. 28)

** Les désignations des lettres (a à e) sont portées dans le tableau n° 31

La farine à glandes (f), délipidée à l'hexane à chaud est plus colorée que les farines détoxifiées, (a) à (e), qui ont une brillance du même ordre que (g) sans glande délipidée.

L'interprétation des valeurs de la saturation (c) dans l'espace euclidien de couleur (fig. 28) montre que la teinte grise domine dans toutes les couleurs à l'exception de celle de (f) à glandes, délipidée à l'hexane, qui est jaune-gris. Ces résultats sont confirmés par les valeurs des teintes Hue, la farine (h) traitée à l'acétone à 70 % étant la plus colorée avec Hue = 19,00.

Plus la différence de couleur ΔE est grande, plus la farine est foncée. On peut ainsi classer les farines en 3 groupes :

- le premier groupe est représenté par des farines peu colorées (a, b, c,) qui ont un ΔE compris entre 3,9 et 4,57 et dans lequel on peut classer la farine sans glande (g) délipidée à l'hexane.

- la deuxième catégorie est constituée par des farines moyennement colorées ayant été détoxifiées par des mélanges de dichlorométhane et d'éthanol (farine d et e) et qui ont un ΔE compris entre 7,28 et 8,56.

- enfin, les farines (f) à glandes délipidée par l'hexane et (h) lavée par l'acétone à 70 % qui ont respectivement pour ΔE 14,60 et 30,80, très colorées, constituent la troisième classe.

2 - Influence de la présence des composés phénoliques sur la couleur des farines

On peut se demander si la couleur des farines dépend non seulement de la proportion de chaque famille de composés phénoliques, mais aussi de leur état d'oxydation ou de polymérisation. Pour essayer de comprendre cela, nous avons dressé le tableau 40 qui présente les pourcentages relatifs de chaque famille de composés comparés aux brillances (L).

On constate que la brillance la plus faible va de pair avec les teneurs en acides phénoliques et en flavonoïdes les plus faibles et le taux de gossypol libre le plus élevé, pour la farine (f) à glandes, délipidée à l'hexane. Par contre, des variations très faibles de brillance correspondent à des pourcentages très divers de composés phénoliques. On peut penser que l'aptitude à colorer et le seuil de coloration de chaque composé phénolique modifient considérablement les paramètres trichromatiques.

Tableau n° 40 : Influence des composés phénoliques sur la brillance des farines

Farines ou traitements	Brillance (L) (%)	Composés phénoliques (% relatifs)		
		Acides phénoliques	Flavonoïdes	Gossypol libre
a *	88,40	30,65	61,00	8,35
b	88,30	39,13	55,25	5,62
c	89,90	39,43	48,23	12,34
d	87,20	33,32	26,21	40,47
e	86,70	13,20	39,09	48,71
f	81,30	9,52	12,87	77,61
g	87,10	46,52	53,48	0,00

* Les désignations des lettres relatives aux traitements ou aux farines sont portées dans le tableau 31

Ces derniers doivent dépendre de l'état et du degré d'oxydation des composés phénoliques (de POIX et ROUET-MAYER, 1979) puisque le broyage des amandes en vue de leur détoxification a lieu en présence de l'oxygène de l'air. C'est pour cela que l'on note (voir plus haut, tableau 39) une grande différence de brillance entre les farines détoxifiées (a) à (e) et la farine (h) brune, provenant d'un traitement par l'acétone aqueuse.

Nous avons déterminé plus haut (chapitre I) que les flavonoïdes et le gossypol étaient les pigments majeurs, respectivement des amandes sans et avec glandes. Après détoxification par extraction des glandes intactes, donc du gossypol, les flavonoïdes deviennent les plus abondants (tableau 40). Simultanément, la couleur des farines détoxifiées est améliorée (augmentation de la brillance) par rapport à celle de la farine (f) à glandes délipidée par l'hexane.

Puisqu' après la détoxification, on se retrouve dans la même situation que dans les farines sans glande à gossypol, c'est-à-dire avec une grande richesse en flavonoïdes, et étant donné qu'il est difficile dans ces conditions de faire la part de chaque famille de composés phénoliques, quant à sa participation à la coloration, nous pensons qu'en l'absence du gossypol, c'est surtout les flavonoïdes (jaunes) qui déterminent la couleur. L'état d'oxydation et le degré de polymérisation devraient également intervenir.

La couleur des farines dépend non seulement des sommes des teneurs en composés phénoliques, mais aussi du pourcentage relatif de chaque famille de substances phénoliques.

Ainsi, les sommes des composés phénoliques et les brillances (L) d'une part et, d'autre part les pourcentages relatifs en gossypol libre et les brillances (L) (tableau 41), sont positivement corrélés avec respectivement les équations linéaires Y (sommes des teneurs des composés phénoliques) = $213,58 L - 18457,98$ et Y (% relatifs de gossypol libre) = $-12,89 L + 1153,00$ et les coefficients de régression respectifs $r = 0,97$ et $r = 0,80$.

Le gossypol, les acides phénoliques et les flavonoïdes sont donc les pigments responsables de la coloration des farines de coton. Tous ces pigments peuvent s'oxyder, se polymériser et même se fixer aux chaînes peptidiques soit par des liaisons de faibles énergies (liaisons hydrogènes et de Van der Waals), soit par des liaisons covalentes fortes (CHOI et al. 1982; REDDY et NARASINGA RAO; 1988 c) et modifier la couleur des farines. L'utilisation de la méthode de mesure de couleur permet donc de déterminer le degré de ces différentes réactions et d'étudier ainsi le brunissement des farines.

Tableau n° 41 : Influence des composés phénoliques sur les brillances (L) des farines de coton détoxifiées ou délipidées

Farines ou traitements	Sommes des teneurs en composés phénoliques (HPLC) (mg/100g M.S.)	% relatifs en gossypol libre	Brillance L en %	Somme des teneurs des composés phénoliques et brillances (L)	% relatifs en gossypol libre et brillances
a*	337,72	8,35	88,40	<u>Droite de régression :</u> y (somme des teneurs des composés phénoliques) $= 213,58 L - 18457,98$ <u>Coefficient de corrélation</u> $r = 0,97$	<u>Droite de régression :</u> y (% relatif en gossypol libre) = $-12,89 L + 1153,00$ <u>Coefficient de corrélation</u> $r = 0,80$
b	390,90	5,62	88,30		
c	794,29	12,34	89,90		
d	168,01	40,47	87,20		
e	104,70	48,71	86,70		
f	1570,60**	77,61**	81,30**		

* Les désignations des lettres relatives aux traitements ou aux farines sont portées dans le tableau n° 31.

** Valeurs aberrantes

CONCLUSION GENERALE
ET PERSPECTIVES

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES .

De ce travail, il ressort que les dérivés hydroxycinnamiques (dérivés d'acides féruliques et couramiques), les flavonoïdes (dérivés de kaempférol et de quercétine), le gossypol et autres composés apparentés sont les principaux pigments des amandes des cotonniers. Mais, dans l'avenir, nous devons compléter nos travaux sur les identifications afin d'attribuer un nom précis à chacun des composés phénoliques.

Dans les amandes à glandes, le gossypol libre représente plus de 88 % des composés phénoliques dosés par H.P.L.C. alors que dans les amandes sans glande, les flavonoïdes sont les pigments majeurs avec plus de 58 % de la somme des teneurs des composés phénoliques.

Les méthodes de dosages colorimétriques des composés phénoliques totaux, du gossypol libre et du gossypol total surévaluent toujours les résultats par rapport aux estimations par l'H.P.L.C., montrant ainsi l'interférence due aux autres constituants des amandes.

Les essais de combinaison du gossypol avec les autres constituants des amandes ou des farines, en l'occurrence les résidus libres de lysine, montrent que ces phénomènes sont complexes et traduisent la résultante de diverses réactions. Le brunissement des farines, dû à l'oxydation des composés phénoliques, survient lors des traitements à froid ou à chaud, la chaleur accélérant ce phénomène. Lors des traitements à froid ou à chaud des farines de coton avec ou sans gossypol et de la farine soja, la baisse du taux de lysine disponible traduit une combinaison importante avec le gossypol.

L'hydrolyse des liaisons formées entre le gossypol et les autres constituants des farines (en particulier les résidus de lysine) démasque les différentes fonctions **E**-amines de la lysine préalablement bloquées, ceci quels que soient les traitements, à froid ou à chaud.

Pour mieux étudier les réactions entre le gossypol et les résidus de lysine des amandes ou des farines, il est nécessaire d'accorder une importance particulière aux sucres solubles, aux phospholipides et aux phytates, qui peuvent réagir aussi avec les protéines. En même temps, il faudra tenir compte des autres aminés indispensables très réactifs tels que la méthionine, le tryptophane, la cystéine pouvant aussi former des complexes avec le gossypol.

Les techniques de détoxification mises au point pour les amandes de cotonniers à glandes sont très simples et facilement réalisables dans les pays en voie de développement qui sont, pour la plupart, producteurs de coton. Leurs transpositions industrielles ne nécessitent que des matériels peu onéreux (1 broyeur, 1 centrifugeuse, 1 percolateur et 1 désolvant) qui existent déjà dans les usines de trituration des graines. Nous proposons le schéma d'ensemble représenté par la figure 61 qui montre qu'on peut, à des fins utilitaires, récupérer tous les dérivés des amandes.

Le gossypol, utilisé récemment comme contraceptif masculin, peut être aussi employé pour la fabrication des insecticides, des antimalariques et autres produits pharmaceutiques (HRON et al., 1987), ou alors servir comme antioxydant dans les industries du caoutchouc et du pétrole (MATTEL, 1931).

Les farines produites peuvent être incorporées telles quelles dans des pains, biscuits, sauces, beignets, etc... ou servir à la fabrication d'isolats. Leur mélange avec les farines de soja, blé, lupin, fève, sorgho ou manioc etc... permettrait de réduire le taux de gossypol libre résiduel à l'état de traces tout en enrichissant leur teneur en protéines.

La farine sans glande délipidée par l'hexane est celle qui possède le plus d'acides aminés, de tryptophane et de lysine disponible.

Les différentes farines produites au cours de la détoxification présentent un équilibre satisfaisant en acides aminés. La disponibilité nutritionnelle de ces derniers devra être vérifiée par des expérimentations biologiques menées sur des animaux (rats en croissance) et ultérieurement sur des hommes car on ne peut pas toujours s'attendre à ce que l'aptitude de ces farines à faire face aux besoins de croissance et d'entretien permette de prévoir exactement leur valeur biologique in-vivo.

Bien que certains acides aminés (lysine, acides aminés soufrés) soient plus limitants, ces farines ne seront jamais consommées seules. On devra prendre soin d'établir des régimes dans lesquels la ration de base n'a pas les mêmes acides aminés limitants. Ainsi, la valeur nutritionnelle des farines détoxifiées sera meilleure en raison d'une complémentarité d'apport d'acides aminés indispensables.

Lorsqu'on compare les farines détoxifiées à celle à glandes délipidée par l'hexane à chaud, on peut remarquer les différences suivantes:

1) - La détoxification améliore les pourcentages de lysine disponible et de tryptophane. En revanche, les teneurs en oligosaccharides solubles totaux, donc les facteurs de flatulence, diminuent.

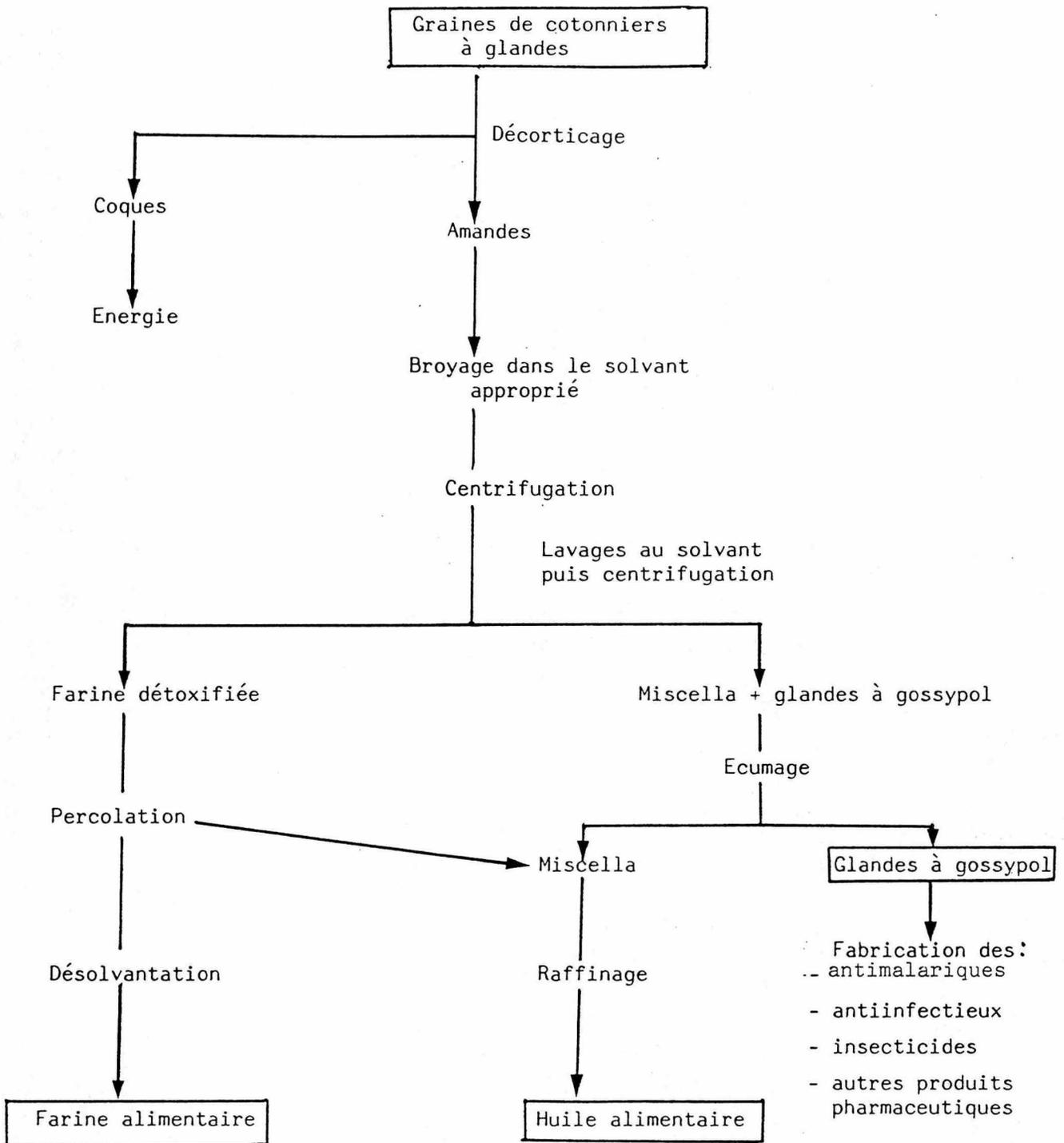


Fig. 61 : Schéma proposé pour le traitement industriel des amandes de cotonniers classiques

2) - La détoxification conduit à une amélioration de la qualité des farines avec une réduction considérable des teneurs en gossypol, donc des sommes des teneurs des composés phénoliques. Les flavonoïdes deviennent les pigments majeurs comme c'est le cas dans les amandes de cotonniers sans glande. Le mélange hexane-fréon est meilleur pour extraire les glandes intactes que le dichlorométhane qui est un peu polaire. L'utilisation du dichlorométhane en mélange avec l'éthanol pour parachever la détoxification contribue à diminuer les teneurs en composés phénoliques. On pourra envisager l'étude des flavonoïdes et des acides phénoliques en vue d'évaluer leur influence sur la valeur nutritive des farines de coton. Il sera également ambitieux de déterminer le rôle pharmacologique des flavonoïdes, car certains comme les dérivés de quercétine, présents en grandes quantités dans les farines de coton, sont doués de propriétés thérapeutiques.

3) - Les couleurs des farines détoxifiées, presque équivalentes à celle de la farine sans glande délipidée par l'hexane, sont nettement améliorées par rapport à la farine à glandes délipidée à l'hexane et on peut ainsi prévoir leur bonne acceptabilité sur le plan alimentaire. Cette amélioration de la couleur est due à la faible action du mélange hexane-fréon (non polaire) et du dichlorométhane (légèrement polaire) sur la structure des glandes à pigments au moment de la détoxification. La couleur des farines dépend non seulement de la proportion de chaque famille de composés phénoliques, mais aussi de leur état d'oxydation ou de polymérisation. Ainsi, les solvants polaires comme l'acétone aqueuse ne permettent pas la détoxification des farines à glandes, donc n'améliorent pas leurs couleurs à cause des brunissements dus à l'oxydation des composés phénoliques, en particulier le gossypol, en présence d'oxygène. Les sommes de teneurs des composés phénoliques et les brillances d'une part, et d'autre part les pourcentages en gossypol libre et les brillances des farines sont positivement corrélés. Ces corrélations peuvent être des indices justifiant la force des solvants à extraire les substances colorantes.

Les solvants utilisés pour la détoxification extraient à froid, les lipides des amandes de cotonniers au même titre que l'hexane à chaud. Les triglycérides de ces huiles ne sont pas affectés.

Le cotonnier ne devrait pas figurer dans la liste des plantes sous-exploitées.

On estime que plus d'un milliard de personnes, presque le quart des habitants de la planète comblent leurs besoins en protéines, en

calories, en vitamines et en sels minéraux grâce aux plantes qui sont parfois cultivées ou simplement récoltées à l'état sauvage. La mise en valeur des sous-produits de la récolte cotonnière devrait être une nouvelle ressource de protéines de coût moins élevé pouvant pallier les difficultés de malnutrition protéique.

Ce qui compte pour les pays en voie de développement, c'est plus l'encouragement des cultures locales comme le cotonnier que de subventionner de coûteuses importations qui le plus souvent concernent des aliments difficiles à introduire dans les moeurs alimentaires traditionnelles. L'expérimentation et la production d'une farine de coton commercialisable nécessitent une approche intégrée dans un système d'éducation, la participation d'agronomes, de nutritionnistes, de médecins et d'instituteurs.

B I B L I O G R A P H I E

ABOU-DONIA, M.B., 1976.

Physiological effects and metabolism of gossypol.

Residue Rev. 61 : 126-152.

ABOU-DONIA, S.A., LASKER, J.M., ABOU-DONIA, M.B., 1981.

High performance liquid chromatographic analysis of gossypol

J. Chromatogr. 206 : 606-610.

ABOU-DONIA, S.A., SALAM, A.E., EL-SAYED, K.M., 1983.

Enrichment of processed cheese with cottonseed flour.

Indian J. Dairy Sci. 36 (1) : 119-120.

ADAMASU, A. et CHANDRAVANSI, B.S., 1984.

Spectrophotometric determination of total gossypol in cottonseed and cottonseed meals.

Anal. Chem. 56 : 30-32

ADAMS, R., KIRKPATRICK, E.C., 1938.

Structure of gossypol : XI. Absorption spectra of gossypol, its derivatives and of certain dinaphtalene compounds.

J. Am. Chem. Soc. 60 (2) : 2180-2184.

ADAMS R., MORRIS R.C., GEISSMAN T.A, BUTTERBAUGH D.J.
and KIRKPATRICK, E.C., 1938.

Structure of gossypol. XV : An interpretation of its reactions

J. Amer. Chem. Soc., 60 (2), 2193-2204.

Afrique Agriculture n° 155 juillet-août 1988 (Mensuel d'information
Agricoles) pages 9 à 16.

ALTSCHUL, A.M., YATSU, L.Y., ORY, R.L., ENGLEMAN E.M., 1966.

Seed proteins

Ann. Rev. Plant. Physiol. 17 : 113-136.

ANDERSON, O.J., WARNICK, E.R., 1966.

Sequence in which amino acid become limiting for growth chicks fed ration containing cottonseed meal.

Poultry Sci. 45 : 84-89.

ANDREUX, F, GOLEBIEWSKA, D., METCHE, M., 1979.

Polymérisation oxydative des o-diphénols en présence ou non d'amino-acides : cas des systèmes (catéchol-glycocolle) et (catéchol-diglycyglycine).

colloque J.I.E.P. 1979.

Bulletin de liaison groupe polyphénols (volume 9) pages 178-188.

A O C S. 1958.

Official and Tentative Methods of the American Oil Chemists' Society.

Chicago, Illinois ed. by E.M. SALLEE

The Procter and Gamble Cie. Cincinnati, Ohio.

ARZÚ, A., MAYORGA, H., GONZÁLEZ, J., ROLZ, C., 1972.

Enzymatic hydrolysis of cottonseed protein.

J. Agric. Food Chem. 20 (4) 805-809.

ASHWORTH, U.S., 1966.

Determination of protein in dairy products by dye-binding

J. Dairy Sci. 49 : 133-137.

AYLWARD, F., COLEMAN, G., HAISMAN, D.R., 1967.

Catty odours in foods : the reaction between mesityl oxide and sulphur compounds in foodstuffs.

Chem. Ind. 37 : 1563-1564.

BALIGA, B.P., LYMAN, C.M., 1957.

Preliminary report on the nutritional significance of bound gossypol in cottonseed meal.

J.Amer. Oil. Chem. Soc. 34 : 21-24

BARAM, N.I., PAIZIEVA, R.Z., ISMAILOV, A.I., LAGUTKIN, N.A., MITIN, N.N., ZUBAIROV, M.M., ARKHIPOVA, G.N., PETRACHEVA, G.K., 1981.

Antiviral activity of several derivatives of gossypol and other aldehydes. Chem. Abstr. 99 : 203 n (1983).

BEART, J.E., LILLEY, T.H., HASLAM, E., 1985.

Plant polyphenols-secondary metabolism and chemical defence : some observations.

Phytochemistry 24 (1) : 33-38.

BELL, A.A., STIPANOVIC, R.D., HOWELL, C.R., MACE, M.E., 1974.

Terpenoid aldehydes of Gossypium : Isolation, quantitation and occurrence.

Beltwide cotton production Research Conference, January 7-9 1974

Dallas-Texas Pages 40-42.

BELL, A.A., STIPANOVIC, R.D., 1977.

The chemical composition, biological activity and genetics of pigment glands in cotton.

Beltwide Cotton Production Research Conferences Proceedings. January 10-12, Atlanta (pages 244-258) Memphis : National Cotton Council

BELL, A.A., STIPANOVIC, R.D., 1978.

Biochemistry of disease and pest resistance in cotton.

Mycopathologia 65 : 91-106.

BERARDI, L.C. ; and GOLDBLATT, L.A., 1969.

Gossypol in "Toxic constituents of plant food stuff", pages 211-266. Edité par LIENER, I.E. Academic press, New York, p. 211-266.

BESANÇON, P., HENRY, O. et ROUANET, J.M. 1985.

Valeur nutritionnelle comparée de farines délipidées de coton glandless et de soja.

C.R. Colloque IDESSA - CIDT - TRITURAF : Le cotonnier sans gossypol : une nouvelle ressource alimentaire. Pages 63-79. Abidjan.

BLANCO, A., AOKI, A., MONTAMAT, E.E., ROVAI, L.E., 1983.

Effect of gossypol upon motility and ultrastructure of Trypanosoma cruzi .
J. Protozool. 30 (4) : 648-651.

BLANKENSHIP D. C. et ALFORD B. B., 1983.

Cottonseed, the new staff of life. A monograph of cottonseed protein research conducted by scientists at the Texas Woman's University.

Texas woman's University Press. Denton, Texas, 76204.

BLOUIN, F.A., ; CHERRY, J.P., 1980.

Identification of color causing pigments in biscuits containing cottonseed flour.

J. Food Sci., 45, 953-961.

BLOUIN F.A., ZARINS Z.M., CHERRY J.P. ; 1981.

Role of flavonoids in the production of color in biscuits prepared with wheat and cottonseed flours.

J. Food Sci. 45, 953-961.

BOATNER C.H. 1948.

Pigments of cottonseed (chapitre VI) in Cottonseed and Cottonseed Products, their Chemistry and chemical technology. BAILEY, A.E.. Interscience publishers, New York.

BOATNER, C.H., CARAVELLA, M, KYAME, L., 1944.

Quantitative determination of extractable gossypol in cottonseed and cottonseed meal. A spectrophotometric method.

Ind. Eng. Chem. 16 (9) : 566-572.

BOATNER, C.H., SAMUEL, C.S., HALL, C.M., CURET, M.C., 1947 a

The pigments of cottonseed : II Gossycaerulin, a blue quinoïd gossypol derivative occuring in cooked cottonseed.

J. Amer. Chem. Soc. 69 : 668-672.

BOATNER, C.H., O'CONNOR, R.T., CURET, M.C., SAMUELS, C.S., 1947 b.
The pigments of cottonseed. III. Gossyfulvin a native cottonseed pigment
related to gossypol.

J. Amer. Chem. Soc. 69 : 1268-1273.

BOATNER, C.H., CASTILLON, L.E., HALL, C.M., 1949.

Gossypol and gossypurpurin in cottonseed of different varieties of G.
barbadense and G. hirsutum and variation of the pigments during storage of
the seed.

J. Amer. Oil. Chem. Soc. 26 : 19-25.

BOTTGER, G.T., SHEEHAN, E.T., LUKEFHAR, M.J. 1964.

Relation of gossypol content of cotton plants to insect resistance
J. Eco. Entomol. 57 (2) : 283-285.

BOURELY J. 1980.

Contribution à l'étude des sucres du cotonnier.

Cot. Fib. Trop., XXXV, fasc. 2 : 189-208.

BOURELY J. 1985 .

Technologie des graines de cotonniers sans gossypol.

C.R. Colloque IDESSA - CIDT - TRITURAF : Le cotonnier sans
gossypol : une nouvelle ressource alimentaire. Abidjan 26-27 novembre 1985.
Pages 112-135.

BRAHAM, J.E., JARQUÍN, BRESSANI, R.,

GONZÁLEZ, J.M., ELÍAS, L.G., 1967.

Effect of gossypol on the iron-binding capacity of serum in swine.

J. Nutr. 93 : 241-248.

BRESSANI, R., ELÍAS, L.G., JARQUÍN, BRAHAM, J.E., 1964.

All vegetable protein mixtures for human feeding. XIII. Effect of cooking
mixtures containing cottonseed flour on free gossypol content.

Food Techn. 18 (10) : 95-99.

BRUNET, P.C., 1967.

Les sclérotines

Endeavour 26 : 68-74.

BUFFET M., 1979.

La graine du cotonnier, source importante de matières grasses et de protéines utilisables dans l'alimentation de l'homme et des animaux.

Cot. Fib. trop., 34, Fasc. 2 : 191-204.

BUI-XUAN-NHUAN, 1971.

L'utilisation de la farine de coton en alimentation humaine.

Oléagineux 11 : 713-715.

BU'LOCK, J.D., 1965.

The biosynthesis of natural products. An introduction to secondary metabolism.

Mc GRAW-HILL P.C. limited London-New-York-Toronto-Sidney.

CANELLA, M., SODINI, G., 1977.

Extraction of gossypol and oligosaccharides from oilseed meals.

J. Food sci. 42 (5) : 1218-1219

CARPENTER, K.J., 1960.

The estimation of available lysine in animal protein foods

Biochem. J. 77 : 604-610.

CARPENTER, K.J., 1973.

Damage to lysine in food processing : its measurement and its significance.

Nutr. Abstr. 43 : 423-451.

CARRUTH F.E., 1918.

Contribution to the chemistry of gossypol
the toxic principle of cottonseed.

J. Amer. Chem. Soc. 40 : 647-663.

CARTER, F.L., FRAMPTON, V.L., 1964

Review of the chemistry of cyclopropene compounds.

Chem. Rev. 64 (5) : 497-525.

CARTER, C.M., LYMAN, C.M., 1969

Reaction of gossypol with amino acids and other amino compounds.

J.Amer. Oil. Chem. Soc. 46 : 649-653.

CARTER, C.M., LYMAN, C.M., 1970.

Effect of bound gossypol in cottonseed meal on enzymatic degradation.

Lipids 5 (9) : 765-769.

CASTOR-NORMANDIN, F., DUCASTAING, A., PREVOT, A., RAYMOND, J., 1984.

Préparation d'isolat de protéines à partir de tourteau de soja.

B- Transposition au niveau prépilote.

Rev. Fr. des Corps Gras 7/8 : 293-299.

CEGLA, G.F., BELL, K.R., 1977.

High pressure liquid chromatography for the analysis of soluble carbohydrates in defatted oilseed flours.

J. Amer. Oil Chem. Soc. 54 : 150-152.

CHAMPAGNOL, F., BOURZEIX, M., 1971.

Identification des sucres contenus dans un extrait végétal et évaluation de leurs teneurs individuelles par chromatographie et photodensitométrie.

J. Chromatogr. 59 : 472-475.

CHAN, B.G., MAHONEY, N., WAISS, A.C., 1983.

A quantitative method for gossypol and its analogs.

Beltwide Cotton Production Research Conference 1983. Pages 64-65.

CHANGFU, X.;, CUNHENG, H., GUANGHONG, B., SHANTIAN, M., 1982.

Cristal structure of gossypol acetic acid.

Scientia Sinica 25 (11) : 1194-1200.

CHEFTEL, J.C., CUQ, J.L., LORIENT, D., 1985.

Protéines alimentaires : biochimie-propriétés fonctionnelles- valeur nutritionnelle-modifications chimiques.

Techniques et documentation Lavoisier Paris.

Chemical and Engeneering News, 1978.

Dow test clear methylene chloride

Chem. Eng. News. 56 (30) : 7

CHERRY, P.J., GRAY, S.M., 1981.

Methylene chloride extraction of gossypol from cottonseed products.

J. Food Sci. 46 : 1726-1733.

CHOI, J.R., LUSAS, E.W., RHEE, K.C., 1982.

Fate of pigments and phytate during isolation of proteins from defatted glandless cottonseed flour.

J. Food sci., 47, 1032-1034.

CLARK, E.P. 1928.

Studies on gossypol. II. Concerning the nature of CARRUTH's D gossypol.

J. Biol. chem., 76, 229-233.

CLYDESDALE, F.M., 1977.

Color measurement in :

Current aspects of food colorants

Edité par THOMAS E. FURIA, CRC Press.

CONKERTON, E.J., FRAMPTON, V.L., 1959.

Reaction of gossypol with free ϵ -amino groups of lysine in proteins.

Arch. Biochem. Biophys. 81 : 130-134.

CORNU, A., 1979.

Conservation de la valeur nutritionnelle de la graine de coton

utilisée en alimentation humaine dans Culture technologique : la conservation des denrées alimentaires cultivées en climat chaud et humide.

Premier Colloque International de la Technologie (C.I.T.)

Yaoundé. Pages 229-245.

CORNU, A., DELPEUCH, F. et FAVIER, J. C., 1975.

Utilisation en alimentation humaine de la graine de coton sans gossypol. Institut de Recherches du Coton et des Textiles Exotiques. Paris, (France) et O.R.S.T.O.M. Yaoundé, (Cameroun).

CRAIG, W.M., BRODERICK, G.A., 1981.

Effect of heat treatment on true digestibility in rat : in-vitro proteolysis and available lysine content of cottonseed meal protein. J. Anim. Sci. 52 (2) : 292-301.

CUNNINGHAM, S.D., CATER, C.M., MATTIL, K.F., 1978.

Molecular weight estimate of polypeptide chains from storage protein of glandless cottonseed. J. Food Sci. 43 : 656-657.

CUQ J.L., 1981.

Modifications chimiques d'acides aminés indispensables sous l'influence de traitements technologiques alimentaires. Incidences nutritionnelles et métaboliques.

Thèse Doctorat d'Etat.

Université des Sciences et Techniques du Languedoc. Montpellier.

DABROWSKI, K.J., SOSULSKI, F.W., 1984 a.

Quantitation of free and hydrolysable phenolic acids in seeds by capillary gas-liquid chromatography.

J. Agric. Food Chem. 32 (1) : 123-127

DABROWSKI, K.J., SOSULSKI, F.W., 1984 b.

Composition of free and hydrolysable phenolic acids in defatted of ten oilseeds.

J. Agric. Food Chem : 32 : (1) 128-130.

DAMATY, S.M., HUDSON, B.J.F., 1975 a.

Preparation of low gossypol cottonseed flour.

J. Sci. Food Agric. 26 : 109-115.

DAMATY, S.M., HUDSON, B.J.F., 1975 b.

Interaction of gossypol with cottonseed protein : potentiometric studies.
J. Sci. Food Agric. 26 : 1667-1672.

DEACON, B.D., 1968.

Modified procedures for determination of gossypol pigments.

II. Determination of free gossypol in low gossypol meals and
of gossypol in oil.

J. Amer. Oil. Chem. Soc. 45 : 257-258.

DELAVEAU, P., VIDAL-TESSIER, A.M., 1986.

Propriétés biologiques et pharmacologiques des quinones.

Colloque J.I.E.P., Montpellier Bull. Liaison. Groupe Polyphénols Volume 13.
Pages 299-308.

de POIX, A., ROUET-MAYER, M.A., 1979.

Etude de l'inhibition des brunissements enzymatiques par les chlorures :
comparaison des résultats obtenus in-vitro à ceux obtenus directement sur
les pommes broyées.

Colloque J.I.E.P.

Bulletin de liaison groupe polyphénols (volume 9) pages 200-210.

de RHAM, O., JOST, T., 1979.

Phytate-protein interactions in soybean extracts and low phytate soy protein
products.

J. Food Sci. 44 (2) : 596-600.

DESOILLE, H., TRUFFERT, L., BOURGUIGNON, A.,

DELAVIERRE, P., PHILBERT, M., GIRARD-WALON, C., 1968.

Etude expérimentale de la toxicité du trichlorotrifluoroéthane (Fréon 113).
Archives Maladies Professionnelles 29 (7-8) : 381-388.

De VRIES, J.W., KOSKI, C.M., EGBERT, D.C., LARSON, P.A. 1980.

Comparison between a spectrophotometric and High-Pressure Liquid
Chromatography methods for determining tryptophan in food products.

J. Agric. Food Chem. 28 : 896-898.

DIECKERT, J.W., DIECKERT, M.C., 1976.

The chemistry and cell biology of the vacuolar proteins of seeds.
J. Food Sci. 41 : 475-482.

DOAT, J., 1974.

Application de la chromatographie sur couche mince à l'analyse des gommés et des bois tropicaux.

Bois et forêts des Tropiques 156 : 63-74.

DREZE, A., 1956.

Le dosage du tryptophane dans les milieux naturels. I. Stabilité du tryptophane vis à vis des agents d'hydrolyse.

Bull. Soc. Chim. Biol. 38 (1) : 234-253.

DRYDEN, M.J., SATTERLEE, L.D., 1978.

Effect of free and bound chlorogenic acid on the in-vitro protein digestibility and tetrahymena based PER of casein model system.

J.Amer. Oil. Chem. Soc. 43:650-651.

DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A., SMITH, F., 1956.

Colorimetric method for determination of sugars and related substances.
Anal. Chem. 28(3) : 350-356.

DUSHANBIEVA, S., BARINSKII, I.F., 1981.

Prophylactic and therapeutic effects of sodium gossypol β -aminoethylsulfonate (GSN) in normal and immune mice in an experimental herpetic infection.

Chem. Abst. 99 : 201 K (1983).

EDWARDS, J.D., 1958.

Total synthesis of gossypol.

J. Amer. Chem. Soc. 80 : 3798.

EL-NOCKRASHY, A.S., LYMAN, C.M., DOLLAHITE, J.W., 1963.

The acute oral toxicity of cottonseed pigment glands and intraglandular pigments.

J.Amer. Oil. Chem. Soc. 40 : 14-17.

FAO/WHO., 1973.

Energy and protein requirements. Report of a joint FAO/WHO ad hoc expert committee on energy and protein requirements, WHO, Geneva.

FARHI, M., MOREL, L., CAVIGNEAUX, A., 1967.

1,1,2 trichloro-1,2,2-trifluoroéthane.

Fiche toxicologique n° 65.

Institut National de Sécurité Paris.

FELICE, L.J., KING, W.P., KISSINGER, P.T., 1976.

A new liquid chromatography approach to plant phenolics. Application to the determination of chlorogenic acid in sunflower meal.

J. Agric. Food Chem. 24 (2) : 380-382.

FINOT, P.A., 1983.

Influence of processing on the nutritional value of proteins.

In: Plant Proteins for Human Food.

Edited by BODWELL, C.E., PETIT, L., GUEGUEN, J.

Martinus Nijhoff/Dr W. Junk publishers.

FENTON, T.W., LEUNG, J., CLANDININ, D.R., 1980.

Phenolic components of rapeseed meal.

J. Food Sci. 45 : 1702-1705.

FLEURIET, A., MACHEIX, J.J., 1972.

Séparation et dosage par chromatographie en phase gazeuse de l'acide chlorogénique et des catéchines des fruits.

J. Chromatogr. 74 : 339-345.

FORSYTH, W.G.C., QUESNEL, V.C., ROBERTS, J.B., 1958.

The interaction of polyphenols and proteins during cacao curing.

J. Sci. Food Agric. 9 : 181-184.

FRIEDMAN, M., FINLEY, J.W., 1971.

Methods of tryptophan analysis.

J. Agric. Food Chem. 19 (4) : 626-631.

GAD, T.E., EL-ZALAKI, E.M., 1980 a.

Effect of sodium hydroxide and other salts on gossypol content of cottonseed meal and oil.

Fette Seifein Anstrichmittel 82 (10) : 407-411.

GAD, T.E., EL-ZALAKI, E.M., 1980 b

Effect of various pressure cooking condition on gossypol content of cottonseed meal and oil.

Fette Seifein Anstrichmittel 82 (11) : 450-453.

GAZAVE, J.M., ROGER, C., ACHARD, M., PARROT, J.L., 1974.

Polyphénols et résistances capillaires.

Colloque JIEP : LYON

Bull. Liaison Groupe Polyphénols 1974 Volume 5.

GHEYASUDDIN, S., CARTER, C.M., MATTIL, K.F., 1970.

Preparation of a colorless sunflower protein isolate.

Food Technol. 24 : 242-243.

GRIFFITHS, D.W., MOSELEY, G., 1980.

The effect of diets containing field beans of high or low polyphenolic content on the activity of digestive enzymes in the intestines of rats.

J. Sci. Food Agric. 31 : 255-259.

GRODZIŃSKA-ZACHWIEJA, Z., BIEGANOWSKA, M., DZIDO, T., 1979.

Effect of mobile phase composition on the partition of phenolic acids in reversed phase TLC and H.P.L.C.

Chromatographia 12 (8) : 555-558.

GUILLAUMIN, R., 1974.

Abrégé des rapports concernant l'utilisation du flugène 113 dans l'extraction des graines d'arachide. Pages 110-138.

Institut des Corps gras ITERG (Paris).

GULLET, E.A., FRANCIS, F.J., CLYDESDALE, F.M., 1972.

Colorimetry of foods : orange juice

J. Food Sci. 37 : 389-393.

GUILLEUX, F., 1975.

Interactions entre pigments polyphénoliques et constituants protéiques des aliments.

Thèse de spécialité U.S.T.L. Montpellier II.

GUI-YUAN, Z., BILIAN, X., ZHEN-WEN, C.,

JI-CHUAN, Z., GUAND-DON, M., 1985.

Dynamic study of serum gonado-trophin and testosterone level in gossypol treated men long term follow-up study of 60 cases.

Int. J. Androl. 8 : 177-185.

HALUK, J.P., BADI, F., METCHE, M., 1986.

Les composés phénoliques solubles simples et liés aux pectines de la betterave à sucre en relation avec le phénomène du brunissement enzymatique.

Colloque J.I.E.P. Montpellier

Bull. Liaison Groupe Polyphénols (volume 13). Pages 309-314.

HANNY, B.W., 1980.

Gossypol, flavonoid, and condensed tannin content of cream and yellow anthers of five cotton (Gossypium hirsutum L.) cultivars.

J. Agric. Food Chem. 28 : 504-506.

HANSEN, S.A., 1975.

Thin layer chromatographic method for the identification of mono-, di- and trisaccharides.

J. Chromatogr. 107 : 224-226.

HARBONE, J.B., 1980.

Plants phenolics. In : Encyclopedia of Plant Physiology. Vol. 8 : Secondary plant products, BELL, E.A., CHARLWOOD B.V., Ed. SPRINGER VERLAG, BERLIN.

Pages 329-402.

HARPER, G.A., SMITH, K.J., 1968.

Status of cottonseed protein.

Economic Botany 22 : 63-72.

HASLAM, E., 1966.

Chemistry of vegetable tannins.

Academic press London and New York.

HASLAM, E., 1974.

Polyphenol-proteins interactions.

Biochem. J. 139 : 285-288.

HASLAM, E., LILLEY, T. H., 1985.

New polyphenols for old tannins. Pages 237-256 dans "The biochemistry of plant phenolics": Annual proceeding of the phytochemical Society of the Europ (volume 25), édité par: VAN SUMERE, C. F. et LEA, P. J. Clarendon press Oxford.

HEDIN, P.A., SHEPHERD, R.L., KAPPELMAN, A.J., 1984.

Evaluation of cotton polyphenols as factors of resistances to root-knot nematodes and Fusarium Wilt.

J. Agric. Food Chem. 32 : 633-638.

HENDRICKS, J.D., SINNHULER, R.O., LOVELAND, P.M.,

PAWLOWSKI, N.E. and NIXON, J.E. 1980.

Hepatocarcinogenicity of glandless cottonseed and cottonseed oil to rainbow trout Salmo gairdnerii .

Science, 208, 309-311.

HENSARLING, T.P., YATSU, L.Y., JACKS, T.J., 1970.

Extraction of lipids from cottonseed tissue : II. Ultrastructural effect of lipid extraction.

J. Amer. Oil. Chem. Soc. 47 : 224-225.

HOFFPAUIR, C.L., HARRIS, J.A. and HUGHES, J.P. 1960.

Gossypol acetic acid as a reference standard in the determination of gossypol.

J. Assoc. off. Anal. Chem., 43 (2) : 329-331.

HORIGOME, T., KANDATSU, M., 1968.

Biological value of proteins allowed to react with phenolic compounds in the presence of o-diphenoloxidase.

Agric. Biol. Chem. 32 (9) : 1093-1102.

HORSPOOL, W.M., 1969.

Synthetic 1,2-quinone ; synthesis and terminal reactions.

Quart. Revs. Chem. Soc. 23 : 204-209.

HOSTETTMANN, K., DOMON, B., SCHAUFELBERGER, D., HOSTETTMAN, M., 1984.

On line High Performance Liquid Chromatography. Ultraviolet-visible spectroscopy of phenolic compounds in plant extracts using post column derivation.

J. Chromatogr. 283 : 137-147.

HOSTETTMANN, K., 1985

Recent advances in methodology for the isolation and purification of plant phenolics. Pages 1-16 dans "The biochemistry of plant phenolics": Annual proceeding of the phytochemical Society of the Europ (volume 25), édité par VAN SUMERE, C. F. et LEA, P. J. Clarendon press Oxford.

HRON, R.J., 1981.

Differential settling test for evaluation of liquid cyclone classification performance.

Cereal Chem. 58 (4) : 334-338.

HRON, R.J., KOLTUN, S.P., GRACI, A.V., 1982.

Suitability of commercial cottonseed for producing edible high protein flours by liquid classification.

J.Amer. Oil. Chem. Soc., 59 (5) : 233-237.

HRON, R.J., KOLTUN, S.P., POMINSKI, J., ABRAHAM, G., 1987.

The potential commercial aspect of gossypol.

J.Amer. Oil. Chem. Soc. 64 (9) : 1315-1319.

HUGHES, R.E., FI-BIOL, M.A., 1978.

Fruit flavonoids : some nutritional implications.

J. Human Nutr. 32 : 47-52.

HURRELL, R.F., FINOT, P.A., CUQ, J.L., 1982.

Protein-polyphenol interactions. 1-Nutritional and metabolic consequences of the reaction between oxidized caffeic acid and the lysine residue of casein. Br. J. Nutr. 47 : 191-211.

JACKS, T.J., YATSU, L.Y., HENSARLING, T.P., 1974.

Extraction of lipids from cottonseed tissue : V. ultrastructural effects of extraction of oil with hexane-acetic acid.

J.Amer. Oil. Chem. Soc. 51 : 169-170.

JOHNSON, L.A., FARNSWORTH, J.T., SADEK, N.Z.,

CHAMKASEM, N., LUSAS, E.W., REID, B.L., 1986.

Pilot plant studies on extracting cottonseed with methylene chloride.

J.Amer. Oil. Chem. Soc. 63 (5) : 647-652.

JOHNSTON, K.M., STERN, J.D., WAIS, A.C., 1968.

Separation of flavonoid compounds on sephadex LH-20.

J. Chromatog. 33 : 539-541.

JONES, L.A., 1985.

Gossypol chemistry and plant distribution in male fertility and its regulation. Ed. by LOBL, T.J., and HAFEZ, E.S.E., M.T.P. Press limited LANCASTER.

JONES, L.A., SMITH, F.H., 1975.

Effect of free and bound gossypol on the absorption of L-(¹⁴C) lysine, L-(¹⁴C) methionine, and L-(¹⁴C) valine from small intestine.

J. Agric. Food Chem. 23 (4) : 647-653.

JOSLYN, M.A., PONTING, J.D., 1951.

Enzyme catalyzed oxidative browning of fruit products.

Adv. Food Res. 3 : 1-38.

JOSLYN, M.A., GOLDSTEIN, J.L., 1964.

Astringency of fruit products in relation to phenolic content.

Adv. Food Res. 13 : 179-217.

KADAN, R.S., ZIEGLER, J.R., SPARADO, J.J., 1978.

Color of cottonseed flour and isolates as affected
by mixed solvent extraction.
Cereal Sci. Today, 16 : 216.

KADAN, R.S., FREEMAN, D.W., ZIEGLER, G.M., SPARADO, J.J., 1980.

Protein displacement during classification of glanded cottonseed.
J. Food Sci. 45 : 1566-1572.

KAKADE, M.L., LIENER, I.E., 1969.

Determination of available lysine in proteins.
Anal. Biochem. 27 : 273-280.

KARIKARI, S.K., 1983.

La situation et le rôle futur des plantins en Afrique de l'Ouest.
Fruits 38 (4) : 240-245.

KAUFMANN, H.P., VOM ORDE, H.O., 1955

Über die extraktion von ölsaaten mit aliphatischen
fluor-chlor-kohlewasserstoffen I : Die extraktion von soja und bawmwollsaat
mit 1,2,2, trifluor-trichlor-äthan.
Fette Seifen Anstrichmittel 57 : 399-401.

KIM, M.K., COLVIN, B.M., LAWHON, J.T., 1971.

Improvement in the color of protein isolates from
glandless cottonseed flour.
Cereal Sci. Today 16 (7) : 216-227.

KING, W.H., THURBER, F.H., 1953.

An improved procedure for the purification of gossypol.
J. Amer. Oil. Chem. Soc. 30 : 70-74.

KING, W.H., KNOEPFLER, N.B., HOFFPAUIR, C.L.,
Mc COURTNEY, E.J., 1957.

Pilot plant development of the alkali cooking process for cottonseed meats. I.
Effects of flakes thickness and time, temperature and moisture content
during cooking.
J. Amer. Oil. Chem. Soc. 34 : 27-30.

KRYGIER, K., SOSULSKI, F., HOGGE, L., 1982 a
Free, esterified, and insoluble bound phenolic acids.
1 - extraction and purification procedure.
J. Agric. Food Chem. 30 : 330-334.

KRYGIER, K., SOSULSKI, F., HOGGE, L., 1982 b
Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. 2 - composition of
phenolic acids in rapeseed flour and hulls.
J. Agric. Food Chem. 30 : 334-336.

KUHNAU, J., 1976.
The flavonoids. A class of semi-essential food components :
their role in human nutrition.
World Rev. Nutr. Diet. 24 : 117-191.

KUIKEN, K.A., 1952.
Availability of the essential amino-acids in cottonseed meal.
J. Nutr. 46 : 13-25.

KUZNETSOVA, N.N., NURIDZHANYANTS, S.S., LEONT'EV, V.B., BARAM, N.I.,
PAIZIEVA, R.Z., ISMAILOV, A.I., 1979.
Determination of cytotoxic effect and antitumor activity of gossypol and some
of its derivatives.
Chem. Abstr. 92 : 140463 C (1980).

LAGIERE, R., 1966
Le cotonnier
Maisonneuve et Larose, Paris.

LAWHON, J.T., CARTER, C.M. and MATTIL, K.F. 1977.
Evaluation of the food use potential of sixteen varieties of cottonseed.
J. Amer. Oil Chem. Soc., 54 : 75-80.

LEA, A.G.H., CRISPIN, D.J., 1971.
The separation of theaflavins on sephadex LH-20
J. Chromatogr. 54 : 133-135.

LOOMIS, W.D., BATTAILE, J., 1966.

Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes.
Phytochemistry 5 : 423-438.

LORENTZ, K., 1976.

On the nature of protein benzoquinone complexes
Experientia 32 (12) : 1502-1503.

LUKEFAHR, M.J., HOUGHTALING, J.E., 1969.

Resistance of cotton strains with high gossypol content to Heliothis spp .
J. Eco. Entomol. 62(3) : 588-591.

LUI, N.S.T., ALTSCHUL, A.M., 1967.

Isolation of globoïds from cottonseed aleurone grain.
Arch. Biochem. Biophys. 121 : 678-684.

LUSAS, E.W., JIVIDEN, G.M., 1985.

Glandless Cottonseed processing and Utilization Research.
Proceedings of the World Conference on Emerging Technologies
in the Fat
J. Amer. Oil Chem. Soc. 62 : 221-231.

LYMAN, C.M., CHANG, W.Y., COUCH, J.R., 1953.

Evaluation of protein quality in cottonseed meals by chick growth and by a
chemical index method.
J. Nutr. 49 : 679-690.

LYMAN, C.M., BALIGA, B.P., SLAY, M.W., 1959.

Reaction of proteins with gossypol.
Arch. Biochem. Biophys. 84 : 486-497.

LYMAN, C.M., EL-NOCKRASHY, A.S. and DOLLAHITE, J.W. 1963.

Gossyverdurin, a newly isolated pigment from
cottonseed pigment glands.
J. Amer. Oil chem. Soc., 40 : 571-575.

MAC DOUGALL, D.B., 1986.

The chemistry of colour and appearance.

Food Chemistry 21 (4) : 283-297.

MACHEIX, J.J., 1974

Les esters hydroxycinnamiques de la pomme : identification, variation au cours de la croissance du fruit et du métabolisme.

Thèse de Doctorat d'état ès Sciences Naturelles. Université Paris VI.

MACHEIX, J.J., DELAPORTE, N., 1973.

Etude de la répartition dans le fruit de Pirus malus L., des principaux σ -diphénols par dosage oxydimétrique en milieu non aqueux.

Lebnsn. Wiss. U. Technol. 6 : 19-22.

MAGA, J.A., 1978.

Simple phenol and phenolic compounds in food flavour.

C.R.C. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 10 : 323-372.

MAGA, J.A., LORENZ, K., 1974.

Gas-liquid chromatography separation of the free phenolic acid fractions in various oilseed protein sources.

J. Sci. Food Agric. 25 : 797-802.

MAHONEY, N.E., CHAN, B.G., 1985.

High Performance Liquid Chromatographic analysis of terpenes aldehydes in cotton.

J. Chromatogr. 329 : 91-98.

MARBRY, T.J., MARKHAM, K.R., THOMAS, M.B., 1970.

The systematic identification of flavonoïds.

Springer-verlag Berlin-Heidelberg-New-York.

MARCHLEWSKI, L.P.T., 1899.

Gossypol, ein bestandtheil der baumwollsamensamen.

J. Prakt. Chem. 40 : 84-90.

MARIGO, G., 1973.

Sur une méthode de fractionnement et d'estimation des composés phénoliques chez les végétaux.

Analisis 2 (2) : 106-110.

MARKMAN, A.L., RZHEKHIN, V.P., 1969.

Gossypol and its derivatives.

Israël program for scientific translation.

MARTINEZ, W.H., FRAMPTON, V.L., CABELL, C.A., 1961.

Effects of gossypol and raffinose on lysine content and nutritive quality of proteins in meals from glandless cottonseed.

Agric. Food Chem. 9 : 64-66.

MARTINEZ, W.H., BERARDI, L.C., FRAMPTON, V.L., WILCKE, H.L., GREENE, D.E., TEICHMAN, R., 1967.

Importance of cellular constituents to cottonseed meal quality.

J. Agric. Food Chem. 15 (3) : 427-432.

MASON, H.S., PETERSON, E.W., 1965.

Melanoproteins. I. reactions between enzyme-generated quinones and amino acids

Biochem. Biophys. Acta. 111 : 134-136.

MATTIL, H.A., 1931.

Antioxidants and the autoxidation of fats.

J. Biol. Chem. 90 : 141-151.

MAYORGA, H., GONSALEZ, J., MENCHU, F.J., ROLZ, C., 1975.

Preparation of a low free gossypol cotton-seed flour by dry and continuous processing.

J. Food Sci. 40 : 1270-1274.

Mc MICHAEL, S.C., 1959.

Hopi cotton, a source of cottonseed free of gossypol pigments.

Agronomy Journal 51 : 630.

Mc MICHAEL, S.C., 1960.

Combined effect of glandless genes gl2 and gl3 on pigment glands in the cotton plant.

Agronomy Journal 52 : 385-386.

MEKSONGSEE, L.A., CLAWSON, A.J., SMITH, F.H., 1970.

The in-vivo effect of gossypol on cytochrome oxydase, succinoxidase and succinic dehydrogenase in animal tissues.

J. Agric. Food Chem. 18 (5) : 917-920.

METCHE, M., 1986.

Oxydation des substrats polyphénoliques et qualité des produits alimentaires. Importance des intermédiaires quinoniques.

Colloque J.I.E.P., Montpellier.

Bull. Liaison Groupe Polyphénols (volume 13). Pages 292-298.

MIKOLAJCZAK, L.K., SMITH, R.C., WOLF, A.I., 1970.

Phenolic and sugar components of Armavirec variety sunflower (Helianthus annuus) seed meal.

J. Agric. Fd Chem. 18 (1) : 27-32.

MORRIS, Jr. C., 1986.

New protein bred contains... cottonseed flour.

Food Engineering, 58 (1) : 49-59.

MORRIS, I.D., HIGGINS, C., MATLIN, S.A., 1986.

Inhibition of testicular LDH-X from laboratory animals and man by gossypol and its isomers.

J. Reprod. Fert. 77 : 607-612.

MURPHY, J.B., STUTTE, C.A., 1978.

Analysis for substituted benzoic and cinnamic acids using high pressure liquid chromatography.

Anal. Biochem. 86 : 220-228.

MURTI, K.S. et ACHAYA, K.T., 1975.

Cottonseed chemistry and technology.

Publication and information direction, CSIR, Hellside Road, New Delhi, India.

NAGELS, L., PARMENTIER, F., 1976.

Kinetic study of possible intermediates in the biosynthesis of chlorogenic acid in Cestrum poeppigii .

Phytochem. 15 (5) : 703-706.

NAVILLIER, P., 1958.

Dosage rapide de l'azote par l'entraînement de l'ammoniac dans la vapeur surchauffée et titrage simultané.

Fruits, 13 : 410-411.

NEU, R., 1956.

Ein neues reagenz zum nachweis und zur unterscheidung von flavonen im papierchromatogramm.

Die naturwissenschaften, 43 : 82.

NICOLAUS, R.A., 1968.

Melanins

Edition HERMANN, Paris.

NIELSEN, H.K., HURRELL, R.F., 1985.

Tryptophan determination of food proteins by H.P.L.C. after alkaline hydrolysis.

J. Sci. Food Agric 36 : 893-907.

NISSERON, S., CHAUVETTE, C., BATTARD, J.C., PORTHAULT, M., 1984.

Analyse des polyphénols dans les tabacs par chromatographie en phase liquide.

Analisis 12 (10) : 523-534.

NOMEIR, A.A, ABOU-DONIA, M.B., 1982.

Gossypol : high-performance liquid chromatography and stability in various solvents.

J.Amer. Oil. Chem. Soc. 59 (12) : 546-610.

NOMEIR, A.A, ABOU-DONIA, M.B., 1985.

Photodecomposition of gossypol by ultra-violet irradiation.

J.Amer. Oil. Chem. Soc. 62 (1) : 87-89.

OIL WORD STATISTICS UPDATE 1987/1988.

ISTA Mielke GmbH P.O.B. 90 08 03 2100 HAMBURG 90. West Germany.

OKHAWA, M., 1985.

The relation between growth inhibitor and phenols in developing berry of "Muscat of Alexandria" grape.

J. Japanese Soc. Hort. Sci. 53 (4) : 383-389.

OUEDRAOGO, M.A., BEZARD, J.A., 1982.

Les triglycérides de l'huile de coton.

Rev. Française Corps Gras 1 : 11-16.

PAG guideline n° 4, 1970.

PAG guideline for preparation of edible cottonseed protein concentrate.

11 june 1970.

Advisory group of the United Nation System, United Nations N.Y. 10017 U.S.A.

PARRY, G. 1982.

Le cotonnier et ses produits, techniques agricoles et production tropicales.

Editeur Maisonneuve Paris.

PEARCE, S.C., 1978

Introduction à la statistique en biologie.

Editions S.E.I. C.N.R.A. Versailles France.

PEARCE, J.P., PEACOCK, J.M., AYLWARD, F., HAISMAN, D.R., 1967.

Catty odours in foods : reaction between hydrogen sulphide and unsaturated ketones.

Chem. Ind. 37 : 1562-1563.

PELLETIER, O., KEITH, M.O., 1974.

Bioavailability of synthetic and natural ascorbic acid.

J. AM. Diet. Assoc. 64 : 271-275.

PHELPS, R.A., SHENSTONE, F.S., KEMMERER, A.R., EVANS, R.J., 1965.

A review of cyclopropenoid compounds : Biological effects of some derivatives.

Poultry Sci. 44 : 358-394.

PIERPOINT, W.S., 1969 a.

o-quinones formed in plant extracts.

Their reactions with aminoacids and peptides.

Biochem. J. 112 : 609-616.

PIERPOINT, W.S., 1969 b.

o-quinone formed in plant extracts. Their reaction with bovine serum albumin.

Biochem. J., 112 : 619-629.

PLAKAS, S.M., LEE, T.C., and WOLKE, R.E., 1985.

Absence of over toxicity from feeding the flavonol quercetin to rainbow trout
(Salmo gairdneri)

Food Chem. Toxic. 23 (12) : 1077-1080.

PODOL'SKAYA, M.Q., 1944.

Nouvelle méthode rapide de détermination du gossypol libre de la graine et du
tourteau de cotonnier et du gossypol invariable de l'huile.

Zhurnal Prikladnoi Khimii 17 (1-2) : 657-658.

POESSEL, J.L., 1983.

Composés phénoliques et peroxydases de l'abricotier (Prunus armeniaca L.).

Etude comparative de deux variétés (Luizet et Canino) en relation avec
l'incompatibilité au greffage.

Thèse de Doctorat 3è cycle en phytotechnie U.S.T.L. Montpellier.

POKORNY, J., JANITZ, W., VIDEN, I., VELISEK, J., VALENTOVA, H.,

DAVIDEK, J., 1987

Reaction of oxidized lipids with protein .

Part 14. Aldolization reaction of lower alkanals in presence of nonlipidic
substances.

Die Nahrung 31: 63-70.

POKORNY, J., DAVIDEK, J., TRAN HA CHI, VALENTOVA, H., MATEJICEK, J.,
DLASKOVA, Z., 1988.

Reaction of oxidized lipids with protein.

Part 15. Mechanism of lipoprotein formation from interactions of oxidized
ethylinoleate with egg albumin.

Die Nahrung 4 : 343-350

POMINSKI, J., PACK, F.C., 1957.

The destruction of gossypol in cottonseed oil soapstock by a heat treatment.

J.Amer. Oil. Chem. Soc. 34 : 299-301.

PONS, W.A., GUTHRIE, J.D., 1949

Determination of free gossypol in cottonseed materials.

J.Amer. Oil. Chem. Soc. 26 : 671-676.

PONS, W.A., HOFFPAUIR, C.L., O'CONNOR, R.T., 1950.

Determination of total gossypol pigments in cottonseed materials.

J.Amer. Oil. Chem. Soc. 27 : 390-393.

PONS W., and HOFFPAUIR C. 1957.

Determination of free and total gossypol in mixed feeds
containing cottonseed meals.

J. Assoc. Off. Agric. Chem., 40 (4) : 1068-1080.

PONS, W.A., PITTMAN, R.A., HOFFPAUIR, C.L., 1958.

3 amino-1-propanol as a complexing agent in the determination of total
gossypol.

J.Amer. Oil. Chem. Soc. 35 : 93-97.

PONS, W.A., POMINSKI, J., KING, W.H., HARRIS, J.A., HOPPER, T.H., 1959.

Recovery of gossypol from cottonseed Gums.

J.Amer. Oil. Chem. Soc., 36 : 328-332.

POUX, N., 1965.

Localisation de l'activité phosphatasique acide et des phosphates dans les graines d'aleurone.

I. Grains d'aleurone renfermant à la fois globoïdes et cristalloïdes.

J. Microscopie 4 : 771-782.

PRATT, C., WENDER, S.H., 1959.

Identification of rutin and isoquercitrine in cottonseed.

J. Amer. Oil. Chem. Soc. 36 : 392-394.

PRATT, C., WENDER, S.H., 1961.

Identification of kaempferol 3-rhamnoglucoside and quercetine-3-glucoside in cottonseed.

J. Amer. Oil. Chem. Soc., 38(8) : 403-404.

PRICE, W.P., EDENS, R., HENDRIX, D.L., DEMING, S.N., 1979.

Optimized reverse-phase High Performance Liquid Chromatographic separation of cinnamic acids and related compounds.

Anal. Biochem. 93 : 233-237.

QIAN, S.Z., WANG, Z.G., 1984.

Gossypol : A potential antifertility agent for males.

Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 24 : 329-360.

RACKIS, J.J., SESSA, D.J., STEGGERDA, F.R., SHIMIDZU, T., ANDERSON, J., PEARL, S.L., 1970.

Soy bean factors relating to gas production by intestinal bacteria.

J. Food Sci. 35 : 634-639.

RAMBOURG, J.C., MONTIES, B., 1980.

Dosages fluorimétriques et densitométriques du coumestrol. Applications au contrôle de la qualité des préparations protéiques de feuilles de luzerne (Medicago sativa)

Ann. Technol. Agric. 29 : 463-475.

RAMBOURG, J.C., MONTIES, B., 1983.

Determination of polyphenolic compound in leaf protein concentrates of lucerne and their effect on the nutritional value.

Qual. Plant. Plant. Foods Hum. Nutr. 33 : 169-172.

RAMASWANY, S., REGE, D.V., 1976.

Complexes of phenolics with amino-acids.

J. Food Sci. Technol. 13 : 24-26.

RAYMOND, J., RAKARIYATHAM, N., AZANZA, J.L., 1984.

Interactions polyphénols-protéines dans la graine du tournesol (Helianthus annuus).

Sci. Alim. 4 : 95-108.

REDDY, M., NARASINGA RAO, M.S., 1988 a.

Method for the isolation of gossypin (11 S protein) and congossypin (7 S protein) from glanded cottonseed.

J. Agric. Food Chem. 36 (2) : 237-240.

REDDY, M., NARASINGA RAO, M.S., 1988 b.

Physicochemical properties of gossypin (11 S protein) and congossypin (7 S protein) of glanded cottonseed.

J. Agric. Food. chem. 36 (2) : 241-245.

REDDY, M., NARASINGA RAO, M.S., 1988 c.

Interaction of gossypol with gossypin (11 S protein) and congossypin (7 S protein) of cottonseed and glycinin (11 S protein) of soybean.1. Reaction kinetics, binding stoichiometry, and reversibility studies.

J. Agric. Food. Chem. 36 (2) : 246-252.

REPÁŠ, A., NIKOLIN, B., DURSUN, K., 1969.

The separation of phenolic glucosides by gel filtration.

J. Chromatogr. 44 : 184-187.

REZNIK, H., EGGER, K., 1961.

Benedickts reagents als indicators für phenolische ortho-dihydroxygruppens.
Z. Anal. Chem. 183 : 196-199.

RIBEREAU GAYON, P., 1968.

Plant phenolics.

Published by Oliver and Boys.

A division of longman group limited. Edingburgh.

ROBERT, E.A.H., 1959.

The interaction of flavonol orthoquinones with cysteine and glutathione.
Chem. and Ind. Page 995.

ROSTON, D.A., KISSINGER, P.T., 1982.

Liquid chromatographic determination of phenolic acids of vegetable origin.
J. Liq. Chromatog. 5 (1) : 75-103.

ROTH, M., 1971.

Fluorescence reaction for amino acids.

Anal. Chem. 43(7) : 880-882.

SABIR, A.M., SOSULSKI, W.F., KERMAN, A.J., 1974.

Phenolic constituents in sunflower flour.

J. Agric. Food Chem. 22 (4) : 572-574.

SAUVAIRE, Y.D., BACCOU, J.C.F., KOBREHEL, K., 1984.

Solubilization and characterization of Fenugreek seed proteins.

J. Agric. Food Chem. 32 : 41-47.

SCHEIFFELE, E.W., SHIRLEY, D.A., 1964.

The oxidation of gossypol I. Early stages in the reaction of gossypol and oxygen.

J. Org. chem. 29 : 3617-3620.

SHARVER, T.N., LUKEFAHR, M.J., 1969.

Effect of flavonoids pigments and gossypol on growth and development of the bollworm tobacco budworm, and pink bollworm.

J. Eco. Entomol. 62 (3) : 643-645.

SHENSTONE, F.S., VICKERY, J.R., JOHNSON, A.R., 1965.

Studies on the chemistry and biological effects of cyclopropenoid coumpounds.

J. Agric. Food Chem. 13 (5) : 410-414.

SHIEH, T.R., MATHEWS, E., WODZENKI, R.J., WARE, J.H., 1968.

Effect of calcium and phosphate ions on the formation of soluble iron-gossypol complex.

J. Agric. Food Chem. 16 (2) : 208-211.

SHIRLEY, D.A., 1966.

Nuclear magnetic resonance of gossypol.

Proc. Conf. Inactivation of gossypol with mineral salts. New Orleans, La. (1966).

SIEWEK, F., GALENSA, R., 1984.

High-performance liquid chromatographic determination of the degree of glycosylation of flavonols by use of ultra-violet diode array detector.

J. Chromatogr. 294 : 385-389.

SINGLETON, V.L., KRATZER, F.H., 1969.

Toxicity and related physiological activity of phenolic substance of plant origin.

J. Agric. Food Chem. 17 (3) : 497-512.

SMITH, F.H., 1946 a.

Spectrophotometric method for estimating gossypol in crude cottonseed oil.

Ind. Eng. chem. 18 (1) : 41-43.

SMITH, F.H., 1946 b.

Estimation of gossypol in cottonseed meal and cottonseed meats.

Ind. Eng. Chem. 18 (1) 43-45.

SMITH, F.H., 1958.

Spectrophotometric determination of total gossypol in cottonseed meal and cottonseed meats.

J. Amer. Oil Chem. Soc. 35 : 261-265.

SMITH, K.J., 1970.

Practical significance of gossypol in feed formulation.

J. Amer. Oil Chem. Soc. 47 : 448-450.

SMITH, F.H., HALVERSON, J.P., 1933.

Estimation of total and bound (D) gossypol in cottonseed meal : a modified method.

Ind. Eng. Chem. 5 (5) : 319-322.

SMITH, F.H., CLAWSON, A.J., 1970.

The effects of dietary gossypol on animals.

J. Amer. Oil Chem. Soc. 47 : 443-447.

SMITH, F.H., YOUNG, C.T., SHERWOOD, F.W., 1959.

Effect of bound gossypol on the growth promoting properties of cottonseed, soybean and peanut meals.

J. Nutr. 53 : 393-409.

SNEDECOR, G.W., COCHRAN, W.G., 1971.

Statistical methods

Oxford and J.B.H. publishing CO.

6th edition A.C.T.A. Paris (1971).

SOSULSKI, W.F., Mc CLEARY, C.W., SOLIMAN, F.S., 1972.

Diffusion extraction of chlorogenic acid from sunflower kernels.

J. Food Sci. 37 : 253-256.

SOUKUP, R.J., YOUNG-MAING II, 1977.

The color need of the food industry (chapitre 8). In :

Current Aspects of Food Colorants. THOMAS E. FURIA, CRC Press.

SPIES, J.R., CHAMBERS, D.C., 1948.

Determination of tryptophan : study of color forming reaction of tryptophan, P-dimethylaminobenzaldehyde, and sodium nitrate in sulfuric acid solution.
Anal. Chem. 20 (1) : 30-39.

SPIES, J.R., CHAMBERS, D.C., 1949.

Chemical determination of tryptophan in protein.
Anal. Chem. 21 (10) : 1249-1266.

SPIES, J.R., 1967.

Determination of tryptophan in proteins.
Anal. Chem. 39 : 1412-1416.

STAHL, 1965.

Thin-layer chromatography. A laboratory hand book.
Springer-Verlag. New-york.

STIPANOVIC, R.D., DONOVAN, J.C., BELL, A.A., MARTIN, F.W., 1984.

Factors interfering in gossypol analysis of Okra and glandless cottonseed using direct aniline extraction.
J. Agric. Food Chem. 32 : 809-810.

STORHERR, R.W., HOLLEY, K.T., 1954.

Feed analysis : determination of free gossypol in mixed feeds.
J. Agric. Food Chem. 2 : 745-747.

SWAIN, T., HILLIS, W.E., 1959.

The quantitative analysis of phenolic constituents.
J. Sci. Food Agric. 10 : 63-68.

SYNGE, R.L.M., 1976.

Damage to nutritional value of plant proteins by chemical reactions during storage and processing.
Qual. Plant. XXVI, 1/3 : 9-27.

SYNGE, R.L.M., 1978.

Polyphenol-protein reactions and their significance
for agricultural practices.

Colloque J.I.E.P. Bulletin de liaison groupe polyphénol. Vol. 8 pages 13-24.

TAHA, M.G., 1986.

Etude physico-chimique des graines et des fibres du

Gossypium barbadense L. au cours de leur développement en Egypte.

Thèse de Doctorat d'Etat. U.S.T.L., Montpellier.

TANTAWI, B., 1983.

Séparation et identification des composés polyphénoliques
du tourteau de colza.

Thèse de Doctorat 3è cycle, Orsay, Paris XI.

TEMPLE, S., 1976.

1,1,2-trichloro-1,2,2, trifluoroéthane for oilseed extractions.
J. Amer. Oil Chem. Soc. 53 : 32-35.

TONE, J.N., JENSEN, D.R., 1970.

Effect of ingested gossypol on the growth performance of rats.
Experientia 26(9) : 970-971.

TONE, J.N., JENSEN, D.R., 1974.

Hematological effects of injected gossypol and iron in rats.
J. Agric. Food Chem. 22 (1) : 140-143.

TOUMA-TOUCHAN, H., 1977.

Etudes biochimiques et ultrastructurales des lipides
dans la graine du cotonnier.

J. of ultrastructure Research 58 : 271-288.

TURNER, W.W., 1967.

Cottonseed meal trace element survey by atomic absorption spectrophotometry.
J. Amer. Oil Chem. Soc. 44(2) : 129-130.

UDY, D. C., 1971.

Improved dye method for estimating proteins.

J. Amer. Oil. Chem. Soc. 48 : 29 A - 33 A.

VACCARINO, C., 1961.

A new industrial process for cottonseed.

J. Amer. Oil Chem. Soc. 38 : 143-147.

VALLE-RIESTRA, J.F., 1974.

Food processing with chlorinated solvents.

Food Technol. 28(2) : 25-32.

VANDER JAGT, D.L., BAACK, B.R., CAMPOS, N.M.,

HUNSAKER, L.A., ROYER, R.E., 1984.

A derivative of gossypol retains antimalarial activity.

IRCS Med. Sci., 12 : 845-846.

VARGA, M., KOVES, E., 1959.

Phenolic acids as growth and germination inhibitors in dry fruits.

Nature. 4658 : 401.

VILLENEUVE, F., 1982.

Les composés phénoliques de la fève de cacao : Theobroma cacao L.

Evolution au cours de la fermentation.

Thèse de 3^e cycle (Sciences Agronomiques) U.S.T.L. Montpellier.

VITHAYATHYL, P.J., MURTHY, G.S., 1972.

New reaction of o-benzoquinone at the thioether group of methionine.

Nature : 236 : 101-103.

VIX, H.L.E., SPADARO, J.J., WESTBROOK, R.D., CROVETTO, A.J., POLLARD, E.F.,

GASTROCK, E.A., 1947.

Pre-pilot plant mixed solvent flotation process for separating pigment glands from cottonseed meats.

J. Amer. Oil Chem. Soc. 18 : 228-236.

- VIX, H.L.E., EAVES, P.H., GARDNER, H.K., LAMBOU, M.G., 1971.
Degossypolized cottonseed flour. The liquid cyclone process.
J. Amer. Oil Chem. Soc. 48 : 611-615.
- VON DER HARR, P., POMINSKI, C.H., 1952.
Pigments of cottonseed. V : méthylation of gossypurpurin.
J. Org. Chem. 17 : 177-180.
- WAISS, A.C., CHAN, B.G., BENSON, M., LUKEFAHR, M.J., 1978.
Nuclear magnetic resonance spectroscopic analysis of gossypol and its analogs
in cotton flower buds (gossypium).
J.A.O.A.C. 61 (1) : 146-149.
- WALDROUP, P.W., KEYSER, E.G., TOLLETT, V.E., BOWEN, T.E., 1968.
The evaluation of a low gossypol glandless cottonseed meal
in broiler diets.
Poultry Sci. 47 : 1179-1186.
- WALLER, D.P., ZANEVELD, L.J.D., FONG H.H.S., 1980.
In vitro spermicidal activity of gossypol.
Contraception 22 (2) : 183-187.
- WAN, P.J., GREEN, J., CARTER, C.M., MATTIL, K.F., 1979.
Factors influencing the color of cottonseed proteins product.
J. Food Sci. 44 (2) : 475-479.
- WANG, Y.C., RAO, P.N., 1984.
Effect of gossypol on DNA synthesis and cell cycle progression of mammalian
cells in vitro.
Cancer Res. 44 : 35-38.
- W H O (World Health Organization), 1973.
Energy and protein requirement.
W H O techn. Rep. Series 522. FAO Nutrition. Meetings Rep. Series 52. report
of a Joint FAO (W H O ad Hoc Expert Commitee).

WILSON, H.K., PRICE-JONES, C., HUGHES, R.E., 1976.

The influence of an extract of orange peel on the growth and ascorbic metabolism of young Guinea pig.

J. Sci. Food Agric. 27 : 661-666.

WITKOP, B., BEILER, T.W., 1954.

Studies on schiff bases in connection with the mechanism of transamination.

J. Amer. Chem. Soc. 76 : 5589-5597.

WOLF, W.J., 1972.

What is soy protein ?

Food Technol. 26(5) : 44-54.

WULF, L.W., NAGEL, C.W., 1976.

Analysis of phenolic acids and flavonoids by High Pressure Liquid Chromatography.

J. Chromatogr. 116 : 271-279.

YATSU, L.Y., ALTSCHUL, A.M., 1963.

Lipid-protein particles : isolation from seeds of Gossypium hirsutum

Science : 142 : 1062-1064.

YATSU, L.Y., KIRCHER, H.W., 1987.

Electron microscopic cytochemistry of cyclopropenoids in cottonseed

(Gossypium hirsutum L.) tissue.

Lipids 22 (6) : 397-400.

YOKOTSUKA, K., TAKAHASHI, Y., YOSHII, M., KUSHIDA, T., 1978.

Successive extraction of KOSHU white wine for fractionation of flavonoids polymers.

J. of Fermentation Technology. 56 (2) : 121-127.

ZHUGE, Q., POSNER, E.S., DEYOE, C.W., 1988.

Production study of a low-gossypol protein product from cottonseed meal.

J. Agric. Food Chem. 36 : 153-155.

ANNEE : 1989

NOM DE L'AUTEUR (prénom) : TCHIEGANG Clergé.

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC (Montpellier II).

RESUME :

Nous avons étudié les composés phénoliques des amandes de cotonniers avec et sans glandes dans l'optique de la détoxification des amandes à glandes.

Le gossypol et les flavonoïdes (dérivés du kaempférol et de la quercétine) sont les composés phénoliques majeurs respectivement des amandes des cotonniers avec et sans glandes, devant les acides phénoliques (acides hydroxycinnamiques, dérivés des acides férulique et coumarique). Lorsque l'on traite à froid ou à chaud des amandes broyées de cotonniers (avec et sans glande) et de soja, avec du gossypol pur ou avec son complexe avec l'acide acétique, le gossypol se combine avec d'autres constituants des amandes et les taux de lysine disponible diminuent. L'hydrolyse ultérieure des liaisons du gossypol combiné démasque les fonctions ϵ -amines de la lysine préalablement bloquées et les teneurs en lysine disponible augmentent.

Les glandes à pigments et les matières grasses sont simultanément extraites des amandes broyées sèches par le mélange hexane-fréon ou par le dichlorométhane. Des mélanges de dichlorométhane et d'éthanol parachèvent la détoxification et diminuent les taux des composés phénoliques totaux des farines. Ces dernières présentent un bon équilibre chimique des acides aminés. Leurs couleurs, presque équivalentes à celle de la farine sans glande délipidée par l'hexane, dépendent des teneurs en composés phénoliques, du pourcentage de chaque famille de composés phénoliques ainsi que de leur état d'oxydation.

MOTS CLES :

Gossypium , détoxification, composés phénoliques, gossypol, acides aminés, couleurs des farines.