



18èmes Journées de la Recherche Cunicole

Nantes 27-28 mai 2019

ZEMZMI J., RODENAS L., BLAS E., MARTÍNEZ-PAREDES E., LÓPEZ-LUJAN M.C., MOYA J., NAJAR T., PASCUAL J.J., 2019. *Caractérisation et évaluation du potentiel prébiotique apporté par le galactomannane extrait du fenugrec chez le lapin en croissance.* 18^{èmes} Journées de la Recherche Cunicole, 27 – 28 mai 2019, Nantes, France , 128-131.

Texte complet

+

Fichier de présentation orale

Caractérisation et évaluation du potentiel prébiotique apporté par le galactomannane extrait du fenugrec chez le lapin en croissance.

Zemzmi J.^{1,2}, Rodenas L.¹, Blas E.¹, Martínez-Paredes E.¹, López-Lujan M.C.¹, Moya J.¹, Najjar T.², Pascual J.J.¹.

¹Institute for Animal Science and Technology, University Politécnica de Valencia; Valencia, Spain

²National Agronomic Institute of Tunisia, University of Carthage, Tunisia

E-mail : zemzmijhed@gmail.com

* correspondant : zemji@doctor.upv.es

Résumé – En tant que moyen de réduire l'utilisation des antibiotiques au niveau de l'élevage industriel de lapin de chair, le galactomannane (GM) extrait de fenugrec (*Trigonella foenum-graecum*), a été proposé comme une fibre soluble susceptible d'avoir un effet prébiotique. Pour qualifier une fibre soluble comme un prébiotique, il faut qu'elle satisfasse trois conditions : la non-digestibilité par les enzymes de l'estomac et de l'intestin grêle, la haute fermentescibilité au niveau de cæcum, et la stimulation sélective de l'activité microbienne. Dans ce contexte, on a fait l'extraction aqueuse du GM à partir des graines de fenugrec produite en Tunisie. Dans un premier essai pour tester la non-digestibilité et la fermentescibilité, le GM et deux concentrés commerciaux [supplémenté par 10% de fibre soluble (FS) ou lignine (LIG)] ont été soumis à la digestion par la pepsine et la pancréatine suivie par une fermentation avec un inoculum cæcal. Dans un deuxième essai, on a étudié l'effet de l'incorporation de trois niveaux croissants de galactomannane (0 ; 0,25 et 0,5%) dans l'aliment du lapin sur la digestibilité des fractions fibreuses. Le GM de fenugrec est caractérisé par une pureté de 69% et un ratio de galactose/mannose de 1,06. La majorité de la quantité ingérée du GM (83,6 %) échappe à la digestion *in vitro* par la pepsine et la pancréatine. Le GM est totalement fermenté par l'inoculum cæcal contribuant à une forte production d'acides gras volatils (46,10 mmol/L) ainsi qu'une faible concentration en azote ammoniacal (27,04 mg/L). Le GM pourrait améliorer la digestibilité de la fraction fibreuse spécialement celle de la « fibre neutre détergente » (ADF). En conclusion, le GM satisfait deux propriétés du potentiel prébiotique, mais il reste à étudier son effet sur le microbiote cæcal pour le présenter comme un ingrédient à effet prébiotique pour le lapin.

Abstract – Characterization and evaluation of the prebiotic potential provided by the galactomannan extracted from fenugreek in growing rabbit. Searching alternatives to antibiotics in the industrial meat rabbit breeding, galactomannans (GM) extracted from fenugreek seeds (*Trigonella foenum-graecum*) has been proposed as a soluble fiber that may have prebiotic effect. To qualify a soluble fiber as prebiotic, it must satisfy three conditions: non-digestibility by stomach and intestinal enzymes, high fermentability by cæcal bacteria, and selective stimulation of the microbial activity in the hindgut. In this context, the aqueous extraction of galactomannan was made from fenugreek seeds produced in Tunisia. In a first trial to test the non-digestibility and fermentability, the GM and two commercial rabbit's feeds [supplemented with 10% soluble fiber (FS) or lignin (LIG)] were subjected to digestion by pepsin and pancreatin followed by fermentation with a cæcal inoculum. In a second trial, the GM was included in a rabbit diet at three levels (0, 0.25 and 0.5%), and its effect on fibrous fractions digestibility was studied. According to our results, fenugreek GM was characterized by a purity of 69% and a galactose/mannose ratio of 1.06. Most of the ingested GM (83.6%) escapes *in vitro* digestion by pepsin and pancreatin. GM is fully fermented by cæcal inoculum contributing to a high production of volatile fatty acids (46.10 mmol/L) and a low ammonia nitrogen concentration (27.04 mg/L). GM may improve the digestibility of the fiber fraction especially that of the neutral detergent fiber. In conclusion, GM from fenugreek satisfies two properties to be considered as a prebiotic, however, its effect on rabbit's cæcal microbiota needs to be studied to be qualified as a functional soluble fiber with a prebiotic effect in rabbits.

Introduction

Les souches commerciales de lapins sont fréquemment exposées à différents problèmes sanitaires, comme les troubles digestifs entre la 4^{ème} et la 10^{ème} semaine d'âge. Le signe clinique le plus courant est la diarrhée (Belli et al., 2008), ce qui conduit les éleveurs à appliquer des traitements

antibiotiques. Beaucoup d'alternatives sont proposées aux éleveurs pour éviter ou réduire l'utilisation des antibiotiques. Parmi ces alternatives on cite : les enzymes, les acides organiques, les probiotiques et les prébiotiques (Falcao et al., 2007). Les prébiotiques sont des oligosaccharides qui ne sont pas digérés par les enzymes gastro-intestinales, mais ils ont la propriété de stimuler sélectivement la multiplication

de certaines espèces microbiennes. Ils pourraient donc jouer un rôle primordial sur la santé et les performances de l'animal, en améliorant sa nutrition et sa réponse immunitaire (Burn et al., 2009 ; Patterson et Burkholdee, 2003). Le fenugrec (*Trigonella foenum-graecum*) est une plante produite localement en Tunisie qui est considérée comme une épice. Selon la méthode enzymatique de détermination de la teneur en fibres totales décrite par Asp et al (1983), les graines de fenugrec contiennent 52% de fibres totales dont 31% sont des fibres solubles (Madhava Naidu et al., 2011), dont le composant majoritaire est le galactomannane (Majeed et al., 2018; Jiang et al., 2007). Susceptibles d'avoir un effet prébiotique, les galactomannanes (GM) ont été testés chez les rats, les volailles, les porcs, et sur le lapin comme un modèle de laboratoire mais pas en élevage commercial. Notre travail présente les résultats de l'évaluation *in vitro* et *in vivo* de galactomannane extrait de fenugrec, comme une fibre soluble possédant un potentiel prébiotique chez le lapin en croissance.

1. Matériel et méthodes

1.1. Extraction et caractérisation du GM

Les graines de fenugrec ont été achetées au marché hebdomadaire de Tunis, nettoyées, broyées à un diamètre inférieur à 2 mm, dégraissées dans un mélange d'hexane et d'isopropanol (3/2, V/V), filtrées et le résidu a été trempé dans 10 fois son volume d'eau distillée durant 24 h, puis filtré à l'aide d'un tissu nylon de 40 µm de porosité. Le filtrat a été précipité par l'éthanol 95° (1/1, V/V), filtré, lavé avec de l'acétone et congelé à -20°C pour être ensuite lyophilisé et broyé, jusqu'à obtenir une poudre blanche fine qui est la gomme (GM) de graine de fenugrec. La composition chimique de la gomme a été déterminée selon les procédures de l'AOAC (2000), Van Soest et al. (1991) et Dumas (2009). La teneur en fibres totales est déterminée en utilisant la digestion enzymatique suivant la méthode décrite par Lee et al (1992) et Prosky et al (1988, 1992). La composition en monomère des sucres a été déterminée par chromatographie des sucres suivant la méthode de PNT-MF-144 (HPLC-Indice de réfraction).

1.2. Digestion enzymatique

Deux aliments ont été préparés à partir du même aliment commercial granulé de base (tableau 1), l'un enrichi en fibres solubles (FS ; avec 10% de pulpes de betterave et autre enrichi en lignines (LIG ; avec 10% de pépins de raisin). Le GM de fenugrec, ainsi que les deux concentrés enrichis LIG et FS ont été soumis à la digestion *in vitro* par le couple d'enzymes pepsine et pancréatine selon la méthode de Ramos et Carabaño (1996). La digestion a été réalisée à l'aide du dispositif Daisy Incubateur (Ankom tech), où 0,5±0,005 g de chaque substrat ont été pesé dans des sacs ANKOMF57. L'incubation avec la pepsine dure 2h à 40°C, et celle avec la pancréatine dure 3h et

30min à 40°C, en agitation continue. La composition chimique des concentrés FS et LIG et de ses résidus indigestibles (RI_{FS} et RI_{LIG}) après la digestion enzymatique a été mesurée (tableau 3). Les analyses du laboratoire confirment que l'aliment LIG est plus riche en lignines, par contre ce n'est pas le cas pour la teneur en fibres solubles (TDF-NDF) (tableau1).

Tableau 1: Composition chimique en %MS de l'aliment enrichi en fibres solubles (FS) or lignines(LIG) et de galactomannane (GM) et leurs résidus indigestibles (RI) après digestion par la pepsine et la pancréatine

	FS	RI _{FS}	LIG	RI _{LIG}	GM	RI _{GM}
Humidité (%)	10,4	4,4	10,5	4,3	8,7	7,8
MAT	16,8	11,3	16,9	10,6	22,3	16,4
NDF	40,1	66,0	41,5	68,5	73,1	-
ADF	20,4	35,9	23,1	40,1	13,3	-
ADL	2,8	6,5	6,6	12,7	-	-
TDF	48,9	-	47,4	-	-	-
Pureté	-	-	-	-	68,8	52,5
G/M	-	-	-	-	1,1	1,2

RI_{FS} : résidu du FS indigestible par la pepsine et la pancréatine, RI_{LIG} : résidu du LIG indigestible par la pepsine et la pancréatine, RI_{GM} : résidu du GM indigestible par la pepsine et la pancréatine TDF : fibre totales, G/M : le galactose/mannose

1.3. Fermentation *in vitro* du résidu non digestible par la pepsine et la pancréatine

La fermentation *in vitro* a été réalisée selon la technique de Fernández-Carmona et al. (1993). L'inoculum cæcal a été prélevé sur 5 lapins nourris avec l'aliment de base dès leur sevrage. Les lapins ont été sacrifiés à 49 jours d'âge, leur contenu cæcal a été collecté, puis mélangé. Ensuite 400 g du mélange ont été mélangés avec la salive artificielle, puis filtrés et centrifugés à 6000 tpm durant 10 min, puis le surnageant a été transvasé dans une fiole et a été ajusté à 2 L avec la salive artificielle (sous CO₂ à 38°C). Ensuite, on a introduit 0,7 g de résidu indigestible et 50 ml d'inoculum cæcal, maintenu sous CO₂ à 38°C pendant 48h en agitant régulièrement. À la fin de l'incubation, la fermentation a été arrêtée en plaçant les fioles dans un bain glacé. Parallèlement, on a déterminé : la pression (avec un baromètre), la concentration en méthane (CH₄), le pH, les concentrations en acides gras volatils (AGV ; par chromatographie en phase gazeuse) et en azote ammoniacal (N-NH₃), ainsi que le poids de résidu sec.

1.4 Digestibilité *in vivo*

L'aliment concentré commercial pour lapins en engraissement était à base de luzerne, tourteau de soja, son de blé, orge et d'un composé minéral vitaminé, sa la composition chimique est présentée par le tableau 2. A partir de cet aliment, trois aliments expérimentaux ont été fabriqués. Ils diffèrent selon le niveau d'inclusion de GM (0,0 - 0,25 et 0,5%). Ces aliments ont été distribués à trois groupes de 10

lapereaux logés dans des cages individuelles dès le sevrage (31 jours d'âge). Dix lapereaux par traitement ont été utilisés pour le contrôle de l'ingestion et la mesure de la digestibilité apparente de la matière sèche (MS), la matière azotée totale (MAT), les fibres insolubles dans le détergent neutre (NDF), les fibres insolubles dans le détergent acide (ADF). La collecte des fèces a été faite durant deux périodes de quatre jours : du 38^e aux 41^e et du 56^e aux 59^e jour. La composition chimique de l'aliment et de la matière fécale a été déterminée selon les procédures AOAC (2000) et Van Soest et al. (1991).

1.5. Analyses statistiques

L'essai de la digestion enzymatique et de la fermentation cœcale a été répété 3 fois. Et l'effet "répétition" a été inclus dans le modèle. Les données ont été analysées avec une procédure GLM de SAS (1996). Pour les données de la fermentation *in vitro* le modèle comprenait le traitement et le lot, comme effets fixes, et pour les données d'ingestion et de digestibilité *in vivo* le modèle considèrerait seulement le niveau d'inclusion de GM.

Tableau 2. Composition chimique de l'aliment de base utilisé dans la digestibilité *in vivo* (% MS).

MS	MO	MAT	MG	NDF	ADF	ADL	TDF	Amidon
90,3	89,8	17,1	2,6	39,1	24,6	3,3	46,0	12,4

MS: matière sèche; MO: matière organique; MAT: matières azotées totales; MG: matières grasses ; TDF: fibre totale.

2. Résultats et discussion

La composition chimique de la gomme de graines de Fenugrec (GM), (tableau 1) contient près de 70% de galactomannanes, contre 63% selon Majeed et al. (2018). Ces galactomannanes se caractérisent par un ratio galactose/mannose proche de 1, en accord avec Brummer et al. (2003). Après la digestion enzymatique, la pureté du GM (RI_{GM}) est réduite à 53%, ce qui suggère que 84 % échappent à la digestion intestinale. En parallèle, la concentration en protéines brutes de GM est réduite d'environ 30% par la digestion enzymatique *in-vitro*.

À la fin de l'incubation (tableau 3), le RI du GM (RI_{GM}) présente une pression de 2,0 contre 1,5 et 1,3 mbar pour les RI des aliments FS (RI_{FS}) et le LIG (RI_{LIG}). Sa production d'AGV est deux et trois fois supérieure à celle de RI_{FS} et RI_{LIG}, respectivement. Ces deux résultats supportent l'hypothèse que le GM contribue à une forte fermentation au niveau du cæcum donnant lieu à la production des AGV. Par contre, le RI_{GM} contribue à une production des N-NH₃ trois fois inférieure à celle du RI_{FS} et quatre fois inférieure à celle du RI_{LIG}. Ceci pourrait être expliqué par une forte croissance microbienne qui nécessiterait une forte absorption d'ammoniaque comme source d'azote pour sa croissance et son activité, en accord avec Stewart et al. (1993) et Williams et al. (2000). À la fin de la fermentation, seuls 1,6% de RI_{GM} n'ont pas été dégradés contre 59 et 66 % pour RI_{FS} et RI_{LIG}, respectivement. Ceci suggère que le GM serait fermentescible en quasi-totalité dans le cæcum, et donc qu'il serait identifiable comme prébiotique.

L'effet de l'inclusion du GM sur la digestion fécale *in-vivo* n'est pas significatif sur la digestibilité de la MO et de la MAT. Par contre on note comme le montre le tableau 4, une augmentation de 2,52 et de

2,62% au niveau de la digestibilité apparente des NDF et des ADF respectivement pour 0,5% de GM. Cette amélioration au niveau de la digestibilité des fractions fibreuses même si elle semble importante n'est pas statistiquement significative.

Tableau 3: Les paramètres de fermentations des résidus indigestibles (RI) de GM et les aliments FS et LIG.

	pH	Pression (mbar)	N-NH ₃ (mg/mL)	AGV (mg/mL)	RNF (%)
RI _{FS}	6,2 ^b	1,5 ^b	89,4 ^b	21,3 ^b	58,9 ^b
RI _{LIG}	6,3 ^c	1,3 ^a	102,4 ^c	16,3 ^a	66,5 ^c
RI _{GM}	5,7 ^a	2,0 ^c	27,0 ^a	46,1 ^c	1,6 ^a
ETM	0,03	0,03	6,29	3,31	0,71
P _{Aliment}	***	***	***	***	***
P _{Répétition}	***	***	**	ns	***

a, b, c les moyennes que ne partagent pas les mêmes indices sont différentes significativement (P<0.05). RNF: résidu non fermenté. ETM : erreur type de la moyenne. **P<0,01; ***P<0,001 ; ns , non significatif.

Tableau 4 : Effet de l'incorporation du GM sur la digestibilité de la MO, MAT, NDF et ADF

Digestibilité	Niveau du GM				P value
	0,0	0,25	0,50	ETM	
MO	52,8	54,2	52,6	0,7	0,27
MAT	63,4	65,8	64,7	1,0	0,27
NDF	20,9	22,4	23,4	1,0	0,24
ADF	5,7	6,2	8,3	1,2	0,27

MO : matière organique, MAT : matière azotée totale, NDF : les fibres insolubles dans les détergents neutres, ADF : les fibres insolubles dans les détergents acides. ETM : erreur type de la moyenne

Conclusions

La gomme extraite de graines de fenugrec satisfait les deux premières propriétés qui caractérisent une fibre soluble comme un prébiotique. Elle est constituée majoritairement de galactose et de mannose (avec un ratio proche de 1), elle résiste *in-vitro* à la digestibilité par les enzymes de l'estomac et de l'intestin grêle, et elle est totalement fermentée et contribue à une forte production d'AGV en diminuant celle de N-NH₃. En perspective, l'effet prébiotique de GM sera étudié *in-vivo* pour estimer son impact sur la croissance et la santé ainsi que sur le microbiote cœcal du lapin en croissance.

Remerciements

L'équipe souhaite remercier les deux universités et les deux institutions qui ont soutenu ce travail. L'université de Carthage et L'université Polytechnique de Valence. L'Institut Agronomique de Tunis et l'Institut de Science et de Technologie Animale de Valence.

Références

- AOAC, 2000. Official Methods of Analysis of the AOAC International, 17th ed. AOAC International, Gaithersburg, MD (USA).
- Belli P., Fontana E., Sommariv M., Scarpelli L., Ricci C., Luzi F., Haddad B. 2008. The Tunisian traditional rabbit breeding system versus the commercial system: an epidemiological perspective. *World Rabbit Science*, 16, 221–228.
- Brummer Y., Cui W., Wang Q. 2003. Extraction, purification and physicochemical characterization of fenugreek gum *Food Hydrocolloids* 17, 229–236.
- Falcão-e-Cunha L., Castro-Solla L., Maertens L., Marounek M., Pinheiro V., Freire J., Mourão J. L. 2007. Alternatives to antibiotic growth promoters in rabbit feeding *World Rabbit Sci.* 2007, 15, 127 – 140.
- Jiang J X., Zhu L W., Zhang W M., & Sun R C. 2007. Characterization of galactomannan gum from Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seeds and its rheological properties. *International Journal of Polymeric Materials*. 56, 1145–1154.
- Majeed M., Majeed S., Nagabhushanam K., Arumugam S., Natarajan S., Beede K., Furqan A. 2018. Galactomannan from *Trigonella foenum-graecum* L. Seed: Prebiotic application and its fermentation by prebiotic *Bacillus coagulans* strain MTCC 5856. *Food Sci Nutr*. 6, 666-673.
- Madhava Naidu M., Shyamala B N., Pura Naik J., Sulochanamma G., Srinivas P. 2011. Chemical composition and antioxidant activity of the husk and endosperm of fenugreek seeds. *LWT - Food Science and Technology* 44, 51-56.
- Patterson JA., Burkholder KM. 2003. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. *Poultry Science*, 82 (4), 627–631
- Stewart C S., Hilman K., Maxwell F., Kelly D., King T P. 1993. Recent advances in probiotics in pigs: observations on the microbiology of the pig gut., In: Garnsworthy, P.C., Cole, D.J.A. (Eds.), *In. Recent Advances in Animal Nutrition*, Nottingham University Press, Nottingham, pp: 1.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Methods for dietary fiber: neutral detergent fiber and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dietary Science* 74 3583–3597.



ICTA



CARACTERISATION ET EVALUATION DU POTENTIEL PREBIOTIQUE APORTE PAR LE GALACTOMANNANE EXTRAIT DU FENUGREC CHEZ LE LAPIN EN CROISSANCE

ZEMZMI Jihed, RODENAS L, BLAS E, MARTÍNEZ-PAREDES E, LÓPEZ-LUJAN MC, MOYA J, NAJAR T, PASCUAL JJ.

INTRODUCTION

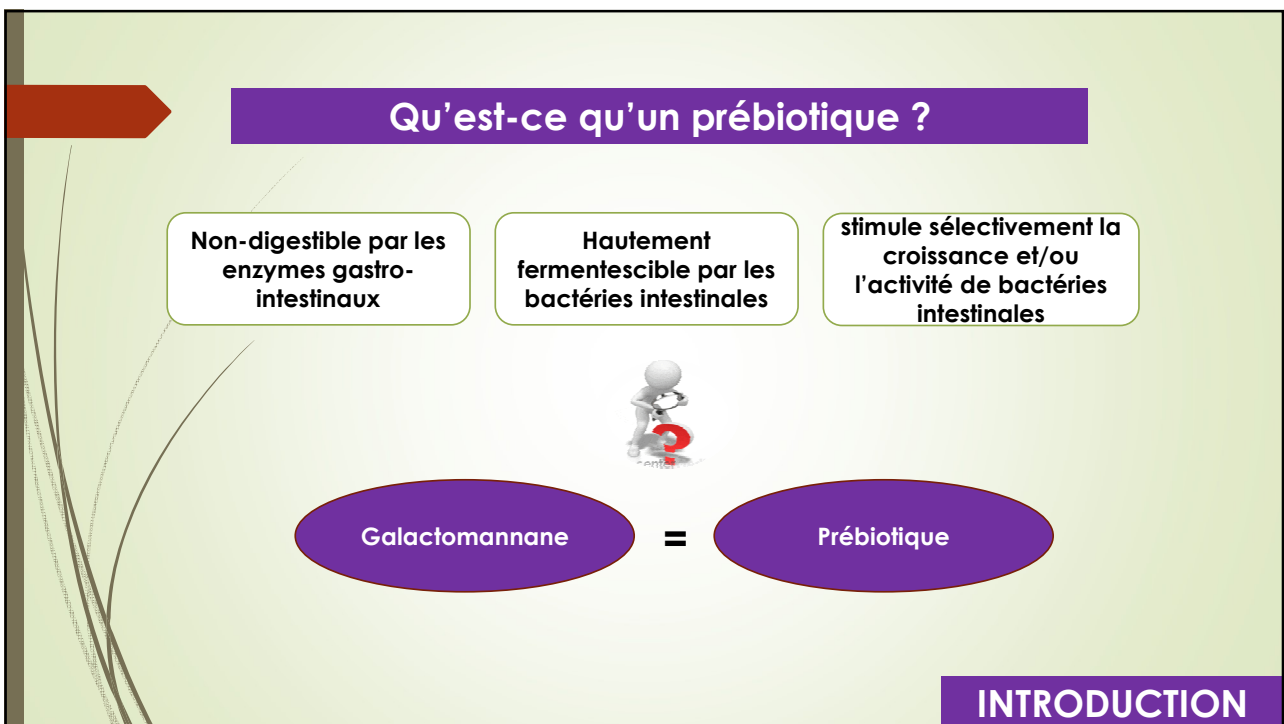
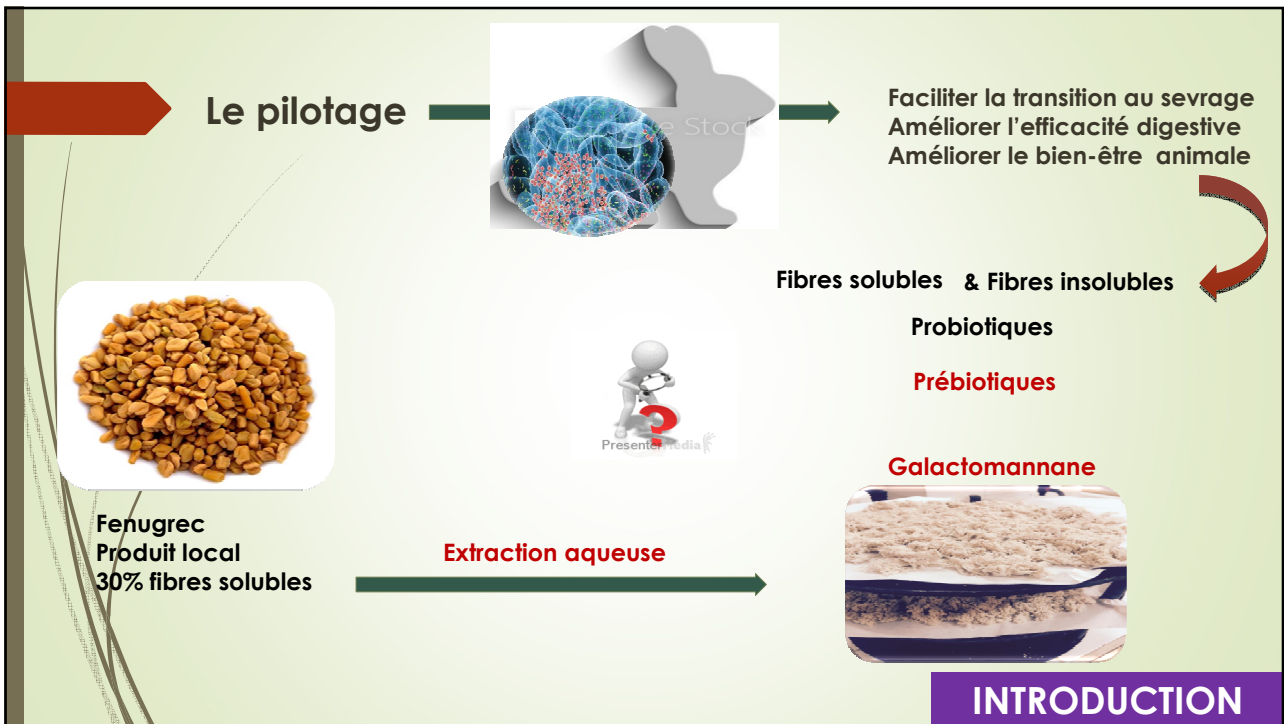
OBJECTIFS

ESSAI I

ESSAI II

RESULTATS

CONCLUSIONS





Caractérisation du galactomannane et évaluation de son potentiel prébiotique: non digestibilité et haute fermentestibilité



Evaluation de l'effet de l'incorporation du galactomannane dans l'aliment concentré des lapereaux en croissance sur la digestion fécale des nutriments

OBJECTIFS

Digestion Enzymatique: pepsine et pancréatine



GM



FS



LIG

Fermentation: inoculum caecal (48 h)

RI_{GM}

Composition chimique du RI

RI_{FS}

RI_{LIG}

- GM: galactomannane
- FS: concentré riche en fibres solubles
- LIG: concentré riche en lignines

Pression
pH
N-NH₃
AGVT
RNF

ESSAI I: Digestion et fermentation *in vitro*

Ratio de base
Concentré commercial
Témoin 0%GM

+0,25% GM

+0,5% GM

-10 lapins/traitement
-Cage individuelle
-Contrôle de la digestibilité:
2^{ème} & 5^{ème} semaine post sevrage

Digestibilité fécale

(Perez et al., 1995)

ESSAI II Digestibilité *in vivo*

Composition chimique de GM, FS, LIG et leurs résidus

	FS	RI _{FS}	LIG	RI _{LIG}	GM	RI _{GM}
Humidité	10,4	4,4	10,5	4,3	8,7	7,8
MAT	16,8	11,3	16,9	10,6	22,3	16,4
NDF	40,1	66,0	41,5	68,5	73,1	-
ADF	20,4	35,9	23,1	40,1	13,3	-
ADL	2,8	6,5	6,6	12,7	-	-
Pureté [GM]	-	-	-	-	68,8	52,5
Ratio G/M	-	-	-	-	1,1	1,2

Le GM n'est pas digéré à 84% ☹

RESULTATS

Paramètres de fermentation des résidus indigestibles

	pH	Pression	N-NH3	AGVT	RNF
RI _{FS}	6,2 ^a	1,5 ^b	89,4 ^b	21,3 ^b	58,9 ^b
RI _{LIG}	6,3 ^c	1,3 ^a	102,4 ^c	16,3 ^a	66,5 ^c
RI _{GM}	5,7 ^a	2,0 ^c	27,0 ^a	46,1 ^c	1,6 ^a
P-value Résidus	***	***	***	***	***
P-value Répétitions	***	***	***	***	***

RNF: résidu non fermenté

Le GM est totalement fermenté 😊

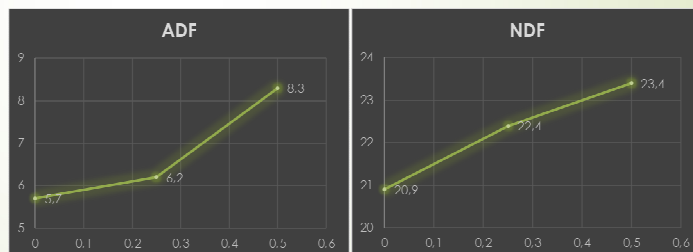
RESULTATS

Coefficients de digestibilité aparente des nutriments

Niveau d'inclusion de GM

0,0 0,25 0,50

Digestibilité MO	52,8	54,2	52,6
Digestibilité NDF	63,4	65,8	64,7



P-value < 0,20
+2,52 % ADF/+0,5% GM

P-value < 0,15
+2,62 % NDF/+0,5% GM

Niveau d'inclusion de GM

RESULTATS

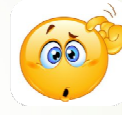
Non-digestible par les enzymes de l'estomac et de l'intestin grêle



Hautement fermentescible par le microbiote



Pourrait améliorer la digestibilité des fractions fibreuses



stimule sélectivement la croissance et/ou l'activité de bactéries intestinales



Galactomannane

Conclusion

Merci Pour Votre Attention!